



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA, INOVAÇÃO E
TECNOLOGIA PARA A AMAZÔNIA – CITA



**Contribuição ao conhecimento químico de espécies do gênero
Protium (*Protium hebetatum* Daly e *Protium leptostachyum*
Cuatrec.) Burseraceae.**

Kennedy Lima da Silva

**RIO BRANCO - AC
2016**



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA, INOVAÇÃO E
TECNOLOGIA PARA A AMAZÔNIA – CITA



**Contribuição ao conhecimento químico de espécies do gênero
Protium (*Protium hebetatum* Daly e *Protium leptostachyum*
Cuatrec.) Burseraceae**

Kennedy Lima da Silva

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia, da Universidade Federal do Acre, como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**.
Área de concentração: Ciências e Inovação Tecnológica.

Orientador: Prof. Dr. Delcio Dias Marques

RIO BRANCO - AC
2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA, INOVAÇÃO E TECNOLOGIA
PARA A AMAZÔNIA – CITA

Kennedy Lima da Silva

**Contribuição ao conhecimento químico de espécies do gênero *Protium*
(*Protium hebetatum* Daly e *Protium leptostachyum* Cuatrec.) BURSERACEAE**

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: ____/____/____

Prof. Dr. Delcio Dias Marques (Orientador)
Universidade Federal do Acre – (UFAC)

Prof. Dr. Adriano Antonio Silva (Membro)
Universidade Federal do Acre – (UFAC)

Prof. Dr. Rogerio Antônio Sartori (Membro)
Universidade Federal do Acre – (UFAC)

Dedico este trabalho à minha família pela paciência e amor incondicional. À minha amada Pollyanna pelas palavras de ânimo e companheirismo.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela força e frieza que foram dadas a mim para superar todos os obstáculos durante essa caminhada.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Delcio Dias Marques, por todo o esforço, dedicação e paciência na realização deste trabalho. Pela amizade e pelas conversas sobre tudo.

Ao Instituto de Análise Forense (IAF) do Departamento de Polícia Técnico Científica da Polícia Civil do Estado do Acre, na pessoa do Diretor Mário Sandro Martins de Souza pela concessão para utilização dos equipamentos.

Ao perito criminal Giulliano Scarante Cezarotto, pela disponibilidade nas realizações das análises de infravermelho e cromatografia gás-líquido acoplada a espectrômetro de massa.

À Prof^a. Dra. Telma Leda Gomes de Lemos do departamento de química orgânica e inorgânica da Universidade Federal do Ceará pela análise CGL/EM realização

À Prof^a. Dra. Clarice Maia Carvalho pela realização dos testes de microbiológicos.

Ao Prof. Dr. Carromberth Carioca Fernandes pela doação de solventes orgânicos para a conclusão deste trabalho.

Aos bolsistas de iniciação científica Raquel Rodrigues e Cenaar Klippel, pelo auxílio nas análises cromatográficas e prospecção fitoquímica.

Aos meus colegas do Laboratório de Química, em especial ao Leandro Machado, Uiara Ferraz e Ludimila Klippel, pelas longas conversas descontraídas e pelas palavras de ânimo e de incentivo.

Aos meus pais Mário Nascimento da Silva e Maria Amélia Lima da Silva, a minha irmã Keyla Millena Lima da Silva e namorada Pollyanna da Silva, por todo carinho e esforço para me incentivarem a vencer essa etapa da minha vida.

A todos que contribuíram de alguma forma para este momento, o meu muito obrigado.

“O conhecimento da natureza é o caminho para a admiração do Criador”.

Justus von Liebig

RESUMO

Este trabalho relata o estudo fitoquímico de duas espécies de plantas da família Burseraceae: *Protium hebetatum* Daly e *Protium leptostachyum* Cuatrec., popularmente conhecidas como breu ou breu-branco. As espécies foram coletadas em propriedade particular, em período chuvoso, ao longo da BR-307 no município de Mâncio Lima, Estado do Acre, Brasil. Do *P. hebetatum* foi coletada apenas a resina do qual foi extraído o óleo essencial pelo método de hidrodestilação, utilizando aparelho tipo Clevenger modificado. A análise do óleo essencial permitiu registrar 8 monoterpenos, 12 sesquiterpenos e 8 compostos que não foram identificados. Os constituintes monoterpênicos mais abundantes identificados foram o α -felandreno (17,363%), α -pineno (9,160%) e o *p*-cinemo (7,241%). Em relação aos sesquiterpenos, os principais constituintes foram o *E*-cariofileno (11,160%) e *D*-germacreno (10,242%). Este óleo essencial mostrou atividade bacteriana frente às bactérias gram-negativas: *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*. Da espécie *P. leptostachyum* foram coletadas as folhas, lenho e cascas do lenho. Na amostra das folhas foi extraída a cera cuticular utilizando diclorometano sendo determinada a quantidade de cera cuticular por área foliar ($97,59 \pm 5,00 \mu\text{g cm}^{-2}$). Foram obtidos os extratos das folhas, lenho e casca do lenho, por maceração a quente com hexano e a frio com etanol. O extrato hexânico foi fracionado por cromatografia filtrante sob pressão reduzida com solventes em ordem crescente de polaridade: éter de petróleo, diclorometano e etanol. O estudo fitoquímico das frações éter de petróleo (FEP) e diclorometano (FDM) do extrato hexânico das folhas permitiu registrar 60 compostos, sendo identificados 43 compostos. Os constituintes identificados foram classificados em: 19 compostos voláteis, 7 ésteres de cadeias longas, 6 hidrocarbonetos de cadeias longas, 3 aldeídos identificados como sendo tetradecanal, pentadecanal, octadecanal, 3 triterpenos identificados como sendo α -amirina, β -amirina, lupenona, friedooleanan-3-ona, 2 esteroides o estigmasterol e o γ -sistosterol, ácido octadec-9-enoico, α -tocoferol. Da casca e do lenho foi realizada a prospecção fitoquímica qualitativa dos extratos etanólicos, confirmando a presença, em ambos, das seguintes classes de metabólitos: taninos hidrolisáveis, ácidos orgânicos livres, açúcares redutores, triterpenos, glicosídeos cardiotônicos, flavonoides, saponinas, alcaloides. A quantificação dos compostos fenólicos e flavonoides totais do lenho resultaram em: metanol ($185,553 \pm 0,527 \text{ mg EAG g}^{-1}$, $21,438 \pm 0,482 \text{ mg EQCT g}^{-1}$), etanol ($166,737 \pm 3,059 \text{ mg EAG g}^{-1}$, $26,953 \pm 3,259 \text{ mg EQCT g}^{-1}$) e acetona ($74,105 \pm 0,843 \text{ mg EAG g}^{-1}$, $17,651 \pm 0,465 \text{ mg EQCT g}^{-1}$), respectivamente. Para a casca, resultaram em: metanol ($226,868 \pm 1,000 \text{ mg EAG g}^{-1}$, $24,395 \pm 0,484 \text{ mg EQCT g}^{-1}$), etanol ($206,474 \pm 4,780 \text{ mg EAG g}^{-1}$, $23,698 \pm 1,817 \text{ mg EQCT g}^{-1}$) e acetona ($186,868 \pm 2,387 \text{ mg EAG g}^{-1}$, $19,979 \pm 0,209 \text{ mg EQCT g}^{-1}$), respectivamente. A análise microbiológica da FEP dos extratos hexânico das folhas e etanólico da casca da espécie *P. leptostachyum* apresentou atividade bactericida para *Streptococcus pneumoniae*, o extrato etanólico do lenho apresentou atividade bactericida para *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pneumoniae*.

Palavras-chave: Protium. Óleo Essencial. Cera Cuticular. Prospecção Fitoquímica.

ABSTRACT

This work describes the phytochemical study of two species of Burseraceae family plants: *Protium hebetatum* Daly e *Protium leptostachyum* Cuatrec., known popularly as breu or breu-branco. The species were collected in a private property, on the rainy season, along the BR-307 highway, in the city of Mãnco Lima, Acre, Brazil. Only the resin was collected from the *P. hebetatum* and the essential oil was extracted by hydrodistillation method by using a modified Clevenger-type apparatus. The analysis of the essential oil allowed to register eight (8) monoterpenes, twelve (12) sesquiterpenes and eight (8) unidentified compounds. The most abundant monoterpene constituents identified were the α -phellandrene (17.363%), α -pinene (9.160%) and p-cymene (7.241%). Regarding the sesquiterpenes compounds, the main constituents were the E-caryophyllene (11.160%) and D-germacrene (10.242%). This essential oil presented bacterial activity against gram-negative bacteria: *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. Leaves, wood bark and wood were collected from the *P. leptostachyum* species. The cuticular wax was extracted on the leaves by using dichloromethane and the amount of cuticle wax per leaf area ($97,59 \pm 5,00 \mu\text{g cm}^{-2}$) was determined. The extracts of leaves, wood bark and wood were obtained by hot maceration with hexane and cold extraction with ethanol. The hexane extract was fractionated by filtering chromatography under reduced pressure with solvents of increasing polarity order: petroleum ether, dichloromethane and ethanol. The phytochemical study of the petroleum ether fractions (PEF) and dichloromethane fractions (DMF) of the hexane extract of leaves allowed to register 60 compounds, being 43 compounds identified. The constituents identified were classified into 19 volatile compounds, 7 esters of long chain, 6 long-chain hydrocarbons, tetradecanal, pentadecanal, octadecanal, α -amyrin, β -amyrin, lupenone, friedooleanan-3-one, stigmasterol, γ -sitosterol, octadec-9-enoic acid, α -tocopherol. The phytochemical screening of the ethanol extracts from the bark wood and the wood was carried out, confirming the presence in both of the following metabolites classes: hydrolyzable tannins, organic acids, reducing sugars, triterpenoids, cardiotoxic glycosides, flavonoids, saponins, alkaloids. The quantification of the phenolic compounds and total flavonoid of wood resulted in: methanol ($185.553 \pm 0.527 \text{ mg EAG g}^{-1}$, $21.438 \pm 0.482 \text{ mg EQCT g}^{-1}$), ethanol ($166.737 \pm 3.059 \text{ mg EAG g}^{-1}$, $26.953 \pm 3.259 \text{ mg EQCT g}^{-1}$) and acetone ($74.105 \pm 0.843 \text{ mg EAG g}^{-1}$, $17.651 \pm 0.465 \text{ mg EQCT g}^{-1}$), respectively. To the bark wood: methanol ($226.868 \pm 1.000 \text{ mg EAG g}^{-1}$, $24.395 \pm 0.484 \text{ mg EQCT g}^{-1}$), ethanol ($206.474 \pm 4.780 \text{ mg EAG g}^{-1}$, $23.698 \pm 1.817 \text{ mg EQCT g}^{-1}$) and acetone ($186.868 \text{ mg EAG} \pm 2,387 \text{ g}^{-1}$, $19.979 \pm 0.209 \text{ mg EQCT g}^{-1}$), respectively. Microbiological analysis of FEP of the hexane extract of the leaves and the ethanol extract of the bark species *P. leptostachyum* showed bactericidal activity over *Streptococcus pneumoniae*, the ethanol extract of the wood showed bactericidal activity over *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae*.

Keywords: Protium. Essential Oil. Cuticular wax. Phytochemical screening.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Estrutura primária dos órgãos da planta e morfologia externa da folha.	18
Figura 2	Estrutura morfológica da cutícula em relação à camada de cera epicuticular.	19
Figura 3	Herbicida usado no controle de praga daninha em culturas perenes ou anuais.	25
Esquema 1	Proposta de reação de carboxilação da biotina, formando a biotina carboxilada.	27
Esquema 2	Proposta de formação do malonil-coenzima A (malonil-SCoA) através da reação do tipo de condensação de Clasen.	28
Esquema 3	Proposta de formação do β -cetoacil-ACP através da reação de descarboxilação e condensação.	28
Esquema 4	Proposta de formação do butanoil-ACP com a condensação de outro β -cetoacil-ACP.	29
Figura 4	Aparelho extrator de óleo essencial tipo Clevenger modificado.	32
Figura 5	Confecção das cromatoplasmas qualitativas.	33
Figura 6	Cromatograma do óleo essencial da resina obtido da espécie <i>P. hebetatum</i> .	44
Figura 7	Espectro de massa do monoterpeneo α -felandreno.	46
Figura 8	Espectro de massa do monoterpeneo α -pineno.	47
Figura 9	Espectro de massa do monoterpeneo <i>p</i> -cineno.	47
Figura 10	Espectro de massa do sesquiterpeneo <i>E</i> -cariofileno.	48
Figura 11	Espectro de massa do sesquiterpeneo <i>D</i> -germacreno.	48
Figura 12	Curva padrão do ácido gálico em 760 nm.	51
Figura 13	Curva padrão da quercetina em 415 nm.	53
Figura 14	Fluxograma relativo à purificação do extrato hexânico das folhas do <i>P. leptostachyum</i> .	56
Figura 15	Cromatograma da fração FDM1.	57
Figura 16	Espectro na região do infravermelho da fração FDM1.	58
Figura 17	Espectro de massa do nonacosano (C29).	59
Figura 18	Espectro de massa do pentacosano (C25).	59
Figura 19	Espectro de massa do hentriacontano (C31).	59
Figura 20	Cromatograma da fração FDM11-21.	60
Figura 21	Espectro na região do infravermelho da fração FDM11-21.	61
Figura 22	Espectro de massa do tetradecanal.	62
Figura 23	Espectro de massa do octadecanal.	62
Figura 24	Espectro de massa do hexadecanoato de metila.	62
Figura 25	Espectro de massa do hexadecanoato de etila.	63
Figura 26	Espectro de massa do hexadecanoato de ciclohexila.	63
Figura 27	Cromatograma da fração FDM22-34.	64
Figura 28	Espectro na região do infravermelho da fração FDM22-34.	65
Figura 29	Espectro de massa da lupenona.	65
Esquema 5	Proposta de fragmentação da lupenona.	66
Figura 30	Espectro de massa do α -tocoferol.	66
Esquema 6	Proposta de fragmentação do α -tocoferol.	67

Figura 31	Cromatograma da fração FDM35-59.	68
Figura 32	Espectro na região do infravermelho da FDM35-59.	68
Figura 33	Espectro de massa da β -amirina.	69
Figura 34	Espectro de massa da α -amirina.	70
Esquema 7	Proposta de fragmentação para a α -amirina e β -amirina.	71
Figura 35	Cromatograma da fração FDM60-72.	72
Figura 36	Espectro na região do infravermelho da fração FDM60-72.	72
Figura 37	Espectro de massa do estigmasterol.	73
Figura 38	Espectro de massa do γ -sitosterol.	74
Esquema 8	Proposta de fragmentação do estigmasterol.	75
Esquema 9	Proposta de fragmentação do γ -sitosterol.	76
Figura 39	Cromatograma da fração FEP1-2.	79
Figura 40	Espectro na região do infravermelho da fração FEP1-2.	79
Figura 41	Espectro de massa do o-tocoferol.	80
Figura 42	Espectro de massa do friedooleanan-3-ona (friedelina).	81
Figura 43	Estrutura do friedooleanan-3-ona (friedelina).	81
Figura 44	Cromatograma da fração FEP3-8.	82
Figura 45	Espectro de massa do composto não identificado (11% - decalino $M^+ = 138$ m/z, íon base não confirma).	83
Figura 46	Cromatograma da fração FEP9-20.	84

LISTA DE TABELA

Tabela 1	Metabólitos da cera cuticular de espécies da família Burseraceae.	23
Tabela 2	Coordenadas geográficas e registro das espécies coletadas.	30
Tabela 3	Massa dos extratos obtidos da espécie <i>Protium leptostachyum</i> .	32
Tabela 4	Óleo essencial da resina da espécie <i>Protium hebetatum</i> .	45
Tabela 5	Resultados da prospecção fitoquímica qualitativa do lenho e da casca da espécie <i>P. leptostachyum</i> (Burseraceae).	49
Tabela 6	Quantificação dos fenóis totais nos extratos secos da casca e do lenho da espécie <i>P. leptostachyum</i> .	51
Tabela 7	Quantificação dos flavonoides totais nos extratos secos da casca e do lenho da espécie <i>P. leptostachyum</i> .	52
Tabela 8	Determinação do rendimento da cera cuticular da folha do <i>P. leptostachyum</i> .	54
Tabela 9	Constituintes químicos das frações diclorometano (FDM) do extrato hexânico das folhas do <i>P. leptostachyum</i> .	77
Tabela 10	Constituintes químicos das frações éter de petróleo (FEP) do extrato hexânico das folhas do <i>P. leptostachyum</i> .	85
Tabela 11	Atividade microbiológica dos extratos do <i>P. leptostachyum</i> e do óleo essencial da resina do <i>P. hebetatum</i> frente às bactérias <i>Escherichia coli</i> (EC); <i>Klebsiella pneumoniae</i> (KP); <i>Staphylococcus aureus</i> (SA); <i>Streptococcus pneumoniae</i> (SP).	86

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	As Espécies de Protium no Estado do Acre	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1	Composição Química da Cera Cuticular, Propriedades Biológicas e Biossínteses	17
2.2	Constituintes Químicos da Cera Cuticular da Família Burseraceae	19
2.3	Função da Cera Cuticular nas Folhas da Planta	24
2.4	Rota Biossintética de Formação da Cera Cuticular	26
3	MATERIAL E METODOS	30
3.1	Coleta do Material Botânico	30
3.2	Determinação da Área Foliar	30
3.3	Obtenção da Cera Cuticular	31
3.4	Processamento do Material Vegetal	31
3.5	Obtenção dos Extratos	31
3.6	Obtenção do Óleo Essencial	32
3.7	Análise Cromatográfica	33
3.7.1	Preparação de Cromatoplasmas	33
3.7.2	Cromatografia Clássica Filtrante	33
3.7.3	Cromatografia em Coluna Clássica	33
3.7.4	Cromatografia Gás-Líquido Acoplado a Espectrômetro de Massa (CGL/EM)	34
3.8	Espectrometria do Infravermelho	35
3.9	Prospecção Fitoquímica Qualitativa	35
3.9.1	Pesquisa de Flavonoides	35
3.9.2	Pesquisa de Taninos	36
3.9.3	Pesquisa de Saponinas	36
3.9.4	Pesquisa de Catequinas	36
3.9.5	Pesquisa de Ácidos Orgânicos Livres	37
3.9.6	Pesquisa de Polissacarídeos	37
3.9.7	Pesquisa de Açúcares Redutores	37
3.9.8	Pesquisa de Glicosídeos Cardiotônicos	38
3.9.9	Pesquisa de Proteínas	38
3.9.10	Pesquisa de Antraquinonas	38
3.9.11	Pesquisa de Carotenoides	39
3.9.12	Pesquisa de Alcaloides	39
3.9.13	Pesquisa de Depsídeo e Depsídona	39
3.9.14	Pesquisa de Esteroides e Triterpenos	40
3.10	Métodos Quantitativos	40
3.10.1	Preparação das Amostras Desengorduradas	40
3.10.2	Obtenção dos Extrativos para Quantificação	41
3.10.3	Determinação de Composto Fenólico	41
3.10.4	Determinação de Flavonoides Totais	42
3.11	Atividade Microbiológica	42
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
4.1	Constituintes Voláteis da Resina da Espécie <i>Protium hebetatum</i>	44

4.2	Estudo Fitoquímico do <i>Protium leptostachyum</i>	49
4.2.1	Prospecção Fitoquímica do Lenho e da Casca	49
4.2.2	Quantificação de Fenóis Totais da Casca e do Lenho	50
4.2.3	Quantificação de Flavonoides Totais da Casca e do Lenho	52
4.2.4	Determinação da Área Foliar	53
4.2.5	Estudo Químico do Extrato Hexânico das Folhas	55
4.2.5.1	Identificação dos Constituintes das Frações Diclorometano (FDM)	56
4.2.5.1.1	Identificação dos Constituintes da Fração FDM1	57
4.2.5.1.2	Identificação dos Constituintes da Fração FDM11-21	60
4.2.5.1.3	Identificação dos Constituintes da Fração FDM22-34	64
4.2.5.1.4	Identificação dos Constituintes da Fração FDM35-59	67
4.2.5.1.5	Identificação dos Constituintes da Fração FDM60-72	71
4.2.5.2	Identificação dos Constituintes das Frações Éter de Petróleo (FEP)	78
4.2.5.2.1	Identificação dos Constituintes da Fração FEP1-2	78
4.2.5.2.2	Identificação dos Constituintes da Fração FEP3-8	81
4.2.5.2.3	Identificação dos Constituintes da Fração FEP9-20	83
4.3	Atividade microbiológica	86
5	CONCLUSÃO	88
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90

1 INTRODUÇÃO

A pesquisa de produtos naturais de origem vegetal ou animal tem como objetivo principal a busca por princípios ativos que leve no futuro, à produção de um fármaco. Contudo, existem outros ramos da pesquisa de produtos naturais de origem vegetal interessados na compreensão da relação existente entre a planta e a biodiversidade, fomentando, portanto, a conservação do meio ambiente e da biodiversidade. Esses estudos podem fomentar novas atividades econômicas e uma melhor qualidade de vida.

No tocante à busca por novos fármacos, deve-se principalmente ao uso popular de plantas com a finalidade terapêutica. Esta prática foi e continua sendo uma rotina na vida da humanidade. No entanto, o uso milenar de uma planta dentro da medicina tradicional não pode ser entendido como método de validação para sua aplicação, mesmo na forma da chamada medicinal tradicional, como medicamentos eficazes e seguros. Neste sentido, as plantas medicinais, para que possam receber a autorização oficial de seu uso como fitoterápicos, devem passar por estudos, a fim de se comprovar sua eficácia e benefícios que possam advir do seu uso. Diante do exposto, o estudo fitoquímico de espécies vegetais vem contribuir com o conhecimento químico das espécies vegetais ditas medicinais, além de possibilitar a descoberta de novos fármacos.

Recentemente, o Brasil adotou políticas públicas importantes que dizem respeito ao uso de plantas medicinais. Duas grandes medidas foram adotadas, a primeira foi a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares do Sistema Único de Saúde (BRASIL, 2006a) que possibilitou a prática no Sistema Único de Saúde (SUS) de tratamentos relacionados com o uso de fitoterapia, acupuntura e homeopatia. Outra ação importante foi a publicação da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (BRASIL, 2006b) que possibilitou o acesso seguro e a aprovação legal do uso de plantas medicinais. Em função desta medida, em 2011, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) publicou a 1ª Edição do Formulário de Fitoterápicos Farmacopéia Brasileira (BRASIL, 2011). Essas medidas vislumbram a possibilidade de novas pesquisas, no sentido de promover o uso sustentável da biodiversidade brasileira e também no

desenvolvimento de novas cadeias produtivas na indústria nacional, principalmente no tocante aos fitoterápicos.

Apesar do grande papel da fitoquímica na busca de novos fármacos, a mesma não pode se restringir exclusivamente a este objetivo. Por exemplo, os estudos da composição química da cera cuticular das folhas dos vegetais tornam-se cada vez mais importante para se entender o nível de atuação dos herbicidas principalmente para o controle de espécies daninhas.

A cera cuticular é constituída por uma matriz complexa de várias classes de compostos, sendo os principais hidrocarbonetos e ácidos graxos de cadeias longas, álcoois, aldeídos e também uma vasta classe de triterpenos pentacíclicos e tetracíclicos, além de esteroides. A cutícula, que é rica em cera, exerce várias funções de proteção e de conservação para a planta. Entre as principais funções da cutícula pode ser citadas: o controle da perda de água por transpiração, a proteção contra raios solares, radiação ultravioleta, proteção aos ataques de agentes patógenos e a repelência da água e de partículas atuando como agente de limpeza (TAFOLLA-ARELLANO, 2013).

1.1 As Espécies de *Protium* no Estado do Acre

O Estado do Acre, localizado no sudoeste da Amazônia brasileira, apresenta uma densa floresta com uma diversidade maior do que as demais regiões da Amazônia Continental representando, portanto um grande laboratório natural que deve ser preservado (GOTTLIEB; KAPLAN, 1990). A flora acreana tem características que a diferencia de outras regiões da Amazônia, mostrando maiores afinidades florísticas com a Amazônia Peruana e a Boliviana do que com a própria Amazônia Legal, conforme mostraram os dados do Banco da Flora do Acre, projeto do Parque Zoobotânico (PZ) da Universidade Federal do Acre (UFAC). Estudos que possibilitem entender os vários níveis de interações entre as espécies vegetais e o seu habitat representam uma das formas da preservação da biodiversidade Amazônica.

A família Burseraceae representa um dos grandes táxons botânicos presente na Floresta Amazônica, sendo o gênero *Protium* o maior representante, com mais de

80% das espécies de Burseraceae (SIQUEIRA, 1991). Na região do Alto Juruá, no município de Cruzeiro do Sul, Estado do Acre, foram registradas mais de 40 espécies do gênero *Protium*, conforme levantamento realizado pelo projeto do PZ da Flora do Acre (MARQUES, 2010c).

As espécies do gênero *Protium*, na região do Alto Juruá, são conhecidas por vários nomes: breu, breu-branco, almecequeira. A resina exsudada por essas espécies são utilizadas na medicina popular como um importante agente terapêutico, tendo propriedades anti-inflamatórias, analgésicas, expectorantes, cicatrizantes e ação repelente. Também é utilizada na indústria artesanal de verniz, na calafetagem de pequenas embarcações e queimada como incenso em rituais religiosos (RIBEIRO *et al.*, 1999). Estudos farmacológicos realizados com o óleo essencial obtido das resinas de várias espécies do gênero *Protium* comprovaram atividades anti-inflamatórias e analgésicas (SIANI *et al.*, 1999).

Apesar da grande quantidade de trabalhos publicados na literatura relacionada às atividades biológicas de espécies do gênero *Protium*, poucos foram os estudos fitoquímicos sobre a composição da cera cuticular ou sobre a composição química da casca e do lenho dessas espécies.

Essas observações induziram a seleção do gênero *Protium* para investigação científica, tendo como principais objetivos, a identificação dos constituintes da cera cuticular, a quantificação de metabólitos secundários da casca e do lenho e a análise dos constituintes voláteis. Os estudos fitoquímicos foram realizados com as folhas, a casca do lenho e o lenho da espécie *P. leptostaschyum* Cuatrec., e óleo essencial da resina do *P. hebetatum* Daly. Além desses estudos foram realizados testes antimicrobianos em cepas do *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Streptococcus pneumoniai* do laboratório de microbiologia da Universidade Federal do Acre.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Composição Química da Cera Cuticular, Propriedades Biológicas e Biossínteses

O corpo dos vegetais é constituído por órgãos vegetativos formados por raiz, caule e folhas e pelos órgãos reprodutores como a flor, fruto e sementes. Os tecidos que compõem, em particular, os órgãos vegetativos das plantas, realizam vários tipos de interações e cada um deles desempenha funções específicas (TAFOLLA-ARELLANO, 2013).

A raiz é o órgão responsável pela fixação da planta ao solo, como também a absorção da água e sais minerais; nutrientes necessários a sobrevivência da planta. O caule, assim como a raiz, são os responsáveis pelo crescimento da espécie. Entretanto, o caule se diferencia pelo fato de apresentar uma organização mais complexa, sendo o responsável pela fixação dos apêndices laterais, tais como: ramos, folhas e os órgãos reprodutivos. Neste sentido, o caule torna-se o principal elemento responsável pela formação da estrutura física da planta onde se agrega as raízes, ramos e folhas. Tem o papel de desempenhar função de condução da água e de sais minerais (seiva bruta) da raiz a folha, como também a condução da matéria orgânica da folha para a raiz (seiva elaborada) (APPEZZATO-DA-GLÓRIA; CARMELLO-GUERREIRO, 2006).

A folha, assim como a raiz e o caule, apresenta em sua estrutura primária os três sistemas de tecido, que compõem os órgãos das plantas. O sistema dérmico ou epiderme, o sistema fundamental denominado de mesofilo e o sistema vascular constituído pelo xilema e o floema. O sistema dérmico ou epidérmico representa o tecido, geralmente de uma só camada de células, que reveste os órgãos vegetais. O sistema fundamental ou mesofilo é o tecido localizado entre as duas faces da epiderme, superior ou adaxial e inferior ou abaxial, de uma folha e o sistema vascular ocorre na superfície da lâmina da folha (limbo) denominada de nervuras (MAGALHÃES et al., 2010) (Figura 1A, Pág. 18).

A folha é um apêndice caulinar presente em todas as espécies de vegetais superiores, com raras exceções em algumas espécies de vegetais da família Eupobiaceas e Cactaceae (MAGALHÃES et al., 2010).

A folha completa é constituída de três partes: o limbo ou lâmina foliar adaptada a captação de luz e gás carbônico (CO₂), o pecíolo representado pela parte mais alongada e cilíndrica onde se une o limbo ao caule, geralmente na parte inferior, mas pode ocorrer a formação do pecíolo no meio da folha e a bainha, também denominada base, sendo a porção terminal do pecíolo que se une ao caule. Algumas folhas apresentam as estruturas laminares bem desenvolvidas denominadas estípulas, que se encontram na base do pecíolo, ligadas ao caule (Figura1B).

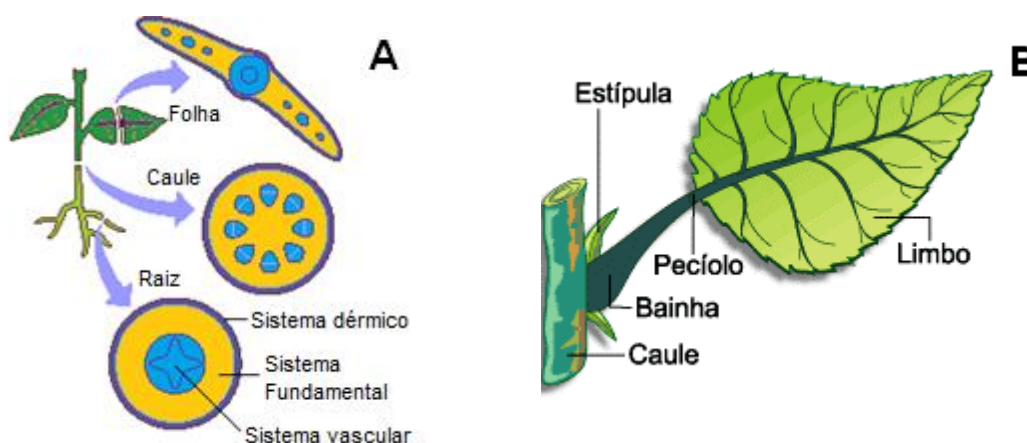


Figura 1 – Estrutura primária dos órgãos da planta e morfologia externa da folha (ENCINA, 2015).

A folha apresenta duas faces, que são recobertas pela epiderme, caracterizada como face adaxial, parte superior da folha e a face abaxial, parte inferior. As duas faces estão recobertas por uma fina membrana lipídica denominada cutícula (PIGHIN et al., 2004). A cutícula está relacionada com a evolução das plantas superiores e, representa uma estrutura de essencial importância funcional e ecológica. Como a cutícula representa a parte mais externa das células vegetais, que está em contato com o meio ambiente, tem como o objetivo fundamental de proteção com o meio externo em torno da planta (TAFOLLA-ARELLANO, 2013).

A composição química da estrutura da cutícula varia muito entre as espécies vegetais, tipo de órgão e estado de desenvolvimento. Contudo, todas as cutículas são constituídas de dois tipos de materiais lipofílicos denominados cutina e cera cuticulares (TAFOLLA-ARELLANO, 2013).

Do ponto de vista morfológica de uma folha pode-se observar a formação de uma fina camada mais externa constituída de material lipofílico cobrindo a camada de células da cutícula chamada de cera epicuticular (TAFOLLA-ARELLANO, 2013). Na camada inferior da cera epicuticular encontra-se outra capa denominada cutina e cera que se entrelaçam com substância formadora da parede celular, formando uma estrutura que é denominada camada cuticular (Figura 2).

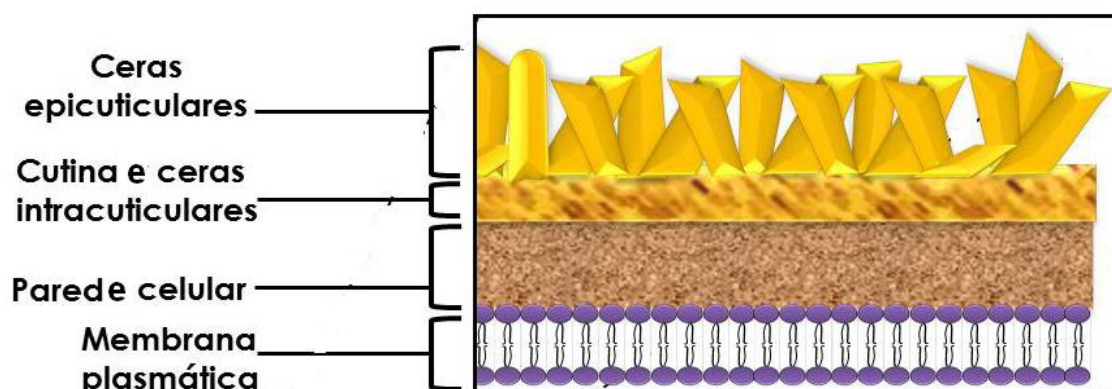


Figura 2 – Estrutura morfológica da cutícula em relação à camada de cera epicuticular (TAFOLLA-ARELLANO, 2013).

A constituição química da cera epicuticular é principalmente de série homóloga de n-alcenos de cadeias longas, álcoois, cetonas e ésteres. Além desses compostos, também estão presentes triterpenos pentacíclicos, esteroides e flavonoides embora em pequena proporção (BAKKER; ALVARADO, 2006). Também foram encontrados na cera cuticular da espécie *Cocos mucifera*, outros, como os cicloartanos da classe de triterpenos tetracíclicos além do lupeol da classe dos triterpenos (ARROYO-SERRATA et al. 2012). Também foram encontrados outros grupos de compostos como: ácidos graxos, ésteres, álcoois e aldeídos em outras espécies vegetais (VRKOSLAV et al., 2010).

2.2 Constituintes Químicos da Cera Cuticular da Família Burseraceae

A família Burseraceae é constituída por táxons distribuídas em 18 gêneros com aproximadamente 700 espécies que estão divididas em 3 tribus: Bursereae, Canarieae e Protieae (WEEKS et al., 2005). A região amazônica se caracteriza por apresentar uma vasta quantidade de espécies da família, principalmente do gênero

Protium. As espécies da família têm como característica principal a produção de uma resina que é exsudada quando a planta sofre algum tipo de estresse. A resina é constituída basicamente de triterpenos e óleo essencial (MARQUES et al., 2010a, 2010b). As pesquisas realizadas com as espécies da família Burseraceae estão predominantemente relacionadas com a investigação fitoquímica da resina, principalmente com relação ao isolamento e identificação estrutural dos constituintes químicos da resina e também do óleo essencial.

Os trabalhos realizados na identificação da composição química da cera cuticular das folhas, das espécies da família Burseraceae, são restritos e, neste sentido, foi realizado um levantamento dos estudos fitoquímicos sobre a composição química da cera cuticular da família Burseraceae. A pesquisa bibliográfica foi realizada nos bancos de dados ScienceDirect, Scielo e Periódicos da CAPES utilizando as palavras chaves: Burseraceae, cera cuticular e epicuticular, registrando os trabalhos contidos nestes bancos bibliográficos.

O trabalho realizado por Proksch et al., (1981) relataram a composição química da cera epicuticular das folhas de várias espécies, coletadas no deserto de Vizcaino. Entre elas, a espécie *Bursera microphyll* A. Gray (Burseraceae). Os autores identificaram 13 alcanos de cadeia linear de C_{23} – C_{35} , sendo o nonacosano (C_{29}) e o untriacotano (C_{31}), os alcanos que apresentaram maior proporção 28,9% e 54,1%, respectivamente, da massa total de alcanos identificados (Tabela 1, Pág. 23). Os autores extraíram a cera usando amostras de folhas submersas em éter etílico por 60 segundos. A identificação dos constituintes foi realizada usando técnica de cromatografia gás-líquido (CGL), sendo confirmada a composição química da cera utilizando um padrão de alcanos.

Abas et al., (1995) realizaram um trabalho de identificação da composição química da matéria orgânica de maior peso molecular proveniente da combustão da biomassa amazônica. A área utilizada pelos pesquisadores estava localizada no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). A mata era constituída pelas seguintes espécies *Protium heptaphyllum* (Burseraceae), *Ingaedulis* (Caesalpinoidea), *Theobroma grandiflorum* (Malvaceae). Foram identificadas na fumaça, partículas lipídicas, que segundo os autores são derivadas diretamente da cera vegetal. Os compostos identificados foram alcanos de cadeias linear de C_{18} – C_{37} , contudo, sem mencionar quais foram as estruturas dos alcanos. Além desses

compostos, foram também identificados triterpenos pentacíclicos e esteroides, não podendo, entretanto afirmar que tais compostos são oriundos apenas da cera cuticular da espécie *Protium heptaphyllum* (Burseraceae). Os autores extraíram os compostos lipídicos usando filtros submersos em diclorometano por 15 minutos. A identificação dos constituintes foi realizada usando técnica de cromatografia a gás acoplada a um espectrômetro de massa (CG/EM) confirmando a composição química da fração lipídica com padrão de alcanos.

O trabalho realizado por Siani et al., (2004) relatou a composição química da cera epicuticular da folha do *Protium icicariba*, coletadas no litoral de Carapebus em uma região de mata atlântica, na cidade do Rio de Janeiro, Brasil. Os autores identificaram 11 alcanos de cadeia linear de $C_{14} - C_{18}$, C_{27} , C_{29} , $C_{30} - C_{33}$, sendo o nonacosano (C_{29}) e o hentriacontano (C_{31}), os alcanos mais abundantes (Tabela 1, Pág. 23). Os autores extraíram a cera usando amostras de folhas submersas em 100 mL de hexano por 3 minutos. A identificação dos constituintes foi realizada usando técnica de cromatografia gasosa de alta resolução, acoplado a um espectrômetro de massa (HRCG/MS). A confirmação da composição química da cera foi estabelecida com padrão de alcanos.

Estudo químico realizado por Marques (2010c) apresentou a composição química da cera epicuticular da folha do *Protium hebetatum*, coletado no município de Cruzeiro do Sul, Acre, Brasil. O autor identificou 3 alcanos de cadeia linear identificados como sendo o heptacosano (C_{27}), hentriacontano (C_{31}) e tritriacontano (C_{33}). Além desses alcanos lineares, o autor também identificou 8 ésteres etílicos: dodecanoato de etila, tetradecanoato de etila, pentadecanoato de etila, hexadecanoato de etila, heptadecanoato de etila, 9-hexadecenoato de etila, octadecanoato de etila, eicosanoato de etila, sendo identificado como constituinte principal o hexadecanoato de etila. A cera foi extraída usando amostras de folhas submetidas a extração por maceração a frio em hexano. O extrato hexânico foi fracionado usando éter de petróleo, e após sucessivas cromatografias em coluna, empacotada com gel de sílica, e permitiu o isolamento da mistura dos ésteres supra mencionados. A identificação dos constituintes foi realizada usando técnica de cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massa (CG-EM). A confirmação da composição química da cera foi realizada a partir da presença do pico do íon molecular, o pico base e a comparação visual, levando-se em conta o

padrão de fragmentação característico de ésteres, com espectros de massa descritos na literatura.

Com relação aos constituintes identificados na cera cuticular das espécies da família Burseraceae apenas na espécie *Protium hebetatum* foram identificados ésteres etílicos. Na espécie *Protium icicariba* (SIANI et al., 2004) foram identificados também quatro triterpeno, α -amirina, β -amirina, lupen-3-ona e friedelano. Os triterpenos α -amirina e β -amirina também foram identificados na espécie *Protium hebetatum* (Tabela 1, Pág. 23).

Tabela 1 – Metabólitos da cera cuticular de espécies da família Burceraceae.

Constituintes Químicos	B.M.	P.H.	P.I.	P.HB.
Tetradecano (C ₁₄)	-	-	c.i	-
Pentadecano(C ₁₅)	-	-	c.i	-
Hexadecano (C ₁₆)	-	-	c.i	-
Heptadecano (C ₁₇)	-	-	c.i	-
Octadecano (C ₁₈)	-	-	c.i	-
Tricosano (C ₂₃)	+	-	-	-
Tetracosano (C ₂₄)	+	-	-	-
Pentacosano (C ₂₅)	+	-	-	-
Hexacosano (C ₂₆)	+	-	-	-
Heptacosano (C ₂₇)	4,70%	-	c.i	6,97%
Octacosano (C ₂₈)	+	-	-	-
Nonacosano (C ₂₉)	23,15%	-	c.i	-
Triacotano(C ₃₀)	1,90%	-	c.i	-
Hentriacotano (C ₃₁)	54,10%	-	c.i	63,24%
Dotriacotano(C ₃₂)	1,9%	-	c.i	-
Tritriacotano (C ₃₃)	8,5%	-	-	30,04%
Tetratriacotano (C ₃₄)	+	-	-	-
Pentatriacotano (C ₃₅)	+	-	-	-
6,10,14-trimetilpentadecan2-ona	-	c.i.	-	-
α-Copaeno	-	-	c.i	3,79%
β-Cariofileno	-	-	c.i	-
γ-Elemeno	-	-	c.i	-
Germacreno D	-	-	c.i	-
Biciclogermacreno	-	-	c.i	-
δ-Cadineno	-	-	c.i	-
β-Copaen-4α-ol	-	-	c.i	-
Guaiol	-	-	c.i	-
1-metil-pentadecanoato de metila	-	-	c.i	-
β-Selineno	-	-	c.i	1,83%
α-Amirina	-	c.i.	c.i	+
β- Amirina	-	c.i.	c.i	+
Lupenone	-	-	c.i	-
Friedelina	-	c.i.	c.i	-
α-Amerinona	-	c.i.	-	-
β-Amerinons	-	c.i.	-	-
β-Sitosterol	-	c.i.	-	-
Dodecanoato de etila(C ₁₂)	-	-	-	2,47%
Tetradecanoato de etila (C ₁₄)	-	-	-	3,15%
Pentadecanoato de etila(C ₁₅)	-	-	-	3,95%
Hexadecanoato de etila(C ₁₆)	-	-	-	64,33%
Heptadecanoatode etila(C ₁₇)	-	-	-	3,32%
9-hexadecenoato de etila(C _{16:1})	-	-	-	2,92%
Octadecanoato de etila(C ₁₈)	-	-	-	17,87%
Eicosonoato de etila(C ₂₀)	-	-	-	1,99%

Legenda: + = ≤ 0,1; c.i. = constituinte identificados; - = não identificado; B.M. = *Bursera microphylla*; P.H. = *Protium heptaphyllum*; P.I. = *Protium icicariba*, P.HB. = *Protium hebetatum*.

2.3 Função da Cera Cuticular nas Folhas da Planta

O estudo da composição química da cera cuticular das partes aéreas dos vegetais se justifica em função das várias funções biológicas, físicas e químicas desenvolvidas por seus constituintes químicos. Como anteriormente apresentado, a cera epicuticular é a camada mais externa dos órgãos aéreos dos vegetais. A composição química que reveste as partes aéreas da planta é muito variada, sendo de um lado a cutina normalmente constituída de poliésteres insolúveis que se encontram entrelaçados entre os ácidos graxos de cadeias longas que os compõem. Por outro lado, a cera pode estar também entrelaçada no interior da cutícula ou na parte exterior da cutícula, formando a cera epicuticular (TAFOLLA-ARELLANO, 2013).

Segundo Herodia (2003), dentre as principais funções fisiológicas da cera vegetal pode-se mencionar: reduzir a perda descontrolada de água e nutrientes, constituir uma barreira mecânica que impede a penetração de hifas de fungos e ataque de insetos, proteger os tecidos de possíveis danos mecânicos, refletir e acumular a radiação ultravioleta, atuar como compartimento estanque de compostos lipofílicos, servir como meio de percepção por insetos e micróbios, dos sinais químicos emitidos pela planta, ser habitat para microrganismos que vivem na superfície das folhas. No fim do século XX, Dominguez e Heredia, (1998) publicaram um trabalho intitulado “Ceras: um tema esquecido no ensino lipídico” (em uma tradução livre). Os autores chamaram a atenção da importância do estudo da cera cuticular dos vegetais para diversas áreas, bioquímica, química, etc., incluindo também a biotecnologia.

Muitos pesquisadores trabalham numa perspectiva de se estabelecer uma identificação botânica, levando em consideração a composição química das plantas, denominada de quimiotaxonômica. Neste sentido, pesquisadores têm salientado a importância taxonômica do estudo das ceras epicuticulares (BAKKER; ALVARADO 2006).

A cera representa um importante papel, sendo a primeira barreira protetora entre a planta e o meio exterior, destacando sua ação protetora contra agentes patógenos, radiações solares e a entrada de produtos químicos e contaminantes (GUIMARÃES et al., 2009). Estudos realizados por esses autores, com espécies de

azavém, uma planta daninha presente nas culturas anuais e perenes cultivadas nas regiões brasileira. Esta espécie é normalmente combatida com o herbicida glifosato (Figura 3), que além de sua toxicidade, é prejudicial ao meio ambiente. Apesar da facilidade de combater essa espécie, algum biótipo tem mostrado resistência ao herbicida. Os estudos revelaram que a composição química da cera epicuticular do biótipo resistente apresentou menor proporção de compostos polares, dificultando a penetração do herbicida, que tem característica de um composto com alta polaridade.

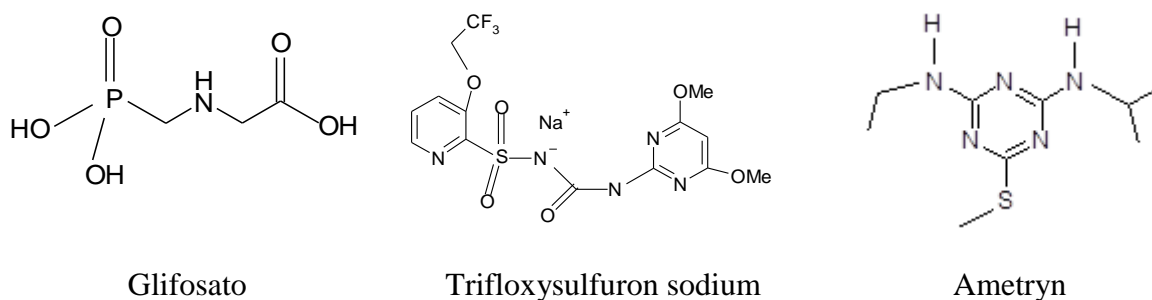


Figura 3 – Herbicida usado no controle de praga daninha em culturas perenes ou anuais.

Estudo semelhante foi realizado por Cunha et al., (2014) com outras espécies de plantas daninhas do gênero *Sida* que mostraram também resistência aos herbicidas. Os estudos mostraram que a composição química da cera epicuticular das espécies do gênero *Sida* é variável conforme a idade da folha e que pode estar influenciando no uso de herbicida. Outra pesquisa realizada por Viana et al., (2010) em plantio de eucalipto, também mostrou que o uso do herbicida glifosato no combate às ervas daninhas prejudicava o desenvolvimentos dessa cultura. Segundo os autores, a cera cuticular da folha de eucalipto absorve o herbicida prejudicando o desenvolvimento da planta. Ao mesmo tempo, os autores recomendaram novos estudos para o uso de herbicida no controle de ervas daninhas em plantio de eucalipto.

Ferreira et al. (2005) estudando a composição química de várias cultivares de cana-de-açúcar, observaram diferença na composição química da cera epicuticular entre as plantas. Segundo os autores, algumas dessas cultivares mostraram-se mais sensíveis a mistura de herbicida formada por trifloxysulfuron sodium e ametryn (Figura 3), herbicidas usados na cultura de cana-de-açúcar para combater ervas

daninhas. Segundo os autores, a sensibilidade está relacionada com o poder da interação química intermolecular da cera epicuticular com os herbicidas.

Em muitas espécies vegetais ocorre a formação de elaborados cristais na cera epicuticulares que auxiliam na autolimpeza da superfície foliar, removendo poeira e outras partículas sólidas, além de atuarem como refletores do excesso de radiação ultravioleta, auxiliando no desenvolvimento da planta e estabelecendo limites físicos dos órgãos (YEATS; ROSE, 2013).

Pesquisas realizadas, na tentativa de se reproduzir essa superfície foliar com propriedades de autolimpeza, foram desenvolvidas com a geração de superfícies micro e nanoestruturas de metal com propriedades de autolimpeza altamente eficientes, comparável ao modelo natural dos vegetais (BARGEL et al., 2006 Apud FURSTNER et al., 2005).

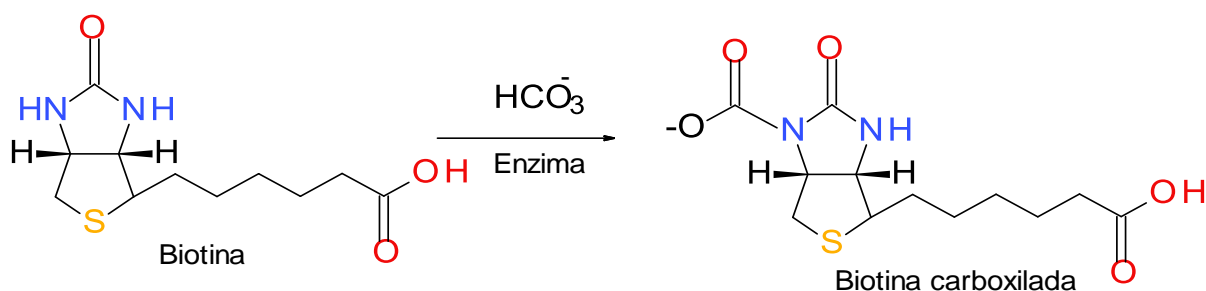
As várias propriedades que a cera cuticular desenvolve na folha, conforme Herodia (2003), Bargel et al., (2006) Yeats e Rose (2013) são representadas pelas seguintes funções de: Constituir a barreira mecânica impedindo a perda de água e nutrientes; Repelir a água promovendo uma autolimpeza evitando entre outros fatores o desenvolvimento de patógenos e de fungos parasitários; Impedir fixação e locomoção de insetos, atuando como antiadesivo; Emitir sinais químicos como meio de percepção de insetos e micróbios. Atuar como proteção a radiação ultravioleta; Ampliar a resistência contra estresses mecânica.

2.4 Rota Biossintética de Formação da Cera Cuticular

Por definição, cera cuticular representa uma mistura complexa de compostos orgânicos hidrofóbicos que são extraídos da superfície da folha por uma breve imersão em solvente orgânico apolar como clorofórmio, diclorometano ou hexano. Esta mistura complexa é constituída de compostos orgânicos de cadeia longa de várias funções, sendo as principais: hidrocarbonetos, ácidos graxos, álcoois, aldeídos, cetonas, ésteres, triterpenos, esteroides e flavonoides (POST-BIETTENMILLER, 1996). Como a composição química da cera apresenta uma grande diversificação de metabólitos secundários, será apresentado à biossíntese da cera cuticular será a dos metabólitos das classes dos ácidos graxos.

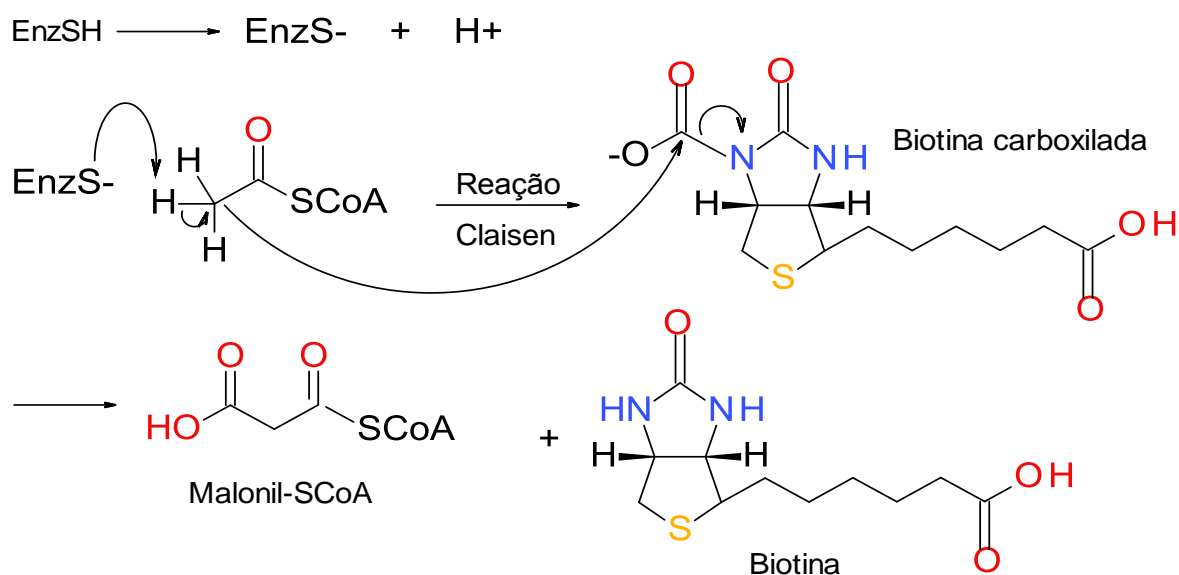
A biossíntese de metabólitos secundários é coordenada por ação de um grande número de enzimas que catalisam as reações levando ao alongamento da cadeia do precursor da cera de ácidos graxos a uma multiplicidade de compostos alifáticos. A formação dos lipídios cuticulares tem como precursor os ácidos graxos de cadeias C₁₆ e C₁₈, que são sintetizados em leucoplasto encontrados na epiderme. A formação destes ácidos graxos tem como constituinte fundamental, o ácido acético, rota do ácido acético, na forma do acetil-coenzima A (Ac-SCoA) (DEWICK, 2004).

O processo da biossíntese depende fundamentalmente da biotina carboxilada originada de uma reação de carboxilação com bicarbonato (HCO₃⁻) catalisado por uma enzima carboxilase com a biotina (Esquema1). (LOBO, LOURENÇO, 2007). A reação típica de adição do nitrogênio ao carbono sp² do bicarbonato, com uma eliminação de água.



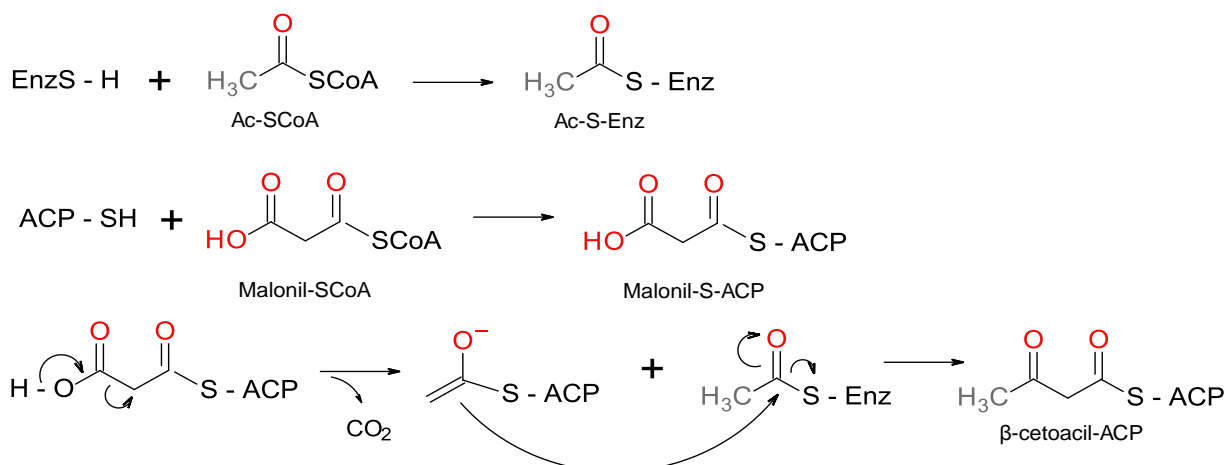
Esquema 1 – Proposta de reação de carboxilação da biotina, formando a biotina carboxilada.

O ácido acético sob a forma de acetil-coenzima A (Ac-SCoA) na presença da biotina carboxilada e catalisada com enzimas (EnzSH) através de uma reação análoga a condensação de Claisen, forma o precursor da rota de biossíntese dos ácidos graxos formando o malonil-coenzima A (malonil-CoA), através de uma reação de carboxilação (Esquema 2, Pág. 28) (DEWICK, 2004).



Esquema 2 – Proposta de formação do malonil-coenzima A (malonil-S-CoA) através da reação do tipo de condensação de Claisen.

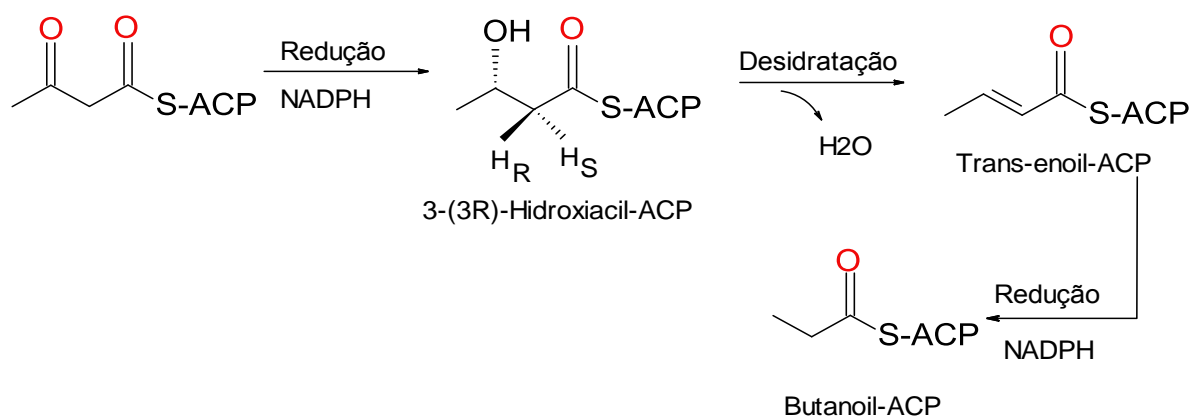
O acetil-coenzima A (Ac-S-CoA) e o malonil-coenzima A (malonil-S-CoA) são convertidos em outros tioésteres ligados a enzimas, o tioéster do malonil é formado na presença da proteína transportadora do grupo acil (ACP). Estes são condensados em uma reação do tipo Claisen com uma descarboxilação prévia, formando o β -cetoacil-ACP (Esquema3).



Esquema 3 – Proposta de formação do β -cetoacil-ACP através da reação de descarboxilação e condensação.

A etapa de alongamento da cadeia carbônica ocorre com várias reações repetidas, portanto em um sistema cíclico. Inicialmente, o β -cetoacil-ACP sofre uma

reação de redução do grupo carbonila C-3, através de uma reação estereosseletiva pela face-ré, catalisada pelo fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NADPH) levando a formação do 3-(3R)-hidroxiacil-ACP (Esquema 4).



Esquema 4 – Proposta de formação do butanoil-ACP com a condensação de outro β-cetoacil-ACP.

A adição *sin* é catalisada pela enzima β-hidroxiacil-CoA desidratase, com propriedades esteroespecíficas pró-S (H_S), gerando a *trans*-enoil-ACP, uma cadeia α,β-insaturada tioester. Através da atuação da enzima enoil-ACP redutase ocorre uma reação de redução do *trans*-enoil-ACP, também catalisada pelo fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NADPH), levando a formação do butanoil-ACP, uma cadeia de quatro átomos de carbono.

Este complexo de reação forma, portanto o sistema cíclico. O β-cetoheptanoil-ACP reentra no ciclo de alongamento, que se repete por várias vezes o ciclo, inicialmente com as reações de descarboxilação do malonil-ACP com a consequente condensação do butanoil-ACP, até a formação do ácido graxo com C₁₆ (ácido palmítico) e C₁₈ (ácido esteárico) (YATS, ROSE, 2013).

Os compostos constituídos de cadeia longas, tais como alcanos, álcoois, cetonas e aldeídos são derivados dos ácidos graxo C₁₆ e C₁₈ através de reações enzimáticas específicas de descarboxilação e oxidação (POST-BEITTERNMILLER, 1996, LI et al. 2008). Uma grande quantidade de ácidos gordos de cadeia longa, que pode variar de C₈ a C₃₄, são encontradas na cera cuticular. Estes compostos são também originados pela rota do ácido acético e diversos compostos de cadeia similares são derivados desses ácidos graxos, seja por reação de descarboxilação, formando alcanos de cadeia longas ou por reações de redução formando álcoois (LI; BEISSON, 2009; LI et al., 2008).

3 MATERIAL E METODOS

3.1 Coleta do Material Botânico

As amostras das folhas (2,28 kg) e do lenho (10,26 kg) da espécie *Protium leptostachyum* Cuatrec. e da resina (367,43 g) da espécie *Protium hebetatum* Daly foram coletadas no município de Mâncio Lima, Estado do Acre, Brasil ao longo da BR-307 em setembro de 2014, em período chuvoso.

As exsicatas foram obtidas *in loco* e registradas, para a espécie *Protium leptostachyum* Cuatrec. No Laboratório de Botânica e Ecologia Vegetal (LBEV) e para *Protium hebetatum* Daly no Parque Zoobotânico (PZ), ambos da Universidade Federal do Acre (UFAC) (Tabela 2), sendo as espécies identificadas por um especialista, professor PhD. Douglas C. Daly, curador do Jardim Botânico de Nova Iorque.

Tabela 2 – Coordenadas geográficas e registro das espécies coletadas.

Espécies	Latitude Sul	Longitude Oeste	Nº Registro
<i>Protium leptostachyum</i> Cuatrec. (PLC)	7° 28' 51"	72° 53' 58"	6.648
<i>Protium hebetatum</i> Daly (PHD)	7° 28' 51"	72° 54' 20"	18.374

3.2 Determinação da Área Foliar

No momento da coleta do material botânico, foram aleatoriamente separadas as amostras foliares da espécie *Protium leptostachyum*. Foram designados três grupos, identificados como: lote 1, lote 2 e lote 3, sendo cada lote constituído de seis folhas, cada. As amostras foliares foram fotografadas individualmente ao lado de uma régua, para ser utilizada como escala de medida conhecida, a fim de se determinar a área foliar total, calculada através do software *ImageJ* 1.49 (CORDEIRO et al., 2011).

3.3 Obtenção da Cera Cuticular

A extração da cera foliar foi realizada conforme Cordeiro et al., (2011) e Viana et al., (2010) com pequenas modificações. As seis folhas de cada lote foram imersas em uma placa de Petri contendo 150 mL de diclorometano (CH_2Cl_2) por 30 segundos, com agitação suave, para que não ocorresse rompimento das folhas. Os extratos obtidos foram filtrados e evaporados sob pressão reduzida, usando evaporador rotativo. O material seco foi transferido, usando diclorometano, para um frasco de peso conhecido, sendo o mesmo evaporado à temperatura ambiente. O quantitativo de cera foi expresso por unidade de área foliar ($\mu\text{g cm}^{-2}$). O resultado final foi expresso, pela média aritmética obtida dos três lotes.

3.4 Processamento do Material Vegetal

As amostras de folhas, cascas da madeira e o lenho descascado da espécie *Protium leptostachyum* foram secas em estufa de circulação de ar forçado por 72 horas à 40°C. Posteriormente, as amostras secas de folhas (1,31 kg) e das cascas (1,28 kg) foram trituradas em moinho de aço inox na Unidade de Tecnologia de Alimento (UTAL) da UFAC. A madeira (1,23 kg) foi fatiada no Polo Moveleiro da cidade de Rio Branco, sendo em seguida triturada em moinho de martelo do tipo moageiro na UTAL.

3.5 Obtenção dos Extratos

As amostras trituradas foram submetidas à extração por maceração a quente usando inicialmente hexano (C_6H_{14}), e posteriormente foi extraído por maceração a temperatura ambiente usando o etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$), durante 72 horas. O processo foi realizado em triplicata e as soluções resultantes foram concentradas em rotaevaporador, sob pressão reduzida. As massas dos extratos estão expressas na tabela 3, pág. 32.

Tabela 3 – Massa dos extratos obtidos da espécie *Protium leptostachyum*.

Extratos	Amostras		
	Folhas (g)	Cascas (g)	Lenho (g)
Hexano	18,9654	20,5111	0,9376
Etanol	34,3590	86,0049	10,6930

3.6 Obtenção do Óleo Essencial

O óleo essencial foi obtido pelo método de hidrodestilação com aparelho tipo Clevenger modificado (Figura 4). A resina (367,43 g) da espécie *Protium hebetatum* foi imerso em 1000 mL de água destilada, aquecido até a fervura, por um período de aproximadamente 4 horas.

O rendimento porcentual do óleo essencial foi determinado com relação ao volume de óleo extraído e a massa de resina (v/m).



Figura 4 – Aparelho extrator de óleo essencial tipo Clevenger modificado.

3.7 Análise Cromatográfica

3.7.1 Preparação de Cromatoplasmas

As cromatoplasmas qualitativas foram preparadas no laboratório de Química e Biodiesel da UFAC, obedecendo à relação de 1:3 m/v de sílica gel 60 G, para cromatografia em camada delgada (CCD) em água destilada (Figura 5). As placas foram ativadas em estufa a 105°C por 30 minutos. As revelações das cromatoplasmas foram realizadas com vapores de iodo ressublimado.

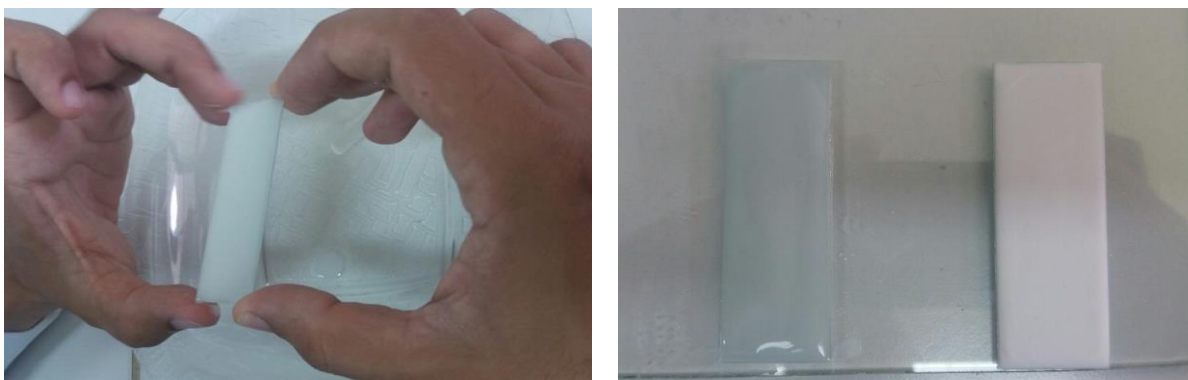


Figura 5 – Confeção das cromatoplasmas qualitativas.

3.7.2 Cromatografia Clássica Filtrante

O extrato hexânico (18,9654 g) da folha foi adicionado a 70 g sílica gel 60 de 70-230 mesh e acondicionado em um funil de buchner, contendo papel filtro. A cromatografia filtrante foi realizada sob pressão reduzida, utilizando 500 mL de solventes em ordem crescente de polaridade: éter de petróleo (misturas de alcanos), diclorometano (CH_2Cl_2), etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$).

3.7.3 Cromatografia em Coluna Clássica

Uma amostra da fração éter de petróleo (FEP = 4,2711 g) e da diclorometano (FDM = 7,6948 g) foram submetidas ao processo de separação em coluna

cromatográfica de diâmetro versus comprimento de 3x60 cm empacotada com 65 g de sílica gel 60 de 35-70 mesh. As colunas cromatográficas foram eluídas com gradiente de polaridade crescente de solventes orgânicos: hexano, diclorometano e acetato de etila.

3.7.4 Cromatografia Gás-Líquido Acoplado a Espectrômetro de Massa (CGL/EM)

As amostras cromatográficas das frações do extrato éter de petróleo da folha FEP1-2; FEP3-8; FEP9-20 da espécie *Protium leptostachyum*; do óleo essencial da espécie *Protium hebetatum* foram realizadas no Instituto de Análise Forense (IAF) do Departamento de Polícia Técnico Científica da Polícia Civil do Estado do Acre, em aparelho CGL/EM, modelo 5975C da Agilent Technologies. Foi utilizado coluna capilar HP-5MS (30 m x 0,25 mm de diâmetro interno x filme de 0,25 µm) e o hélio (He) como gás de arraste, em modo splitless. A temperatura do injetor foi de 290°C, em programação de gradiente com temperatura inicial de 80°C, por 5 minutos, aumentando 4°C min⁻¹ até 285°C, permanecendo por 40 minutos. A temperatura do detector e da interface do sistema CGL/EM foi de 290°C. O detector de massas operou com ionização por impacto de elétrons a 70 eV. Os espectros foram registrados fazendo uma varredura de massas de 30 a 600 Dalton.

As amostras do extrato diclorometano da folha da espécie *Protium leptostachyum* FDM1; FDM11-21; FDM22-34; FDM35-59; FDM60-72; foram analisadas no Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará, em aparelho CGL/EM, modelo QP5050 da Shimadzu. Foi utilizada coluna capilar DB-5 (30 m x 0,25 mm de diâmetro interno x filme de 0,25 µm) e hélio (He) como gás de arraste em modo split 1:27. A temperatura do injetor foi de 290°C, com temperatura inicial de 80°C, por 5 minutos, aumentando 4°C min⁻¹ de 80 a 285°C, permanecendo por 40 minutos.

A quantidade injetada foi de 1 µL de cada amostra, e a identificação dos compostos registrados conformes os cromatogramas foram feita por meio de comparação direta dos espectros de massas das amostras registradas com aquelas existentes na biblioteca W9N11 e NIST08.LIB do banco de dados dos equipamentos e por meio de comparação visual com os espectros de massa publicados na literatura

(ADANS, 2007) e no banco de dados do National Institute of Standards and Technology (NIST, 2010).

3.8 Espectrometria do Infravermelho

Os espectros na região do infravermelho das amostras FDM1; FDM11-21; FDM22-34; FDM35-59; FDM60-72 e FEP1-2 da espécie *Protium leptostachyum* foram realizadas no Instituto de Análise Forense (IAF) do Departamento de Polícia Técnico Científica da Polícia Civil do Estado do Acre, em um espectrômetro de infravermelho FT-IR/NIR Spectrometer Perkin, com acessório de refletância total atenuada horizontal empregando um cristal de seleneto de zinco (ZnSe).

3.9 Prospecção Fitoquímica Qualitativa

Os extratos etanol brutos da casca e do lenho da espécie *Protium leptostachyum* foram submetidos a ensaios de pesquisa qualitativa de metabolismo secundários da espécie. As técnicas foram realizadas conforme descrito por Matos (1997) e Barbosa (2001).

3.9.1 Pesquisa de Flavonoides

Reação de Shinoda: Foi transferido para um tubo de ensaio cerca de 3 mL do extrato a ser analisado. Em seguida, foram adicionados seis pequenos pedaços de fragmentos de magnésio (Mg) metálico e, adicionado 1 mL de ácido clorídrico (HCl) concentrado. O desenvolvimento de coloração rósea avermelhada indica presença de flavonoides (BARBOSA, 2001).

3.9.2 Pesquisa de Taninos

Reação com Cloreto Férrico: Foi transferido para um tubo de ensaio 3 mL do extrato a ser pesquisado. Em seguida, foram adicionadas de 2 a 3 gotas de solução de cloreto férrico (FeCl_3) a 2% (m/v). Foi realizado um branco usando água destilada e o cloreto férrico para comparação. A formação de coloração azul indica taninos hidrolisáveis ou gálicos e a formação de coloração verde indica presença de taninos condensados, protocianidinas ou catéquicos (MATOS, 1997; BARBOSA, 2001).

3.9.3 Pesquisa de Saponinas

Teste de Espuma: Foram transferidos para um tubo de ensaio 3 mL do extrato a ser analisado. Em seguida, foram adicionados 15 mL de água destilada, agitando vigorosamente durante 2 minutos com o tubo de ensaio fechado. A formação de uma camada de espuma, permanecendo estável por mais de 30 minutos indica presença de saponina (MATOS, 1997; BARBOSA, 2001).

Teste de Confirmação de Saponinas: Ao mesmo tubo anteriormente usado foram adicionados 2 mL de ácido clorídrico (HCl) concentrado ao conteúdo do tubo de ensaio do teste anterior de saponinas. A amostra acidificada permaneceu imersa em banho-maria por 60 minutos. Em seguida, a amostra foi retirada neutralizada com hidróxido de sódio (NaOH) 6 M, usando gota a gota, até pH neutro. A presença de precipitado e a não formação de espuma confirma a presença de saponinas.

3.9.4 Pesquisa de Catequinas

Reação com Vanilina: Foram transferidos 3 mL do extrato a ser analisado para um tubo de ensaio. Em seguida, foi adicionado 1 mL da solução aquosa de vanilina ($\text{C}_6\text{H}_3\text{CHO}(\text{OCH}_3)\text{OH}$) a 1% (m/v) e 1 mL de ácido clorídrico (HCl) concentrado. A formação de coloração vermelha indica a presença de catequinas (MATOS, 1997; BARBOSA, 2001).

3.9.5 Pesquisa de Ácidos Orgânicos Livres

Reação de Pascová: Foram transferidos para um tubo de ensaio 3 mL de solução a ser analisada. Posteriormente, foram adicionados 2 a 3 gotas do reativo de Pascová. O reativo foi preparado no momento do ensaio com 9 gotas do reativo Pascová A e depois uma gota do reativo de Pascová B. A mistura é estável somente por 5 a 10 minutos. A descoloração do reativo de Pascová indica a presença de ácido orgânico livre (BARBOSA, 2001).

Reativo Pascová A: Foram dissolvidos 0,075g de verde de bromocresol ($C_{21}H_{14}Br_4O_5S$) mais 0,25 g de azul de bromofenol ($C_{19}H_{10}Br_4O_5S$) em etanol até 100 mL de solução.

Reativo Pascová B: Foram dissolvidos 0,25 g de permanganato de potássio ($KMnO_4$) mais 0,25 g de carbonato de sódio (Na_2CO_3) em água destilada até completar 100 mL de solução. No momento de uso para os testes, foram usados usar 9 partes da solução A para 1 parte da solução B. A mistura só é estável entre 5 a 10 minutos.

3.9.6 Pesquisa de Polissacarídeos

Reação de Lugol: Foram transferidos para um tubo de ensaio 3 mL de extrato a ser analisado. Em seguida, foram adicionados de 2 a 9 gotas do reagente lugol. Foi feito um branco usando água e o reativo de lugol. O aparecimento de coloração azul indica a presença de polissacarídeos (BARBOSA, 2001).

O reativo de Lugol: Foram dissolvidos 5 g de iodeto de potássio (KI) e 2,5 g de iodo ressublimado em 25 mL de água destilada e completado o volume para 50 mL.

3.9.7 Pesquisa de Açúcares Redutores

Reação de Fehling: Foi transferida para um tubo de ensaio uma alíquota de 3 mL de extrato a ser analisado. Em seguida, foram adicionados 2 mL de reativo

Fehling A e 2 mL de reativo Fehling B. Após a adição, foi aquecido em banho-maria e deixado em ebulição por 5 minutos. O aparecimento de um precipitado vermelho tijolo, indica presença de açúcares redutores (MATOS, 1997; BARBOSA, 2001).

3.9.8 Pesquisa de Glicosídeos Cardiotônicos

Reação de Kedde: Foi transferida uma alíquota de 3 mL do extrato a ser analisado para um tubo de ensaio. Em seguida, foram adicionadas 3 gotas do reativo Kedde A e 3 gotas do reativo de Kedde B. A formação de coloração azul ou castanho-avermelhada ou vermelho-violeta indica a presença de glicosídeos cardiotônicos (BARBOSA, 2001).

Reativo Kedde A: Foram dissolvidos 2 g de 3,5-dinitrobenzoico ($C_6H_3(NO_2)_2COOH$) em 50 mL de metanol.

Reativo de Kedde B: Foram dissolvidos 5,7 g de hidróxido de potássio (KOH) em 100 mL de metanol.

3.9.9 Pesquisa de Proteínas

Reação de Ninidrina: Foi transferida para um tubo de ensaio uma alíquota de 3 mL de extrato a ser analisado. Em seguida foi adicionado 0,5 mL de solução aquosa de Ninidrina ($C_9H_6O_4$) a 1% (m/v). Em seguida, foi aquecido até a ebulição. A formação de coloração azul-violeta persistente indica a presença de aminoácidos, com exceção de prolina e hidroxiprolina que desenvolvem cor amarela (MATOS, 1997; BARBOSA, 2001).

3.9.10 Pesquisa de Antraquinonas

Reação de Borntraeger: Foi transferido para um tubo de ensaio uma alíquota de 3 mL do extrato a ser analisado. Foram adicionados 2 mL de solução de hidróxido de amônio (NH_4OH) a 10% (v/v) ou solução aquosa de hidróxido de sódio

(NaOH) a 5% (m/v). Agitar suavemente e aguardar até 5 minutos. A formação de coloração rósea, vermelha ou violeta indica a presença de antraquinonas (MATOS, 1997; BARBOSA, 2001).

3.9.11 Pesquisa de Carotenoides

Reação com Tricloreto de Antimônio: Foram transferidos para um tubo de ensaio 5 mL do extrato a ser analisado e em banho-maria foi evaporado o solvente até a secura. Em seguida, foram dissolvidos com 3 mL de clorofórmio e adicionado 2 mL de solução saturada tricloreto de antimônio (SbCl_3) em clorofórmio. A formação de coloração azul indica a presença de carotenoides (MATOS, 1997; BARBOSA, 2001).

3.9.12 Pesquisa de Alcaloides

Para a pesquisa de alcaloides, foram dissolvidos em torno de 10 mg do extrato a ser analisado em 5 mL de solução de ácido clorídrico (HCl) a 5% (v/v). Em seguida o extrato ácido foi filtrado e separada em duas porções de 2 mL em tubos de ensaios, para realização dos ensaios.

Reação de Dragendorff: Em um tubo de ensaio foram adicionados 3 a 9 gotas do reagente de Dragendorff (iodo-bismutato de potássio). A formação de precipitado vermelho tijolo indica a presença de alcaloides (MATOS, 1997; BARBOSA, 2001).

3.9.13 Pesquisa de Depsídeos e Depsídonas

Ensaio para depsídeos e depsídonas: Foram dissolvidos em um tubo de ensaio 10 mg do extrato seco a ser analisado em 5 mL de éter etílico. Em seguida, foi filtrado e evaporado o solvente em banho-maria. O sólido residual foi dissolvido em 3 mL de metanol (CH_3OH) e adicionado 3 gotas de solução de cloreto férrico

(FeCl₃) a 1% (m/v). A formação de coloração verde, azul ou cinza indica a presença de depsídeos e depsídonas (BARBOSA, 2001).

3.9.14 Pesquisa de Esteroides e Triterpenos

Reação de Liebermann-Burchard: Foram dissolvidos em um tubo de ensaio 10 mg do extrato seco a ser analisado em 30 mL de clorofórmio. Em seguida, foi filtrado e transferido uma alíquota para outro tubo de ensaio. Foi adicionado 1 mL de anidrido acético (C₄H₆O₃) e agitado suavemente, em seguida, adicionado cuidadosamente, 3 gotas de ácido sulfúrico (H₂SO₄) concentrado. Torne a agitar suavemente. A formação de cloração azul evanescente seguida de verde persistente é indicativa da presença de esteróides livres; a formação de coloração parda até vermelha indica triterpenóides pentacíclicos livres (MATOS, 1997; BARBOSA, 2001).

3.10 Métodos Quantitativos

As análises quantitativas, fenóis e flavonoides totais foram realizadas utilizando técnicas espectrofotométricas na região do ultravioleta e visível (UV/Vis). As análises foram realizadas em espectrofotômetro UV/Vis, marca SHIMADZU, modelo UV-1650PC.

3.10.1 Preparação das Amostras Desengorduradas

As amostras da casca e do lenho foram retrituras em liquidificador e passada em peneira com a granulometria de 48 mesh. As amostras de casca (50 g) e do lenho (50 g) foram desengorduradas, utilizando extração por maceração à temperatura ambiente com hexano por 24 horas. Após a separação do extrato hexano, as amostras desengorduradas foram secas em estufa de circulação de ar forçado por 24 horas a 40°C. As amostras desengorduradas foram acondicionadas em frasco âmbar e guardadas em ambiente refrigerado.

3.10.2 Obtenção dos Extrativos para Quantificação

Para a quantificação dos fenóis e flavonoides totais foram utilizados três solventes de polaridade crescente: acetona (CH_3COCH_3), etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) e metanol (CH_3OH) para a extração dos metabólitos. O processo de extração foi realizado usando 1,0 g de cada amostra desengordurada, casca e lenho, com 20 mL de cada solvente. As 6 misturas, foram agitadas durante 30 minutos e filtradas em funil de filtro de placa porosa. As soluções resultantes foram concentradas em estufa de circulação de ar forçado a 40°C por 24 horas, sendo os extrativos desengordurados guardados em ambiente refrigerado.

3.10.3 Determinação de Composto Fenólico

O teor de compostos fenólicos foi determinada de acordo com o método descrito por Do et al., (2014) utilizando o reativo de Folin-Ciocalteu com modificações. Inicialmente foi preparada uma solução aquosa de todos os extrativos a serem analisados, na concentração de 100 ppm. Foi adicionada em um tubo de ensaio uma alíquota de 5,0 mL da solução aquosa (100 ppm), em seguida, foram adicionados 0,25 mL do reativo de Folin-Ciocalteu. Após três minutos, foi adicionado 1,0 mL de solução de carbonato de sódio (Na_2CO_3) a 30% (m/v). A mistura reacional foi deixada em repouso por uma hora na ausência de luz.

As absorbâncias das misturas reacionais foram determinadas em espectrofotômetro a 760nm. Como branco, foram utilizados 5 mL de água e os reagentes conforme descrito anteriormente.

Foi construída uma curva de calibração com solução padrão de ácido gálico [$\text{C}_6\text{H}_2(\text{OH})_3\text{COOH}$], nas concentrações de 25, 50, 100 e 200 ppm. Todas as análises foram realizadas em triplicata. O teor de compostos fenólicos totais foi expresso em equivalente de ácido gálico (EAG), ou seja, mg EAG g^{-1} de amostra desengordurada.

3.10.4 Determinação de Flavonoides Totais

O teor de flavonoides total dos extrativos desengordurados foi determinado utilizando o método de cloreto de alumínio (AlCl_3) conforme Do et al., (2014) com modificações. Inicialmente foi preparada uma solução metanólica dos extrativos desengordurados, na concentração de 100 ppm. Foram adicionados 2,0 mL da solução metanólica (100 ppm) em um tubo de ensaio, em seguida, foi misturado 0,1 mL da solução de cloreto de alumínio (AlCl_3) 10% (m/v) e 0,1 mL da solução acetato de potássio ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{K}$) 0,1 M. A mistura foi mantida à temperatura ambiente durante 30 minutos. As absorvâncias das misturas reacionais foram determinadas em espectrofotômetro a 415 nm.

Foi construída uma curva de calibração com solução padrão de quercetina ($\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$), nas concentrações de 25, 50, 100, 200 e 300ppm. Todas as análises foram realizadas em triplicata. O teor de flavonoides totais foi expresso em equivalente de quercetina (EQCT), ou seja, mg EQCT g^{-1} de amostra desengordurada.

3.11 Atividade Microbiológica

A atividade microbiológica foi realizada com as amostras oriundas do extrato hexânico das folhas: FEP, FDM e FET, dos extratos hexânicos e etanólicos da casca e do extrato etanólico do lenho da espécie *P. leptostachyum* e do óleo essencial da resina da espécie *P. hebetatum*.

As amostras foram submetidas ao ensaio utilizando a técnica de difusão em disco segundo o NCCLS (2003). As cepas das bactérias patogênicas utilizadas foram *Staphylococcus aureus* (ATCC 12598), *Streptococcus pneumoniae* (ATCC 11733), *Escherichia coli* (ATCC 10536) e *Klebsiella pneumoniae* (ATCC700603). As cepas foram crescidas a 37°C por 4-6 horas sendo sua turbidez ajustada para escala 0,5 de McFarland. Em seguida, as bactérias foram inoculadas em placas de Petri contendo meio Muller-Hinton. Sobre o meio de cultura, foram depositados discos de papel e sobre estes, 20 μL das amostras a serem analisadas, sendo incubadas a 37°C por 24 horas. Posteriormente ao processo de incubação, foram consideradas

com atividade antibacteriana, as amostras que não permitiram o crescimento bacteriano ao redor do disco. Os halos de inibição produzidos foram medidos com ajuda de paquímetro digital.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Constituintes Voláteis da Resina da Espécie *Protium hebetatum*

O óleo essencial da resina da espécie *P. hebetatum*, obtido por hidrodestilação, apresentou rendimento de 4,60% de óleo calculado em relação a o volume extraído de óleo essencial por massa de resina (v/m). O óleo foi analisado em cromatógrafo gás-líquido acoplado a espectrômetro de massa (CGL/EM). Conforme análise do cromatograma e dos espectros de massa registrados, a amostra apresentou um total de 28 constituintes (Figura 6).

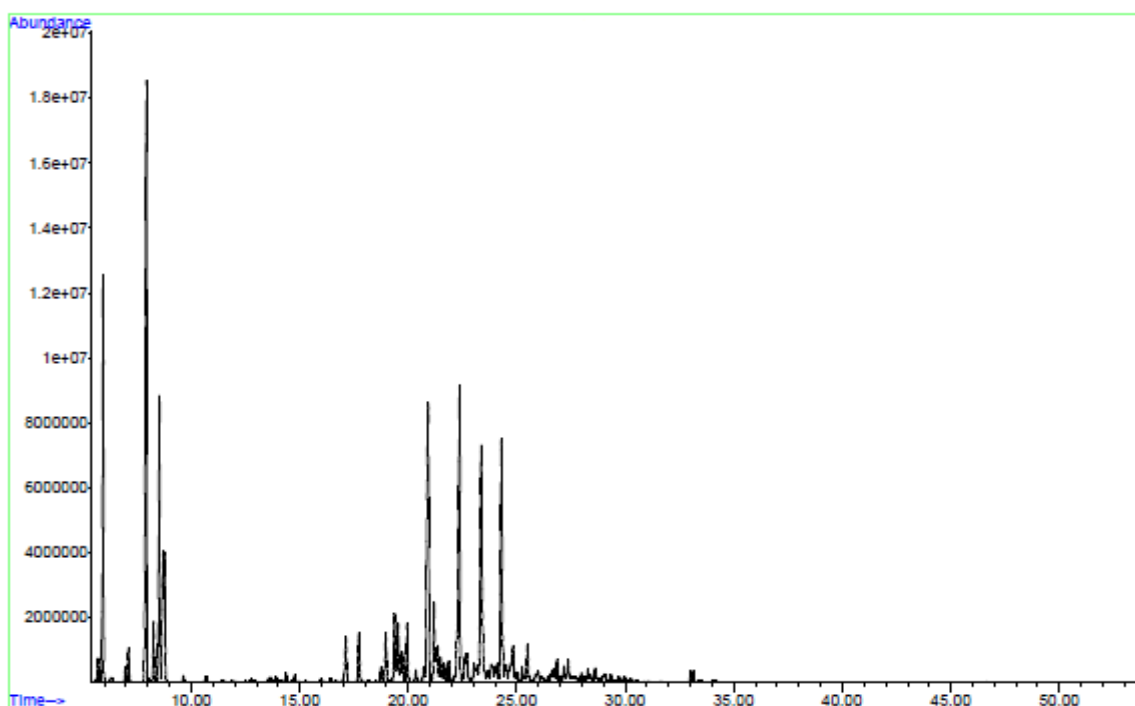


Figura 6 – Cromatograma do óleo essencial da resina obtido da espécie *P. hebetatum*.

A análise dos espectros de massa registrados de acordo com o cromatograma permitiu identificar um total de 20 compostos, representando 77,62% dos constituintes registrados (Tabela 4, Pág. 45). Dos constituintes registrados foram identificados 8 monoterpenos, 12 sesquiterpenose 8 compostos não identificados, representando 28,57%, 42,86% e 28,57%, respectivamente. Os constituintes foram identificados por análise de comparação com o banco de dados da biblioteca do equipamento, por comparação visual com os espectros de massa publicados na

literatura (ADAMS, 2007) e no banco de dados National Institute of Standards and Technology (NIST,2008).

Tabela 4 – Compostos químicos do óleo essencial da resina da espécie *Protium hebetatum*.

Ord	Composto	AR%	T.R.	I.K.	I.B.	M ⁺
1	α-Tujeno	0,679	5,704	930	93	136
2	α-Pineno	9,160	5,937	939	93	136
3	β-Pineno	0,833	7,108	979	93	136
4	α-Felandreno	17,363	7,929	1002	93	136
5	α-Terpineno	1,424	8,265	1017	121	136
6	p-Cinemo	7,241	8,531	1024	119	134
7	β-Felandreno	4,398	8,712	1029	93	136
8	1,8-Ceneol	2,471	8,776	1031	43	154
9	δ-Elemeno	1,679	17,121	1338	121	204
10	α-Cubebeno	1,584	17,729	1348	161	204
11	α-Copaeno	1,529	18,965	1376	161	204
12	β-Bourboneno	2,241	19,372	1388	81	204
13	Não identificado	1,262	19,534	*	*	*
14	β-Elemeno	0,813	19,734	1390	93	204
15	Não identificado	1,589	19,948	*	*	*
16	E-Cariofileno	11,160	20,918	1419	93	204
17	Não identificado	2,152	21,183	*	*	*
18	γ-Elemeno	0,602	21,481	1436	121	204
19	6,9-Guaiadieno	0,711	21,869	1444	105	204
20	D-Germacreno	10,242	22,367	1485	161	204
21	Não identificado	0,673	22,613	*	*	*
22	B-Germacreno	0,784	22,690	1561	121	204
23	Não identificado	8,548	23,363	*	*	*
24	Não identificado	7,579	24,295	*	*	*
25	γ-Cadineno	1,039	24,832	1513	161	204
26	δ-Cadineno	1,063	25,498	1523	161	204
27	Óxido de cariofileno	0,606	26,863	1583	41	219
28	Não identificado	0,577	27,367	*	*	*
Total Identificado (%)		77,620				

AR% = abundancia relativa; T.R.= Tempo de retenção; I.K.=Índice de Kovats segundo Adans (2007); I.B. = Íon base; M⁺= Íon molecular.

O constituinte monoterpeneo mais abundante identificado foi o α-felandreno com 17,363% (Figura 7, Pág. 46), seguido do α-pineno com 9,160% (Figura 8, Pág.

47) e do *p*-cinemo com 7,241% (Figura 9, Pág. 47). Em relação aos constituintes classificados como sesquiterpeno, o principal constituinte foi identificado como sendo o *E*-cariofileno com 11,160% (Figura 10, Pág. 48) seguido do *D*-germacreno com 10,242% (Figura 11, Pág. 48). Normalmente, quando o óleo essencial apresenta o constituinte cariofileno, outro constituinte decorrente da sua oxidação é formado, o óxido de cariofileno (0,606%). Neste caso o produto de oxidação é considerado um artefato, pois a oxidação ocorre durante o processo de extração do óleo, em contato com o oxigênio atmosférico. A presença deste artefato normalmente é identificada pela alteração de coloração do óleo, amarelo claro para azul, característica do óxido de cariofileno. Em conformidade com esta característica, a amostra analisada apresentou coloração azulada de baixa intensidade.

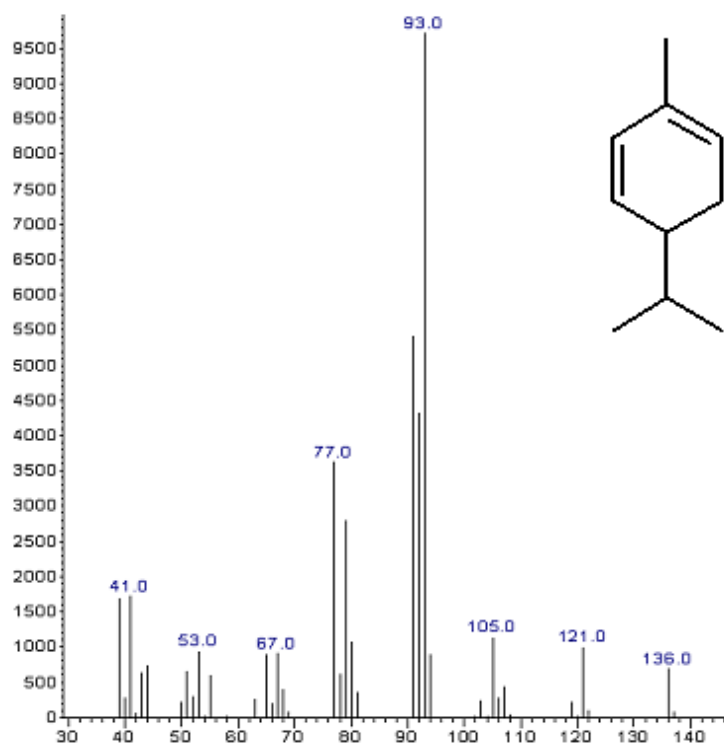


Figura 7 – Espectro de massa do monoterpeno α -felandreno.

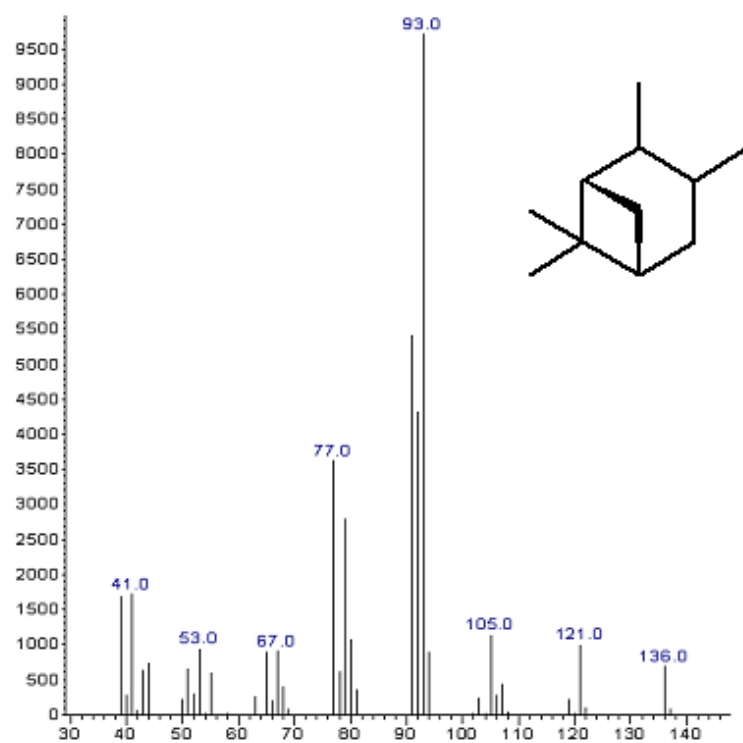


Figura 8 – Espectro de massa do monoterpeneo α -pineno.

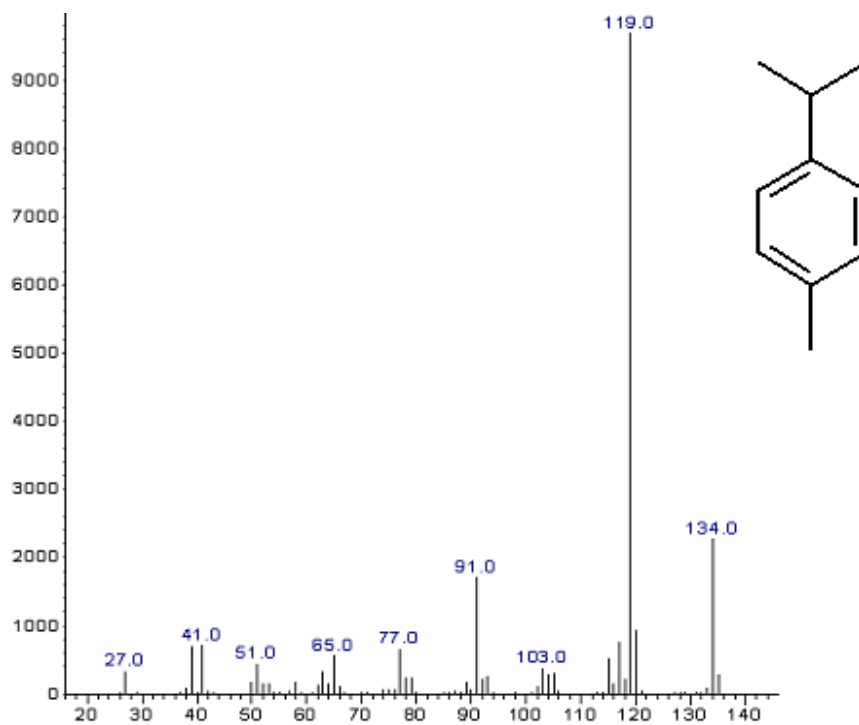


Figura 9 – Espectro de massa do monoterpeneo *p*-cineno.

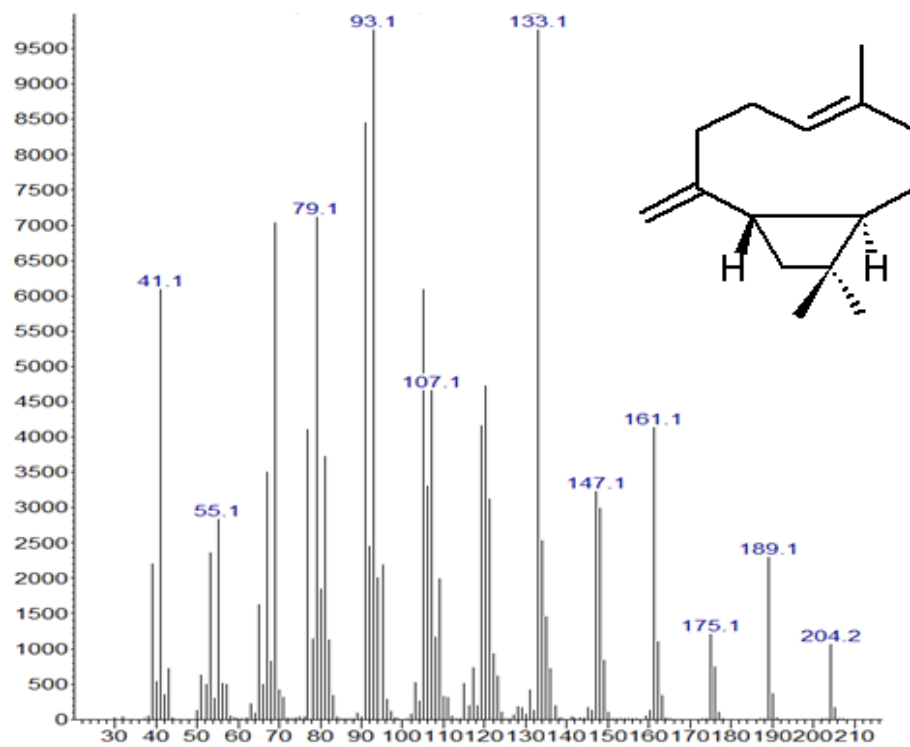


Figura 10 – Espectro de massa do sesquiterpeno *E*-cariofileno.

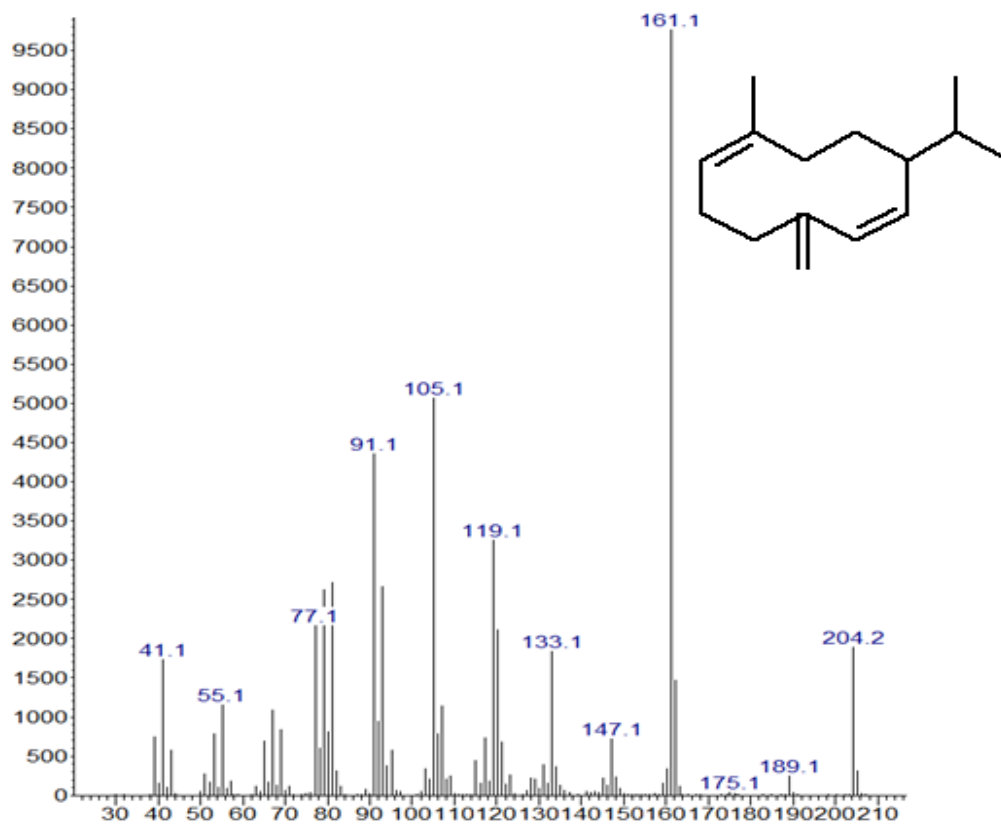


Figura 11 – Espectro de massa do sesquiterpeno *D*-germacreno.

4.2 Estudo Fitoquímico do *Protium leptostachyum*

4.2.1 Prospecção Fitoquímica do Lenho e da Casca

A pesquisa qualitativa dos extratos etanólicos do lenho e da casca da espécie *P. leptostachyum* está descrita na tabela 5.

Tabela 5 – Resultados da prospecção fitoquímica qualitativa do lenho e da casca da espécie *P. leptostachyum* (Burseraceae).

ENSAIOS QUALITATIVOS	LENHO	CASCA
Taninos Hidrolisáveis(FeCl ₃)	+++	+++
Proteínas (Nihidrina)	-	-
Ácidos Orgânicos Livres (Pascová)	+	+
Polissacarídeos (Lugol)	-	-
Açúcares Redutores (Fehling)	+	+
Glicosídeos cardiotônicos (Kedde)	-	-
Esteroides(Liebermann-Burchard)	-	-
Triterpenos (Liebermann-Burchard)	+	+
Antraquinonas (Bornträge)	-	-
Flavonoides (Shinoda)	++	++
Carotenoides (Tricloreto de antimônio)	-	-
Saponinas (Teste de espuma)	+	+
Alcaloides (Dragendorff)	+	+
Depsídeos e Depsídonas(FeCl ₃)	-	-

+ = Presença do metabólito; - = Ausência do metabólito; ++ = Presente em alta concentração (critério visual); +++ = Presente em altíssima concentração (critério visual)

As espécies do gênero *Protium* têm sido objeto de pesquisa fitoquímica com o intuito de isolamento e identificação dos constituintes voláteis da resina, exsudado característico da família Burseraceae, como também da folha e frutos (SIANI et al, 2004, ZOGHBI et al. 1993, MARQUES et al., 2010b). Além dos estudos da identificação dos constituintes voláteis, a grande maioria dos trabalhos publicados na literatura está relacionada ao isolamento e identificação dos constituintes fixos da resina.

Em relação aos estudos fitoquímicos do lenho e da casca, são raros os registros na literatura especializada (SIANI et al., 2004; MARQUES et al., 2010c; COSTA et al., 2012).

A pesquisa qualitativa realizada para identificar as principais classes de metabólitos secundários do lenho e da casca do *P. leptostachyum* apresentaram a mesma constituição de classe de metabólitos secundários. Todos os ensaios positivos no lenho foram também identificados na casca, não apresentando grandes variações de intensidade de coloração, o mesmo princípio foi observado em relação à ausência dos constituintes.

Jardim et al. (2005) realizou a prospecção qualitativa no chá oriundo das folhas do *Protium heptaphyllum* e constatou a presença de alcaloides, taninos, saponinas, esteroides e triterpenos, entrando em concordância com os resultados obtidos para o extrato etanólico da casca e do lenho. Entretanto, a síntese de metabólitos secundários em uma planta pode variar em decorrência de vários fatores, entre eles: da época de coleta, sazonalidade, da disponibilidade de nutrientes e hídricas, da indução por ataque de patógenos, poluição atmosférica, entre outros (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

4.2.2 Quantificação de Fenóis Totais da Casca e do Lenho

A tabela 6, pág. 51, apresenta à quantificação dos compostos fenólicos totais obtidos da casca e do lenho, expressos em miligrama de ácido gálico por grama de extrato seco desengordurado (mg EAG g⁻¹), determinado pelo método colorimétrico utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu.

O teor de fenóis totais dos extratos da casca foram superiores aos valores obtidos para os extratos do lenho. Isso é de se esperar, sendo que a casca exerce maior interação com o meio externo, onde os compostos fenólicos atuam como protetores à radiação ultravioleta e defesa contra patógenos (PERES, 2004).

Tabela 6 – Quantificação dos fenóis totais nos extratos secos da casca e do lenho da espécie *P. leptostachyum*.

Extrato		Absorbância	Média	mg EAG g ⁻¹
Lenho	Metanol	1,480	1,484	185,553 ±0,527
		1,484		
		1,488		
	Etanol	1,368	1,341	166,737 ±3,059
		1,326		
		1,330		
Acetona	0,633	0,637	74,105 ±0,843	
	0,625			
	0,655			
Casca	Metanol	1,800	1,798	226,868 ±1,000
		1,812		
		1,782		
	Etanol	1,604	1,643	206,474 ±4,780
		1,648		
		1,676		
	Acetona	1,507	1,494	186,868 ±2,387
		1,501		
		1,473		

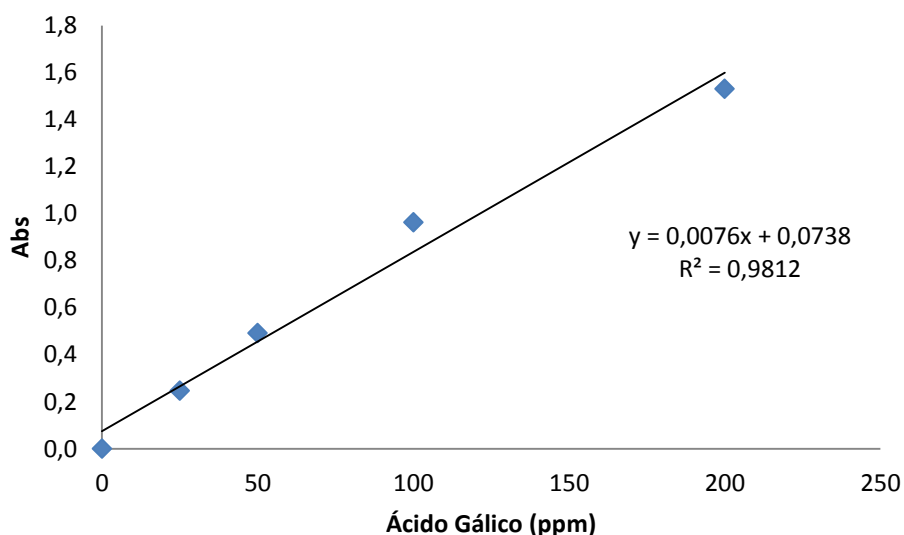


Figura 12 – Curva padrão do ácido gálico em 760 nm.

O teor determinados de fenóis totais nos extratos apresentou maior quantidade na casca. O extrato metanólico, em todas as amostras analisadas, apresentou maior teor de compostos fenólicos. O maior poder de extração do metanol para os compostos fenólicos pode ser justificado em função da sua polaridade média, semelhante a dos compostos fenólicos. O efeito da polaridade dos

solventes extratores pode ser observado na ordem decrescente do percentual de fenóis totais conforme os resultados apresentados.

4.2.3 Quantificação de Flavonoides Totais da Casca e do Lenho

Os teores de flavonoides nas amostras da casca e do lenho apresentaram valores inferiores aos quantificados para os fenóis totais (Tabela 7) como previsto, pois na quantificação de fenóis totais também são inclusos os flavonoides. A casca apresentou os maiores teores, exceto o teor médio do extrato metanólico que apresentou 3,255 mg EQCT g⁻¹, inferior ao teor médio extrato metanólico do lenho.

Tabela 7 – Quantificação dos flavonoides totais nos extratos secos da casca e do lenho da espécie *P. leptostachyum*.

Extrato		Absorbância	Média	mg EQCT g ⁻¹
Lenho	Metanol	0,083	0,080	21,438 ±0,482
		0,079		
		0,079		
	Etanol	0,097	0,093	26,953 ±3,259
		0,104		
		0,077		
	Acetona	0,053	0,053	17,651 ±0,465
		0,051		
		0,055		
Casca	Metanol	0,084	0,082	24,395 ±0,484
		0,081		
		0,080		
	Etanol	0,088	0,079	23,698 ±1,817
		0,075		
		0,074		
	Acetona	0,073	0,073	19,979 ±0,209
		0,072		
		0,074		

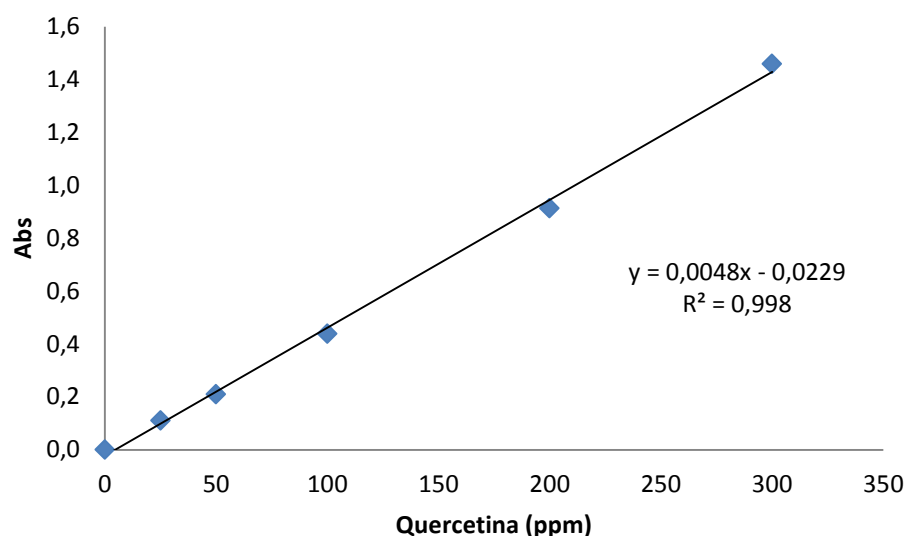


Figura 13 – Curva padrão da quercetina em 415 nm.

4.2.4 Determinação da Área Foliar

Os valores das áreas foliares dos 3 lotes, estão descritos na tabela 8, pág. 54. Para efeito do cálculo do rendimento da cera por unidade de área foliar foram consideradas as faces adaxial e abaxial, portanto, a média da área superficial representa o dobro da média da área adaxial.

O Lote 1 apresentou área adaxial que variou de 12,19 cm² a 51,48 cm², apresentando a menor média de área superficial, 50,42 cm². A relação de cera cuticular extraída por unidade de área foliar para este lote apresentou valor de 99,17 µg cm⁻². O Lote 2 apresentou área adaxial como o mínimo de 15,20 cm² e o máximo de 51,21 cm² originando média de área superficial equivalente a 58,06 cm², resultando em um rendimento de cera cuticular de 101,62 µg cm⁻².

O Lote 3 apresentou área adaxial com o mínimo de 17,29 cm² e o máximo de 62,58 cm², originando média de área superficial equivalente à 58,70 cm², resultando em um rendimento de cera cuticular de 91,99 µg cm⁻².

Tabela 8 - Determinação do rendimento da cera cuticular da folha do *P. leptostachyum*.

Lotes	Área Adaxial (cm ²)	Média Área Superficial	Cera Cuticular	Cera/Área foliar total
L1.1	51,48			
L1.2	29,67			
L1.3	14,84	50,42 cm ²	5000 µg	99,17 µg cm ⁻²
L1.4	22,55			
L1.5	20,52			
L1.6	12,19			
L2.1	15,20			
L2.2	27,49			
L2.3	20,03	58,06 cm ²	5900 µg	101,62 µg cm ⁻²
L2.4	51,21			
L2.5	30,62			
L2.6	29,64			
L3.1	62,58			
L3.2	26,06			
L3.3	19,86	58,70 cm ²	5400 µg	91,99 µg cm ⁻²
L3.4	30,48			
L3.5	19,87			
L3.6	17,29			

Apesar do Lote 3 ter apresentado a maior média de área superficial (58,70 cm²), não resultou em maior rendimento de cera cuticular total, 5400 µg. Esta diferença pode estar relacionada à perda de massa durante o processo de extração da cera cuticular. A média geral do rendimento da cera cuticular por área foliar foi de 97,59 ±5,00 µg cm⁻².

Segundo Mimura et al., (1998) a composição química e o quantitativo da cera cuticular pode variar entre grupos taxonômicos, tornado característico de espécies. Entretanto, fatores ambientais e o estágio de crescimento da planta podem influenciar na quantidade de cera cuticular (BONDADA et al., 1996; BUSCHHAUS et al., 2011).

4.2.5 Estudo Químico do Extrato Hexânico das Folhas

As folhas (1,424 kg) foram submetidas inicialmente a extração em hexano (aquente) e posteriormente com etanol, utilizando técnica de maceração. O extrato hexânico (18,9654 g) foi adicionado a 70 g de sílica gel 60 de 70-230 mesh. A amostra foi submetida à cromatografia filtrante sob pressão reduzida utilizando 500 mL dos solventes éter de petróleo, diclorometano e etanol em ordem crescente de polaridade.

Após a separação do solvente em evaporador rotativo, sob pressão reduzida, resultou nas seguintes frações: éter de petróleo (FEP = 5,3955 g), diclorometano (FDM = 8,7608 g) e etanol (FET = 3,1131 g).

Uma amostra da fração éter de petróleo (FEP = 4,2711 g) e da diclorometano (FDM = 7,6948 g) foi submetida ao processo de separação em coluna cromatográfica de diâmetro versus comprimento de 3x60 cm empacotada com 65 g de sílica gel 60 de 35-70 mesh. As colunas cromatográficas foram eluídas com gradiente de polaridade crescente de solventes orgânicos. Após sucessivas cromatografias, a FEP permitiu a obtenção de 3 misturas codificadas como FEP1-2 (2,5551 g) e FEP3-8 (0,2094g) eluídas com hexano (100%); FEP9-20 (0,0653 g) eluída com hexano:diclorometano (9:1). A fração FDM permitiu a obtenção de 5 misturas codificadas como FDM1 (0,0812 g) e FDM11-21 (0,1561 g) eluídas com hexano (100%); FDM22-34 (0,6748 g) eluída com hexano:diclorometano (9:1); FDM35-59 (1,6381 g) eluída com hexano:diclorometano (8:2); FDM60-72 (0,3607 g) eluída com hexano:diclorometano (6:4). As misturas foram comparadas através de cromatografia de camada delgada (CCD) e submetidas à análise em cromatografia gás-líquido acoplada ao espectrômetro de massa (Figura 14, Pág. 56).

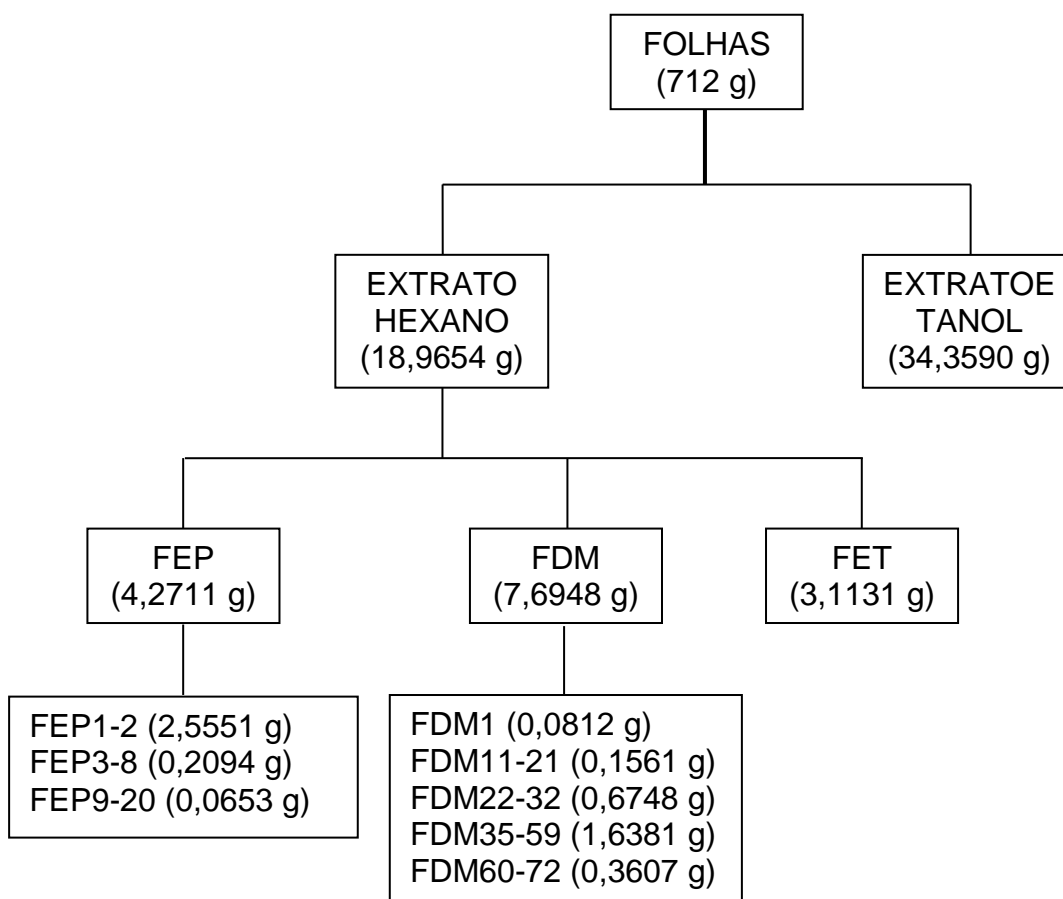


Figura 14 – Fluxograma relativo à purificação do extrato hexânico das folhas do *P. leptostachyum*.

4.2.5.1 – Identificação dos Constituintes das Frações Diclorometano (FDM)

O resultado das sucessivas colunas cromatográficas da fração diclorometano das folhas do *P. leptostachyum* após as análises das frações obtidas em CCD originou cinco misturas impuras que foram codificadas por FDM1, FDM11-21, FDM22-32, FDM35-59 e FDM60-70 (Tabela 9, Pág. 77). As frações foram analisadas em cromatógrafo gás-líquido acoplado a espectrômetro de massa (CGL/EM). A análise dos espectros de massas oriundos dos cromatogramas das frações analisadas permitiu registrar um total de 37 compostos, sendo que 4 compostos não possíveis de ser identificados.

Os compostos identificados foram classificados em 12 constituintes voláteis, seis ésteres, 6 hidrocarboneto de cadeia longa, 2 aldeídos, 3 triterpenos pentacíclicos, 2 esteroides, 1 ácido insaturado e um composto da classe do tocoferol.

4.2.5.1.1 – Identificação dos Constituintes da Fração FDM1

A análise realizada em CGL/EM da fração FDM1 permitiu o registro do cromatograma com 15 compostos, sendo possível identificar 100% dos constituintes (Figura 16). Os compostos identificados foram classificados como: 10 óleos essenciais e 5 hidrocarbonetos de cadeia longa.

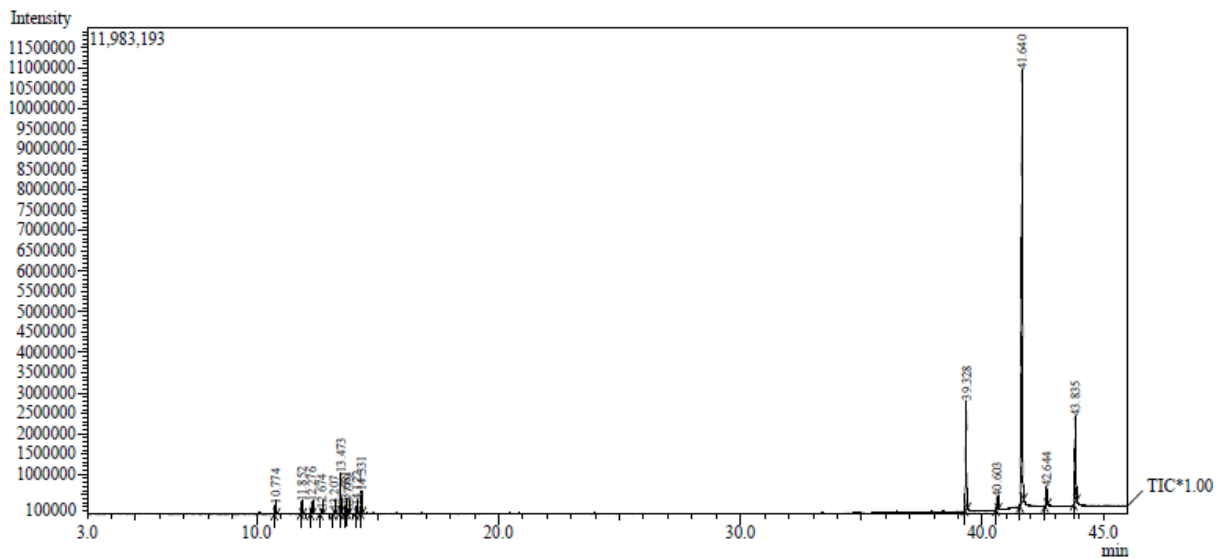


Figura 15 – Cromatograma da fração FDM1.

O espectro obtido da fração FDM1 na região do infravermelho (Figura 16, Pág. 58) registrou bandas na região de estiramento sp^3 C – H simétrico e assimétrico dos grupos metila (CH_3) e metileno (CH_2): banda em 2954 e 2848 cm^{-1} relativas ao estiramento assimétrico e simétrico da ligação C – H do grupo metileno (CH_2), respectivamente, e banda em 2915 cm^{-1} relativa ao estiramento assimétrico do grupo metila (CH_3).

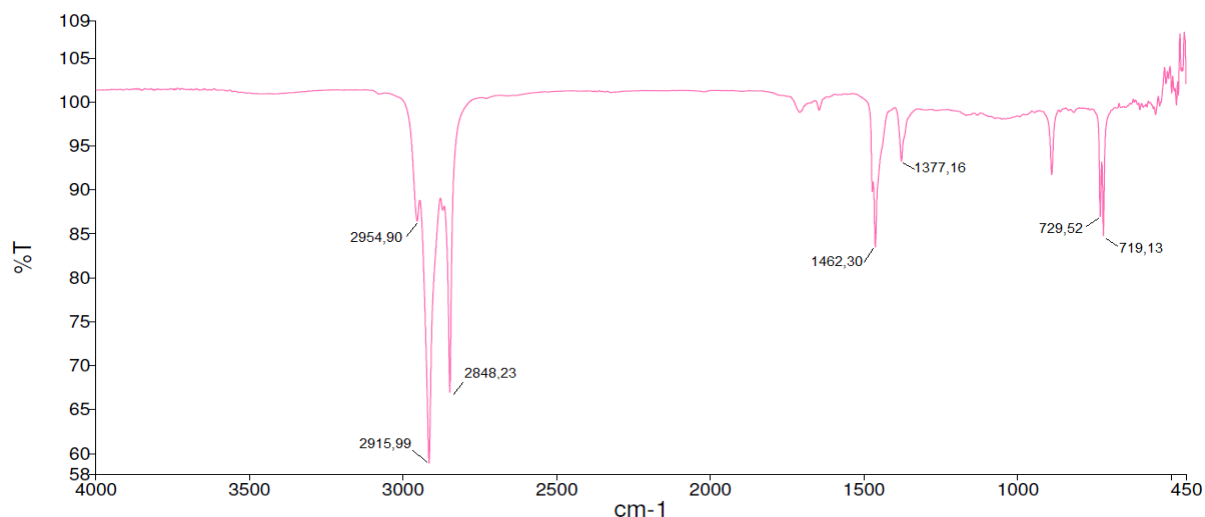


Figura 16 – Espectro na região do infravermelho da fração FDM1.

Duas bandas em 1462 a 1377 cm^{-1} , características de deformação angular dos grupos metileno (CH_2) e metila (CH_3), respectivamente. Além desses sinais, apresentou também sinais em 729 e 719 cm^{-1} característico do grupo metileno (CH_2), associado a cadeia longa de hidrocarboneto com quatro ou mais grupos metilenos.

A análise dos espectros de massas registrados, conforme o cromatograma da fração FDM1 possibilitou identificar 10 compostos classificados como óleo essencial, sendo o β -silineno (4,18%) o constituinte principal entre os óleos essenciais (Tabela 9, Pág. 77). Os demais compostos identificados foram alcanos de cadeia longa linear, representando 86,90% dos constituintes identificados. Entre os hidrocarbonetos lineares o nonacosano (C_{29}) foi o principal constituinte, com 58,45%, seguido do pentacosano (C_{25}) com 13,62% e o hentriacontano (C_{31}) com 11,27%.

A análise do espectro de massa do nonacosano (Figura 17, Pág. 59) revelou fragmento íon molecular $\text{M}^+ = 408 \text{ m/z}$, seguido do fragmento $\text{m/z} = 393$, representando $\text{M}^+ - (\text{CH}_3)$, perda da metila ($-\text{CH}_3$) terminal da cadeia carbônica. Além desses íons, apresentou íon base $\text{m/z} = 57$, equivalente ao fragmento $(\text{C}_4\text{H}_9)^+$.

A análise do espectro de massa do pentacosano (Figura 18, Pág. 59), não foi observado o íon molecular $\text{M}^+ = 352 \text{ m/z}$, apresentando um íon $\text{M}^+ - 1$, no entanto a fragmentação apresentou características de hidrocarbonetos lineares, revelando o íon base $\text{m/z} = 57$, equivalente ao fragmento $(\text{C}_4\text{H}_9)^+$.

O espectro de massa do hentriacontano (Figura 19) foi observado o íon molecular $M^+ = 436$ m/z. O próximo fragmento analisado representa o íon $m/z = 393$, representando o fragmento relativo à perda $M^+ - (C_3H_7)$. Conforme a análise, os fragmentos $m/z = 422$ e $m/z = 408$, não estão de acordo com a fragmentação do hentriacontano.

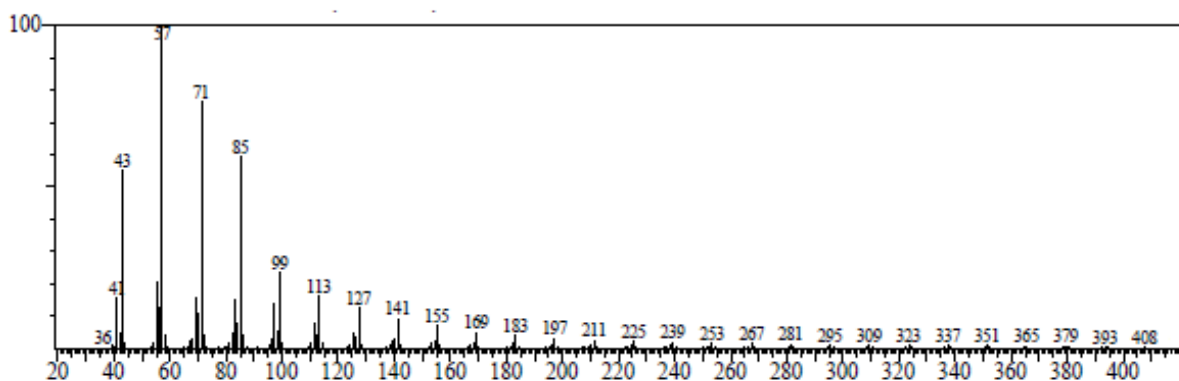


Figura 17 – Espectro de massa do nonacosano (C₂₉).

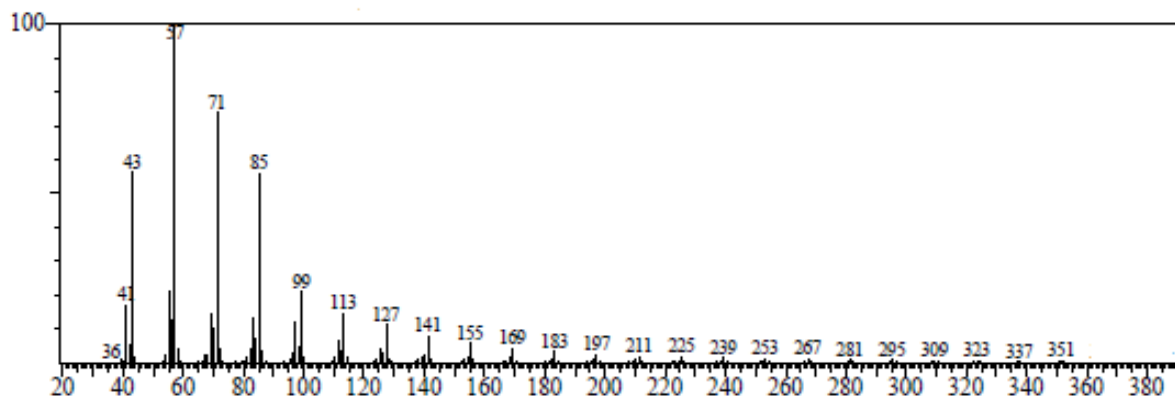


Figura 18 – Espectro de massa do pentacosano (C₂₅).

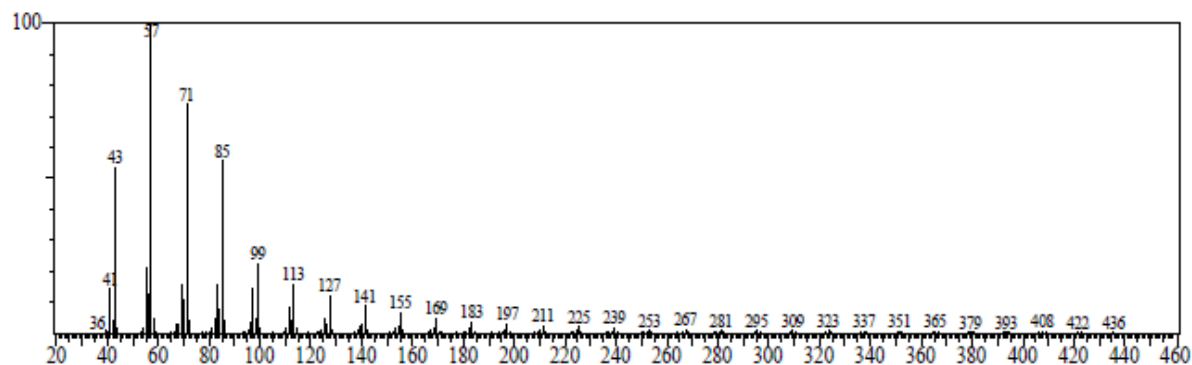


Figura 19 – Espectro de massa do hentriacontano (C₃₁).

4.2.5.1.2 – Identificação dos Constituintes da Fração FDM11-21

A fração FDM11-21 apresentou um cromatograma registrando 10 compostos (Figura 20), sendo possível a identificação de 100% dos constituintes com registro dos seus espectros de massas (Tabela 9, Pág.77). Os compostos identificados foram classificados nas seguintes funções: 5 ésteres, 2 hidrocarbonetos, 2 aldeídos e um ácido orgânico.

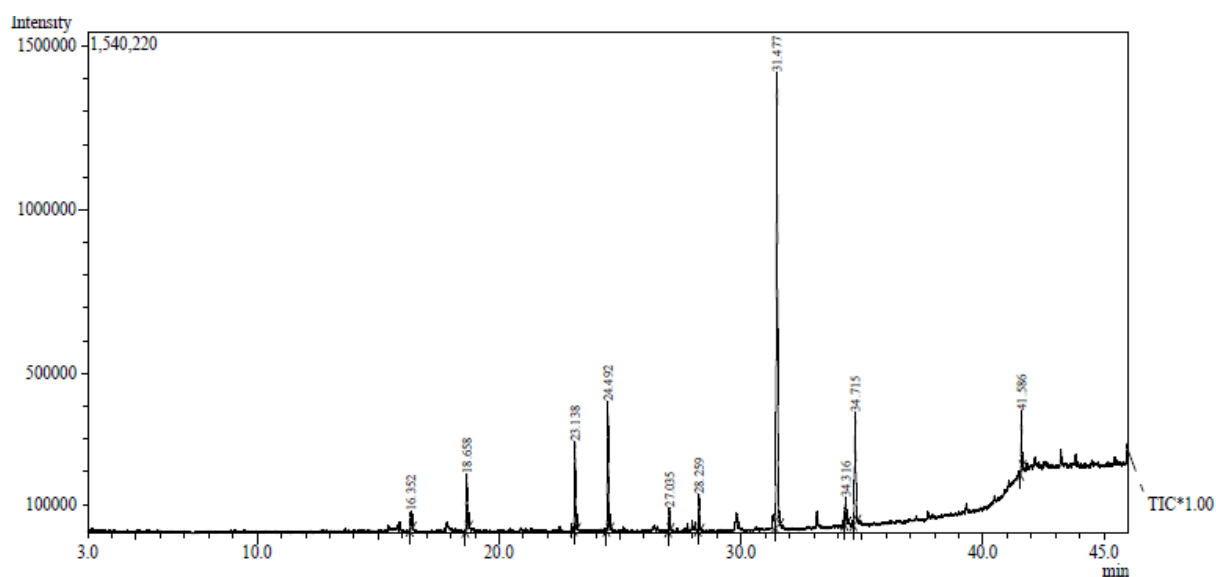


Figura 20 – Cromatograma da fração FDM11-21.

O espectro na região do infravermelho da mistura FDM11-21 apresentou bandas típicas de estiramento da ligação sp^3 C – H, assimétrico e simétrico dos grupos metila (CH_3) e metileno (CH_2): banda em 2916 e 2849 cm^{-1} (Figura 21, Pág. 61). Banda relativa ao estiramento do grupo carbonila na região de 1738 cm^{-1} . Este sinal é típico de carbonila de éster, contudo, aldeídos também podem absorver nesta região. Duas bandas em 1462 e 1376 cm^{-1} características da deformação angular dos grupos metileno (CH_2) e metila (CH_3), respectivamente. Além desses sinais, duas bandas, sendo uma de intensidade média e outra de baixa intensidade na região de 1171 a 1012 cm^{-1} , características de estiramento C – O típicas de ésteres.

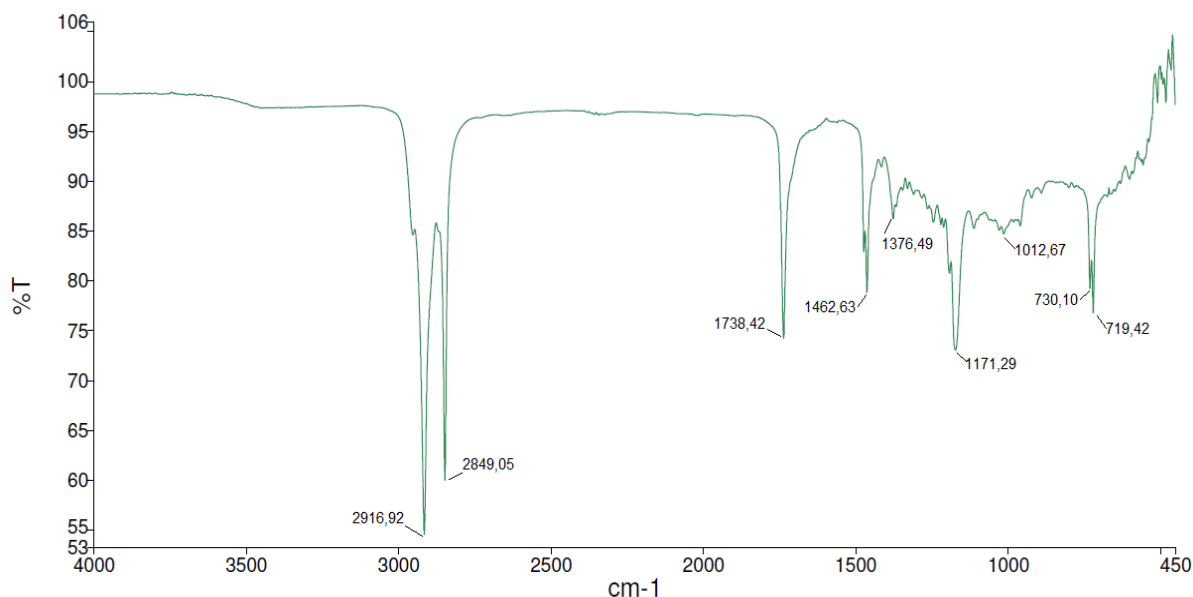


Figura 21 – Espectro na região do infravermelho da fração FDM11-21.

A análise dos espectros de massa registradas de acordo com o Cromatograma, permitiu identificar dois aldeídos: tetradecanal (C14) com 1,83% e octadecanal (C18) com 6,03%. Outros constituintes foram identificados, dentre eles, 5 ésteres, sendo os mais abundantes o hexadecanoato de metila com 7,71%, o hexadecanoato de etila com 11,61%, o hexadecanoato de ciclohexila com 48,47% e um hidrocarboneto ramificado (1-metilexil)-cicloexano com 11,99%.

A análise dos espectros de massas do tetradecanal (Figura 22, Pág. 62) e do octadecanal (Figura 23, Pág. 62) não revelou o íon molecular $M^+ = 212$ m/z e $M^+ = 268$ m/z, respectivamente. A comparação visual com espectro publicado no banco do NIST (2010) apresentou semelhança na fragmentação, inclusive à ausência do M^+ . Conforme Vieira et al., (2012) os aldeídos de cadeias longas apresentam como características os fragmentos de origem m/z = 29, 43, 57, 71 como dominantes.

O espectro de massa do hexadecanoato de metila (Figura 24, Pág. 62) apresentou pico do íon molecular $M^+ = 270$ m/z e fragmento tipo McLafferty originando pico base em m/z = 74. Outro pico de alta intensidade corresponde a m/z = 87, relativo ao fragmento $C_4H_7O_2$.

O espectro de massa do hexadecanoato de etila não apresentou registro do íon molecular $M^+ = 284$ m/z (Figura 25, Pág. 63). O espectro revelou fragmento base tipo McLafferty m/z = 88, contemplando o radical etila neste fragmento. Outros fragmentos foram observados como derivado da perda do grupo etila [$M^+ - (C_2H_5)$]

m/z = 255], propila [$M^+ - (C_3H_7)$ m/z = 241], nonila [$M^+ - (C_9H_{19})$ m/z = 157] e o fragmento m/z = 101 relativo ao íon ($C_5H_9O_2$).

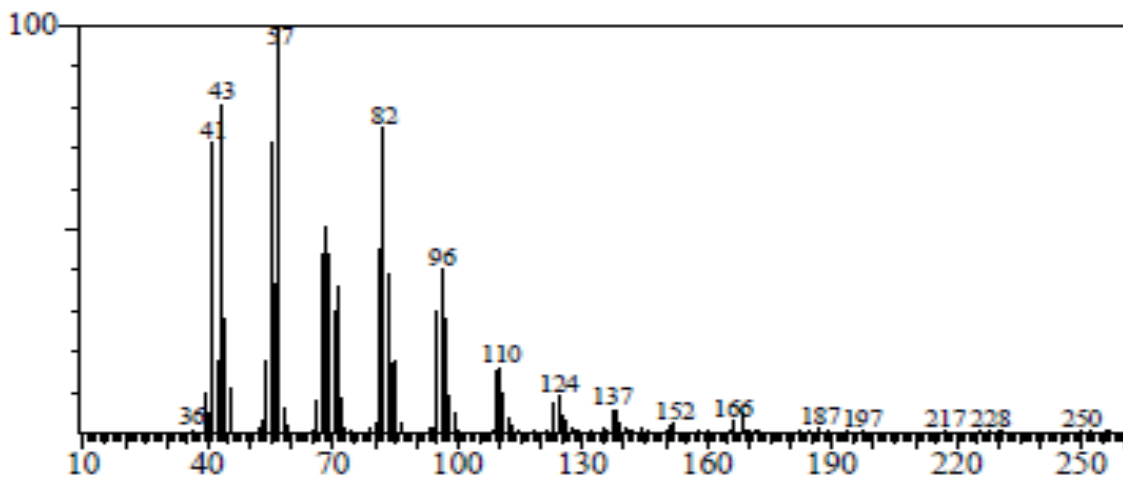


Figura 22 – Espectro de massa do tetradecanal.

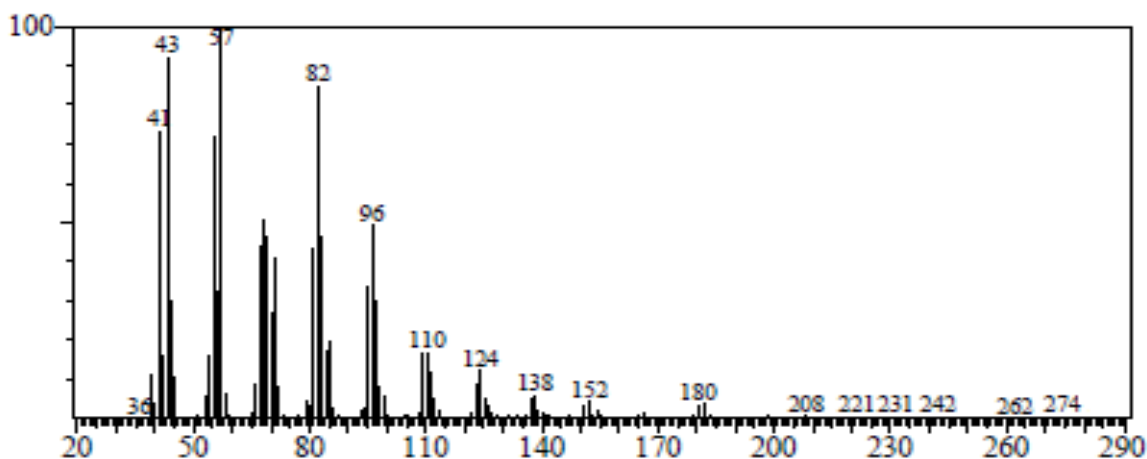


Figura 23 – Espectro de massa do octadecanal.

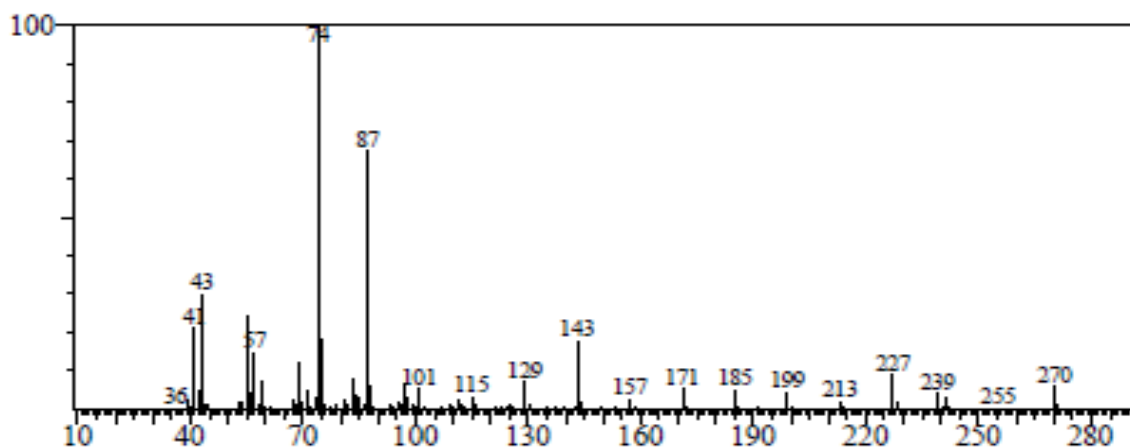


Figura 24 – Espectro de massa do hexadecanoato de metila.

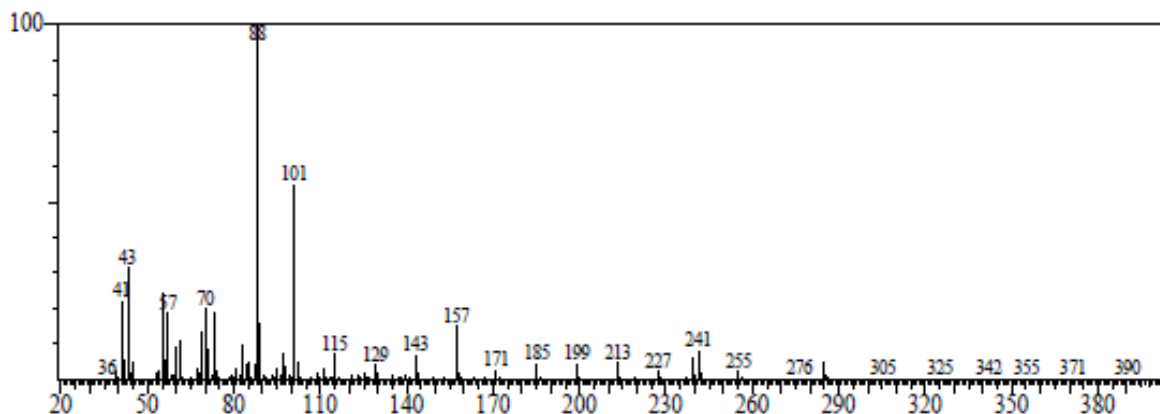


Figura 25 – Espectro de massa do hexadecanoato de etila.

O éster de maior concentração, o hexadecanoato de ciclohexila não registrou $M^+ = 338$ m/z (Figura 26). A proposta da análise do CGL/EM mostrou probabilidade de exatidão de 86%, não sendo possível a comparação do espectro de massa registrado com o banco de dados do NIST (2010).

A análise do espectro de massa permitiu identificar o íon $m/z = 309$ oriundo da fragmentação do $M^+ - 29$, relativo à perda do íon C_2H_5 , o fragmento $m/z = 239$, pode ser justificado pela perda do fragmento C_7H_{15} do íon molecular. O fragmento relativo ao íon base $m/z = 82$ pode ser justificado pelo rearranjo de hidrogênio com a liberação do íon $(C_6H_{10})^+$.

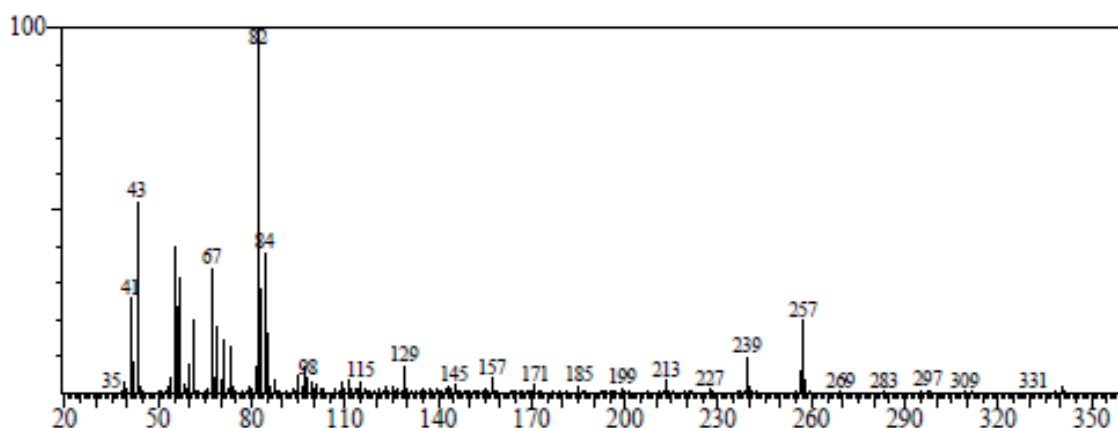


Figura 26 – Espectro de massa do hexadecanoato de ciclohexila.

4.2.5.1.3 – Identificação dos Constituintes da Fração FDM22-34

A fração FDM22-34 apresentou cromatograma constituído de 7 compostos (Figura 27), sendo que 3 compostos não foram possíveis de identificação através da análise dos espectros de massa (Tabela 9, Pág. 77). Os compostos identificados foram classificados como: óleo essencial, éster, triterpeno pentacíclico e composto da classe do tocoferol.

O composto da classe dos tocoferóis foi identificado como o α -tocoferol com 25,78% e como constituinte majoritário a lupenona com 35,47%.

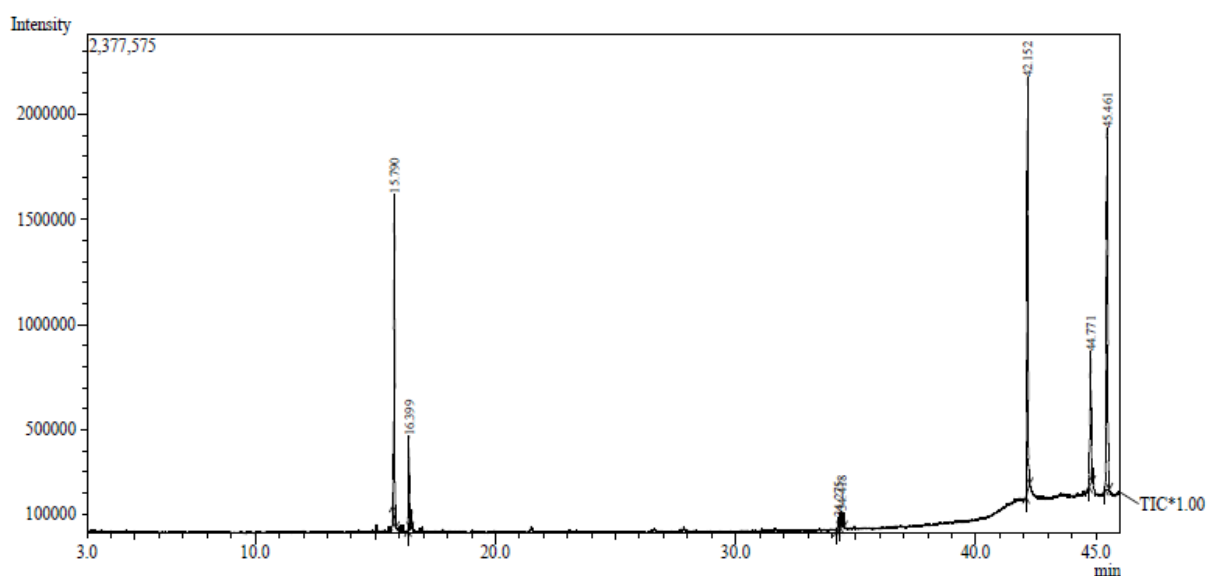


Figura 27 – Cromatograma da fração FDM22-34.

O espectro da região do infravermelho não apresentou sinais de estiramento sp^2 C – H, como também não revelou os sinais característicos de bandas harmônicas do grupo aromático (Figura 28, Pág. 65). Conforme Barbosa (2007) nem sempre os compostos aromáticos apresentam as bandas harmônicas que ocorrem entre 2000 a 1660 cm^{-1} . Apesar da mistura conter o α -tocoferol como segundo composto em maior concentração, o espectro de infravermelho não revelou o estiramento sp^2 C – H, em consonância com a substituição completa do grupo aromático do α -tocoferol. O espectro revelou duas bandas relativas ao estiramento do grupo carbonila, uma em 1735 cm^{-1} e outra em 1707 cm^{-1} , que podem ser justificadas em virtude da presença da lupenona e do éster.

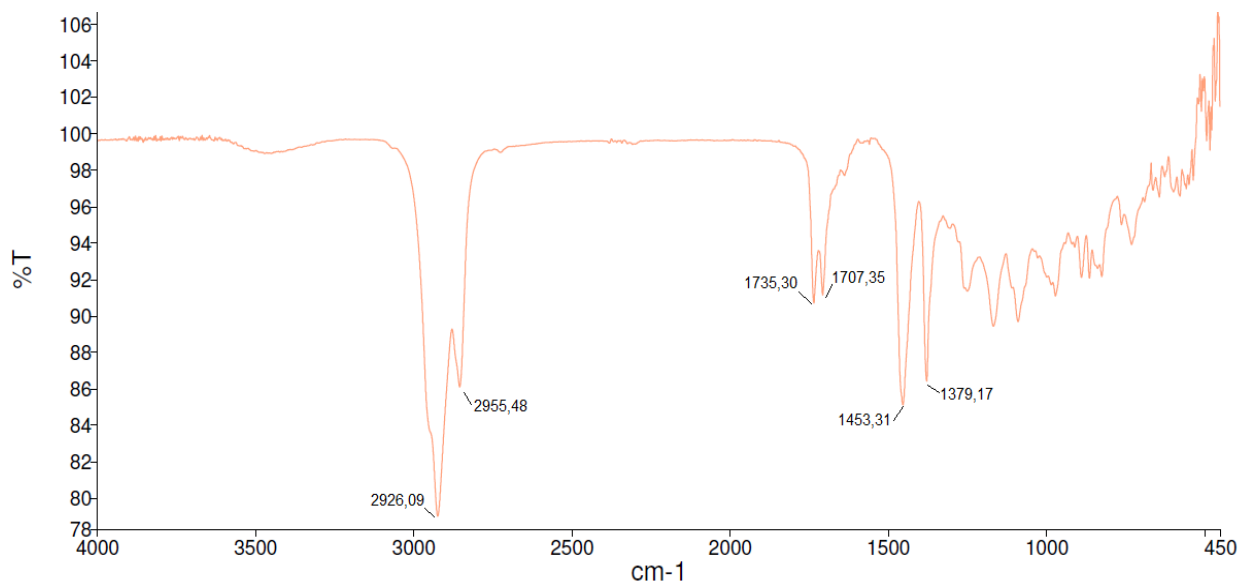


Figura 28 – Espectro na região do infravermelho da fração FDM22-34.

O espectro de massa da lupenona (lupen-3-ona) apresentou íon molecular M^+ = 424 (Figura 29). Um tipo de fragmentação originado por rearranjo de hidrogênio seguido pelo processo de Retro Diels-Alder (RDA) pode formar o íon base m/z = 218 ($C_{16}H_{26}$), como também a formação do íon m/z = 205 ($C_{14}H_{21}O$), este fragmento contempla a presença do grupo funcional carbonila (Esquema 5, Pág. 66). O fragmento m/z = 189 ($C_{13}H_{17}O$) pode ser originado do fragmento m/z = 205 pela perda da metila mais hidrogênio.

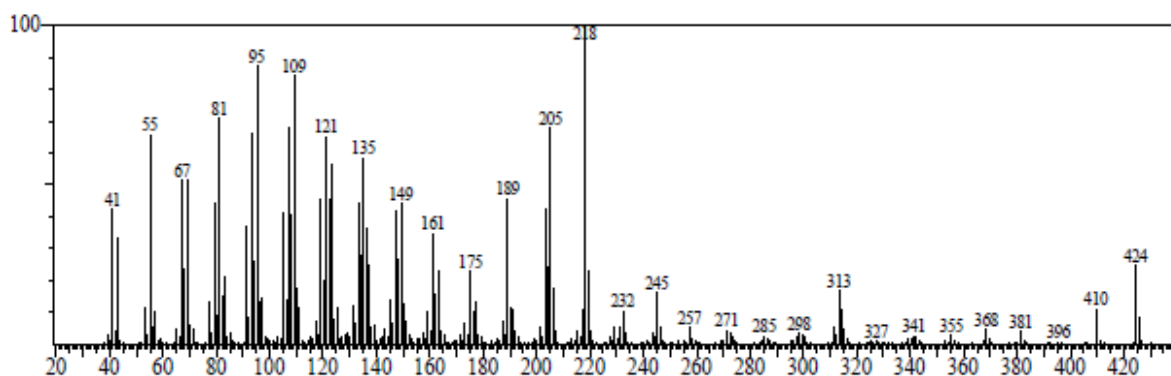
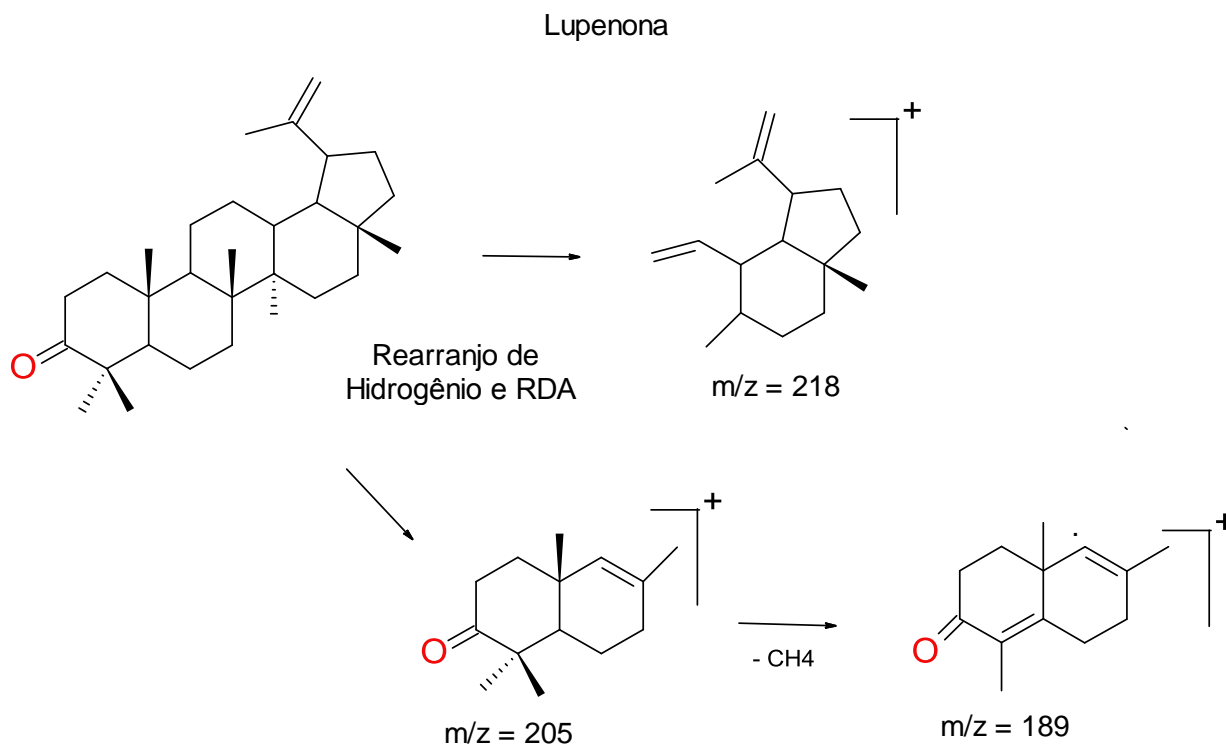


Figura 29 – Espectro de massa da lupenona.



Esquema 5 – Proposta de fragmentação da lupenona (MEBE et al., 1998).

O espectro de massa do α -tocoferol apresentou íon molecular em $M^+ + 1 = 431$ m/z (Figura 30). O tipo de fragmentação foi inteiramente compatível com o registrado no banco NIST (2010), com a exceção do íon molecular.

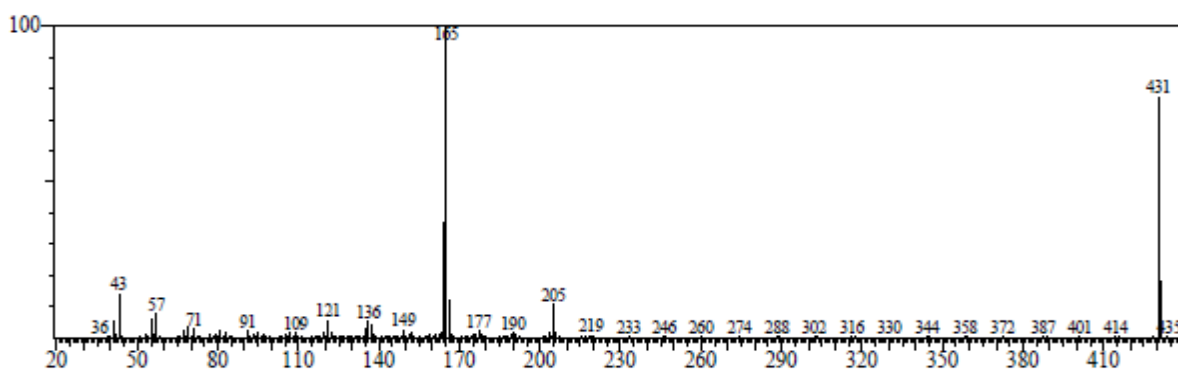
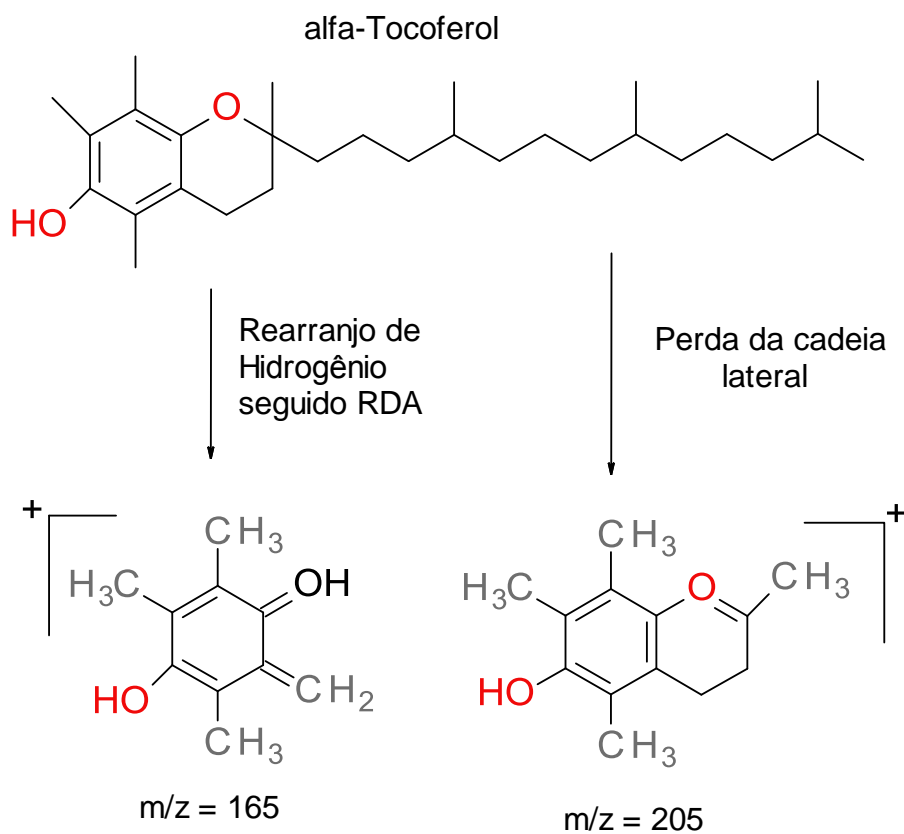


Figura 30 – Espectro de massa do α -tocoferol.

A análise do espectro de massa do α -tocoferol permitiu identificar alguns fragmentos compatíveis com o esqueleto do tocoferol. O espectro apresentou fragmentos íon base $m/z = 165$, originado do íon molecular ($M^+ = 430$ m/z) que sofreu fragmentação através de um rearranjo de hidrogênio seguido de uma quebra de ligação do tipo Retro Diels-Alder no anel pirânico do tocoferol ($C_{10}H_{13}O_2$)⁺

(Esquema 6). O fragmento $m/z = 205$ pode ser originado pela perda da cadeia lateral do tocoferol originado fragmento $(C_{13}H_{17}O_2)^+$.



Esquema 6 – Proposta de fragmentação do α -tocoferol.

4.2.5.1.4 – Identificação dos Constituintes da Fração FDM35-59

A fração FDM35-59 apresentou cromatograma com 4 compostos registrados, sendo possível a identificação de 100% dos constituintes (Figura 31, Pág. 68). Foram identificados dois óleos essenciais, o espatulenol (3,34%) e o óxido de cariofileno (0,62%) e dois triterpenos pentacíclicos: α -amirina (63,13%) e β -amirina (32,92%) (Tabela 9, Pág. 77).

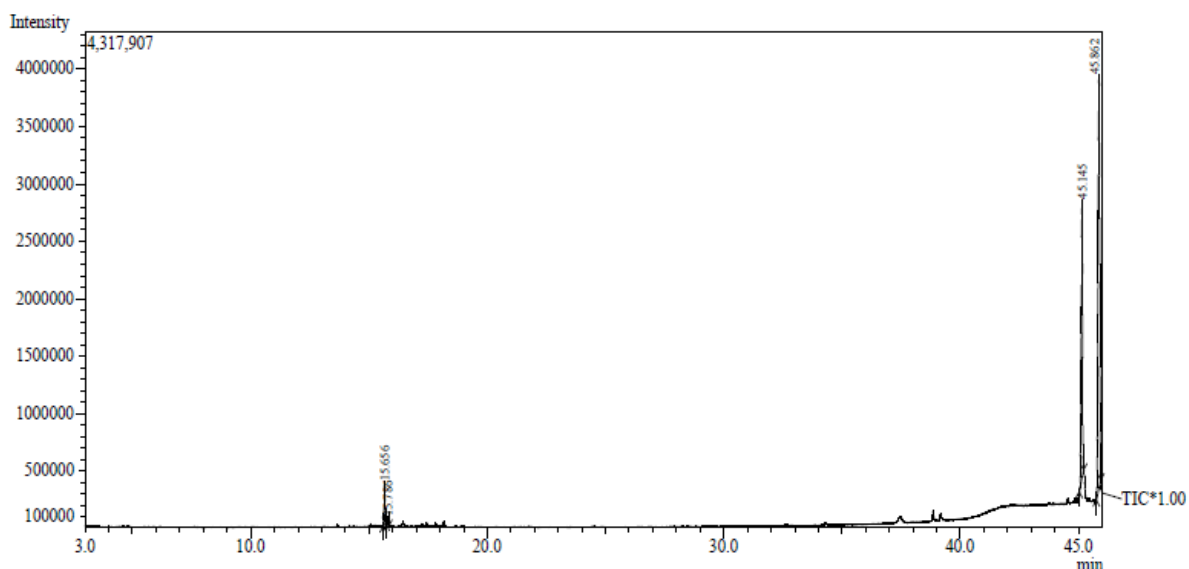


Figura 31 – Cromatograma da fração FDM35-59.

O espectro na região do infravermelho da fração FDM35-59 apresentou uma banda arredondada na região de 3276 cm^{-1} típica de estiramento de hidroxila (Figura 32), que pode ser justificada em função da presença da α e β -amirina. Apresentou também sinais de absorção típica de estiramento da ligação $\text{sp}^3\text{ C-H}$, assimétrico e simétrico dos grupos metila (CH_3) e metileno (CH_2) em 2916 e 2848 cm^{-1} , respectivamente. E duas bandas em 1461 a 1377 cm^{-1} características de deformação angular dos grupos metileno (CH_2) e metila (CH_3), respectivamente.

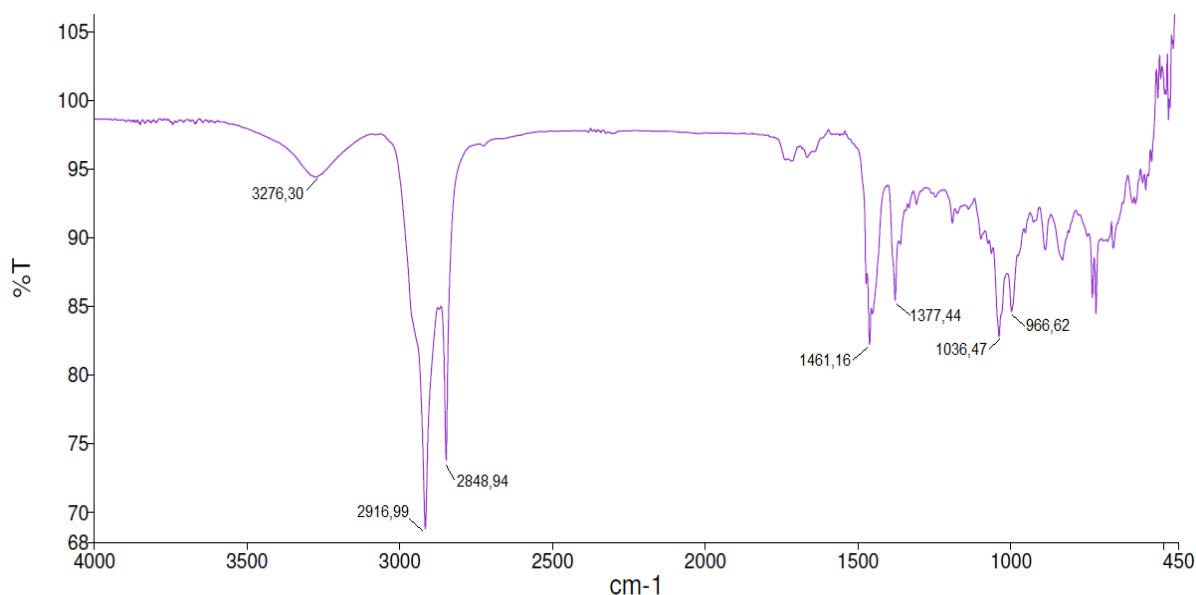


Figura 32 – Espectro na região do infravermelho da FDM35-59.

Os triterpenos pentacíclicos da série oleanano e ursano são frequentes nas espécies do gênero *Protium* (Burseraceae) (MARQUES, 2010c). Os esqueletos mais frequentes são β -amirina, da série oleanano e o α -amirina, da série ursano. Quando estes dois compostos estão presentes em amostras, formando uma mistura binária, normalmente a sua proporção relativa é aproximadamente de 1:2, respectivamente, determinada por método de ressonância magnética nuclear de hidrogênio, conforme Marques (2010c).

Os dois triterpenos pentacíclicos identificados, β -amirina com massa de 32,92% e a α -amirina, com 63,13%, apresentaram uma relação relativa em massa de 1:2, aproximadamente (Tabela 9, Pág. 77).

A análise do espectro de massa β -amirina não revelou o íon molecular $M^+ = 426$ m/z, revelando fragmento m/z = 411, correspondendo a $M^+ - (CH_3)$ (Figura 33). O espectro apresentou íon base em m/z = 218, característicos dos esqueletos das séries oleananos e ursanos. Este fragmento $(C_{16}H_{26})^+$ é originado pelo mecanismo do tipo Retro Diels-Alder que ocorre no anel C, facilitada em função da ligação dupla em C12 e C13 características dos compostos α e β -amirina (Esquema 7, Pág. 71). O fragmento m/z = 203 $(C_{15}H_{23})^+$ pode ser justificado do íon base, m/z = 218, formado pela perda do grupo metila (CH_3). Entretanto, o fragmento e m/z = 189 $(C_{14}H_{21})^+$ pode ser justificado através da formação do fragmento m/z = 207 $(C_{14}H_{23}O)^+$ de baixa intensidade nos espectros, originado no processo Retro Diels-Alder, com a perda de uma molécula de água.

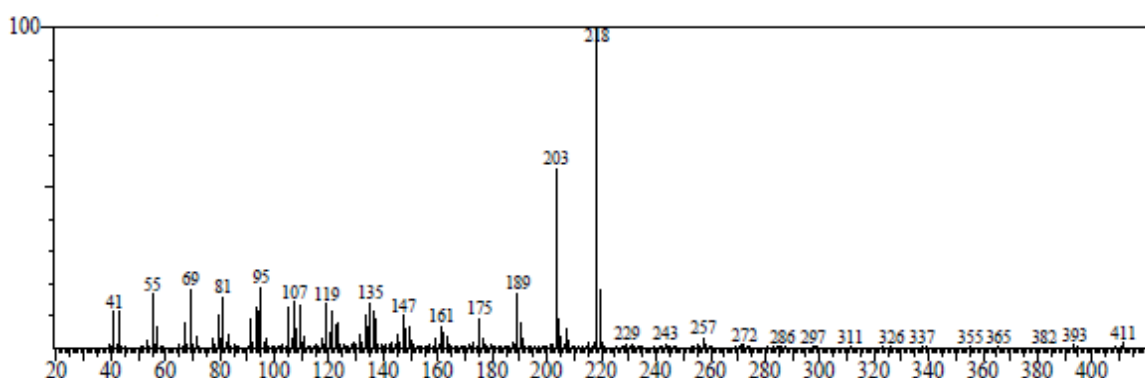


Figura 33 – Espectro de massa da β -amirina.

O espectro de massa da α -amirina apresentou íon molécula $M^+ = 426$ m/z como também o fragmento m/z = 411 (Figura 34, Pág. 70), relativo à perda de metila (CH_3) do íon molecular. O espectro mostrou também o bico base m/z = 218,

característicos de triterpenos pentacíclicos, bem como os fragmentos $m/z = 203$ e $m/z = 189$ (Esquema 7, Pág. 71).

Os espectros de massa da β -amirina e da α -amirina apresentam uma grande semelhança, diferenciando apenas na intensidade dos fragmentos. O espectro de massa da β -amirina apresenta baixa intensidade dos fragmentos entre 20-175 m/z , em relação ao espectro de massa da α -amirina. Outra diferença observada diz respeito aos fragmentos $m/z = 203$ e $m/z = 189$, que no espectro de massa da α -amirina o fragmento $m/z = 189$ é mais intenso que o fragmento $m/z = 203$. Esta característica é peculiar nos espectro de massa da α -amirina. Esses fragmentos no espectro de massa da β -amirina ocorrem uma inversão, o fragmento $m/z = 203$ é mais intenso do que o fragmento $m/z = 189$ (TAMAI et al., 1989).

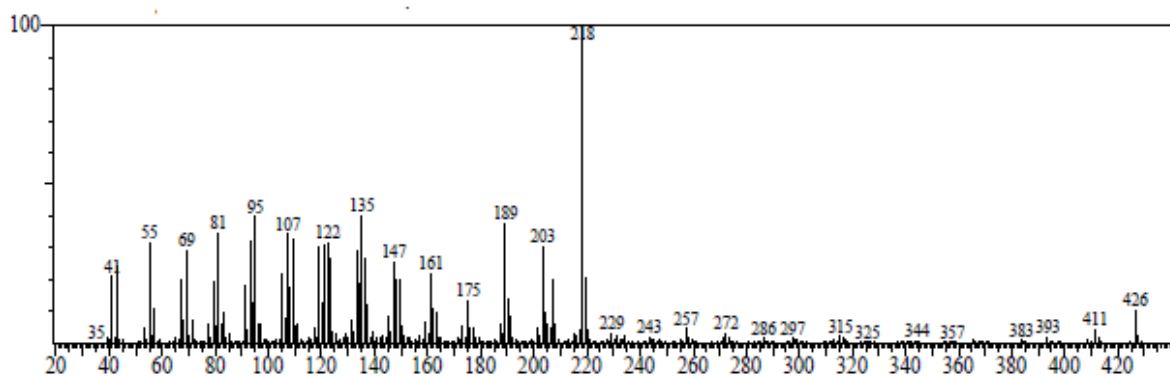
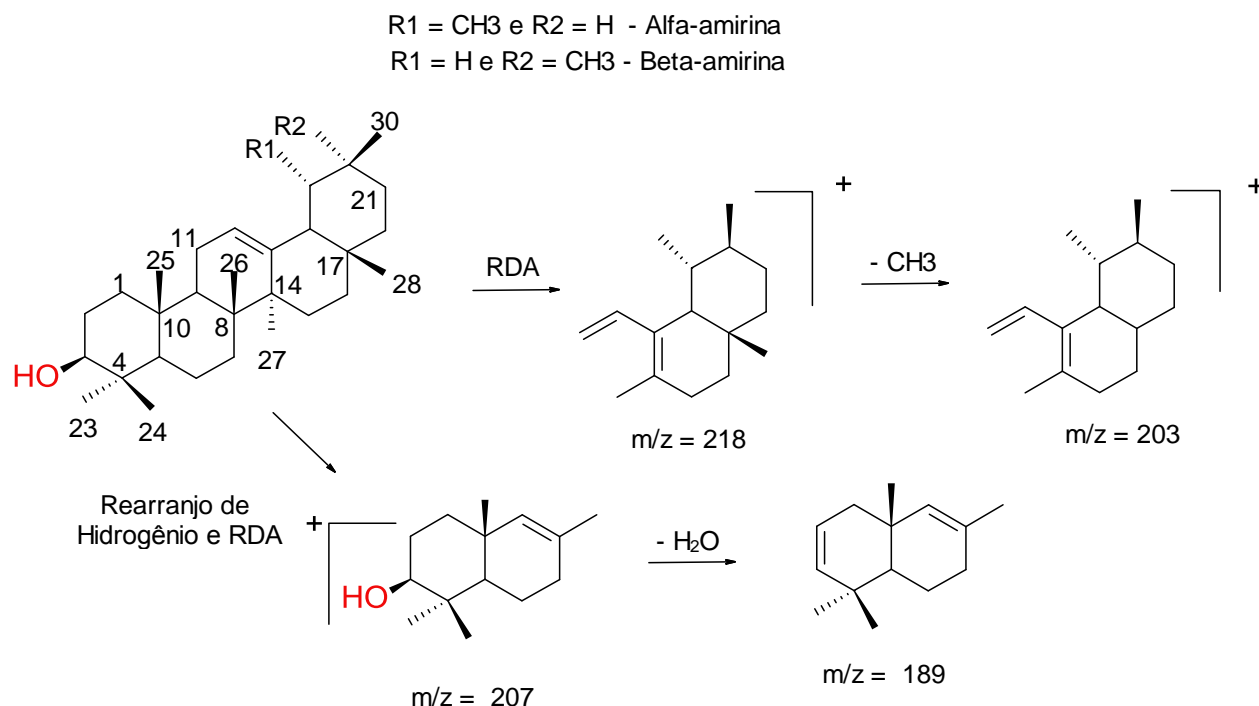


Figura 34 – Espectro de massa da α -amirina.



4.2.5.1.5 – Identificação dos Constituintes da Fração FDM60-72

A fração FDM60-72 apresentou um cromatograma registrando três compostos, onde um deles não foi possível de ser identificado (Figura 35, Pág. 72). Pela análise dos espectros de massa dos compostos registrados, foi possível identificar o estigmasterol (8,14%) e γ -sitosterol (83,09%) como o principal constituinte (Tabela 9, Pág. 77).

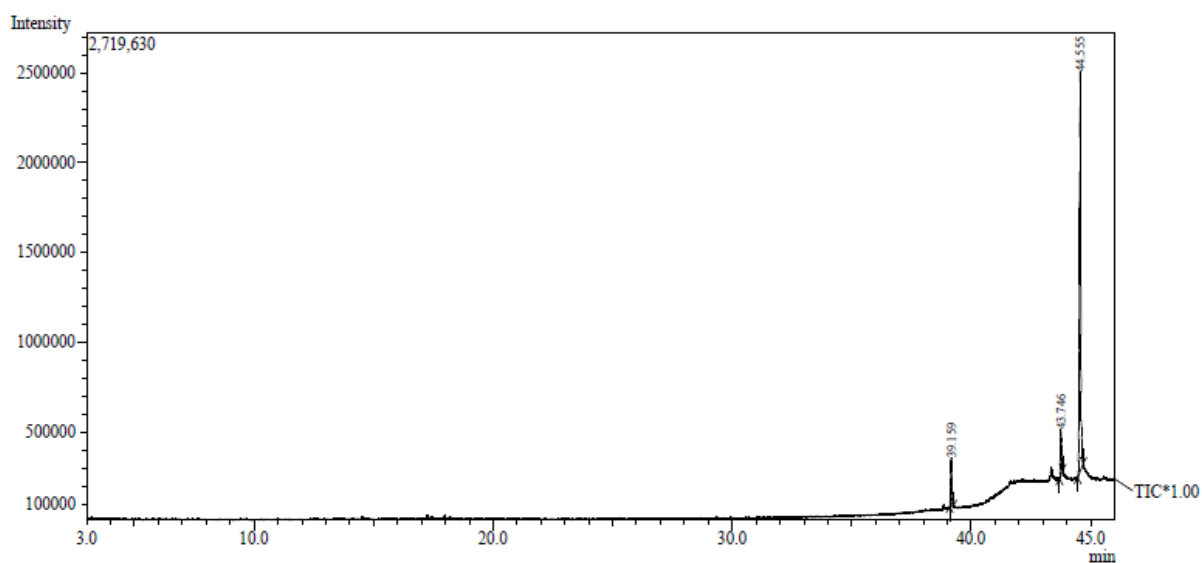


Figura 35 – Cromatograma da fração FDM60-72.

O espectro na região do infravermelho da mistura FDM60-72 permitiu identificar absorção relativa ao estiramento de hidroxila na região de 3421 cm^{-1} (Figura 36). A mistura apresentou como dois constituintes, o γ -sitosterol e o estigmasterol que justificam a presença do sinal relativo ao grupo funcional hidroxila.

O sinal em 1710 cm^{-1} característico de estiramento do grupo funcional carbonila pode ser justificado em função da presença de composto não identificado como também em função de compostos não registrado pelo cromatograma.

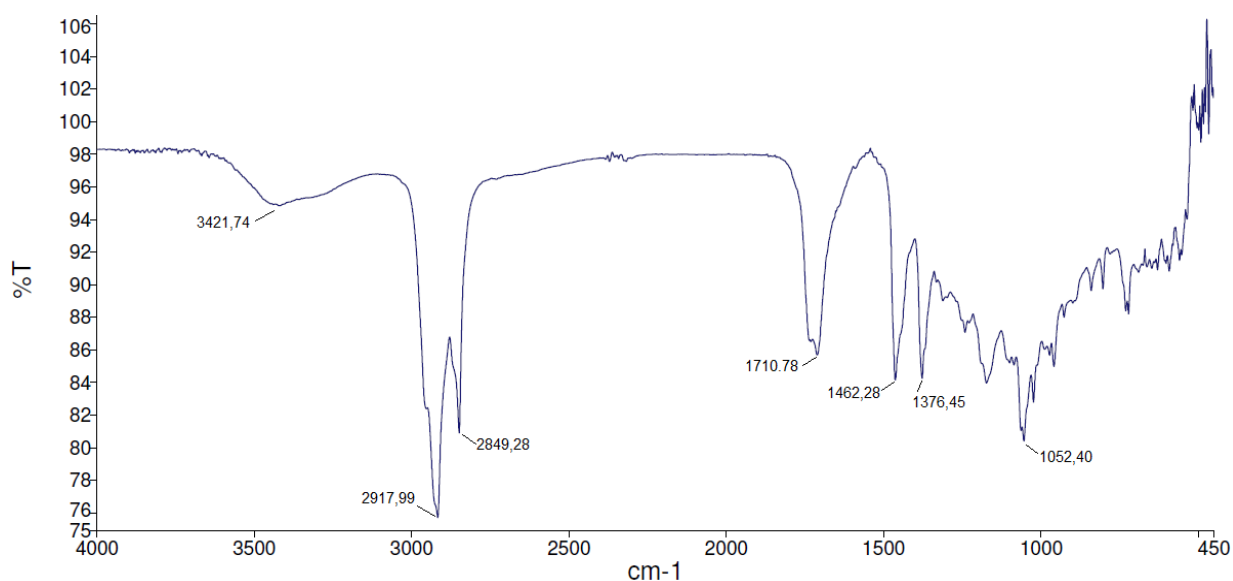


Figura 36 – Espectro na região do infravermelho da fração FDM60-72.

O espectro de massa registrado do estigmasterol (Figura 37) em comparação com o publicado no banco de dados do NIST (2010) mostrou o mesmo tipo de fragmentação.

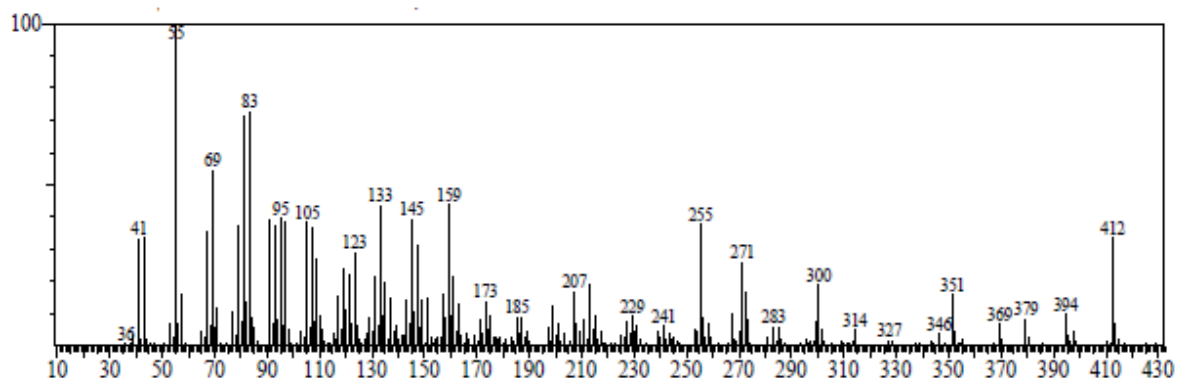


Figura 37 – Espectro de massa do estigmasterol.

A análise do espectro de massa do estigmasterol permitiu identificar o íon molecular $M^+ = 412$ m/z. Os fragmentos $m/z = 394$ e $m/z = 379$ podem ser relativos à perda da molécula de água (H_2O) e perda da molécula de água mais metila ($CH_3 + H_2O$) do íon molecular, respectivamente (Esquema 8, Pág. 75). Os íons $m/z = 369$, $m/z = 300$ e $m/z = 271$ podem ser originados pela perda da cadeia lateral, C_3H_7 , C_8H_{16} e $C_{10}H_{21}$, respectivamente. Outros fragmentos como $m/z = 351$, $m/z = 255$ e $m/z = 213$ podem ser justificados pela eliminação de uma molécula de água dos íons $m/z = 369$, $m/z = 271$ e $m/z = 229$ respectivamente.

A análise do espectro de massa do γ -sitosterol apresentou íon molecular $M^+ = 414$ m/z (Figura 38, Pág. 74). O espectro foi comparado com o banco de dados do NIST (2010) permitiu confirmar a estrutura pela ocorrência da semelhança do tipo de fragmentação.

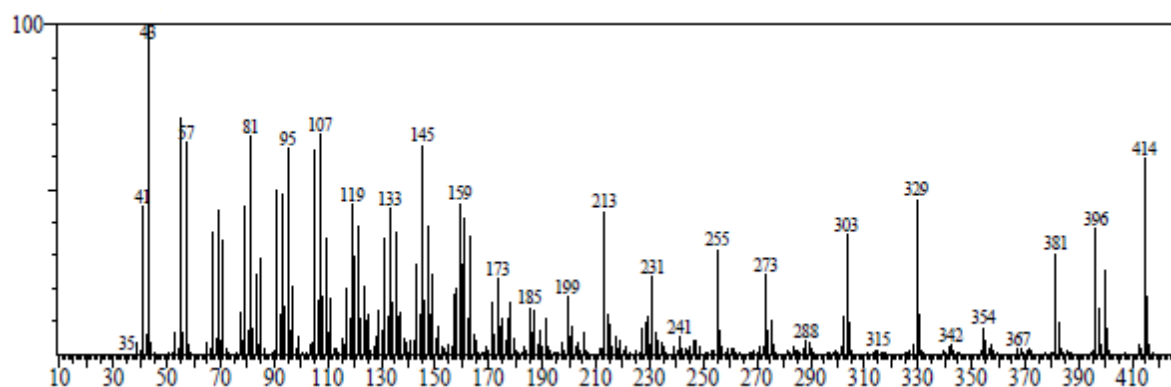
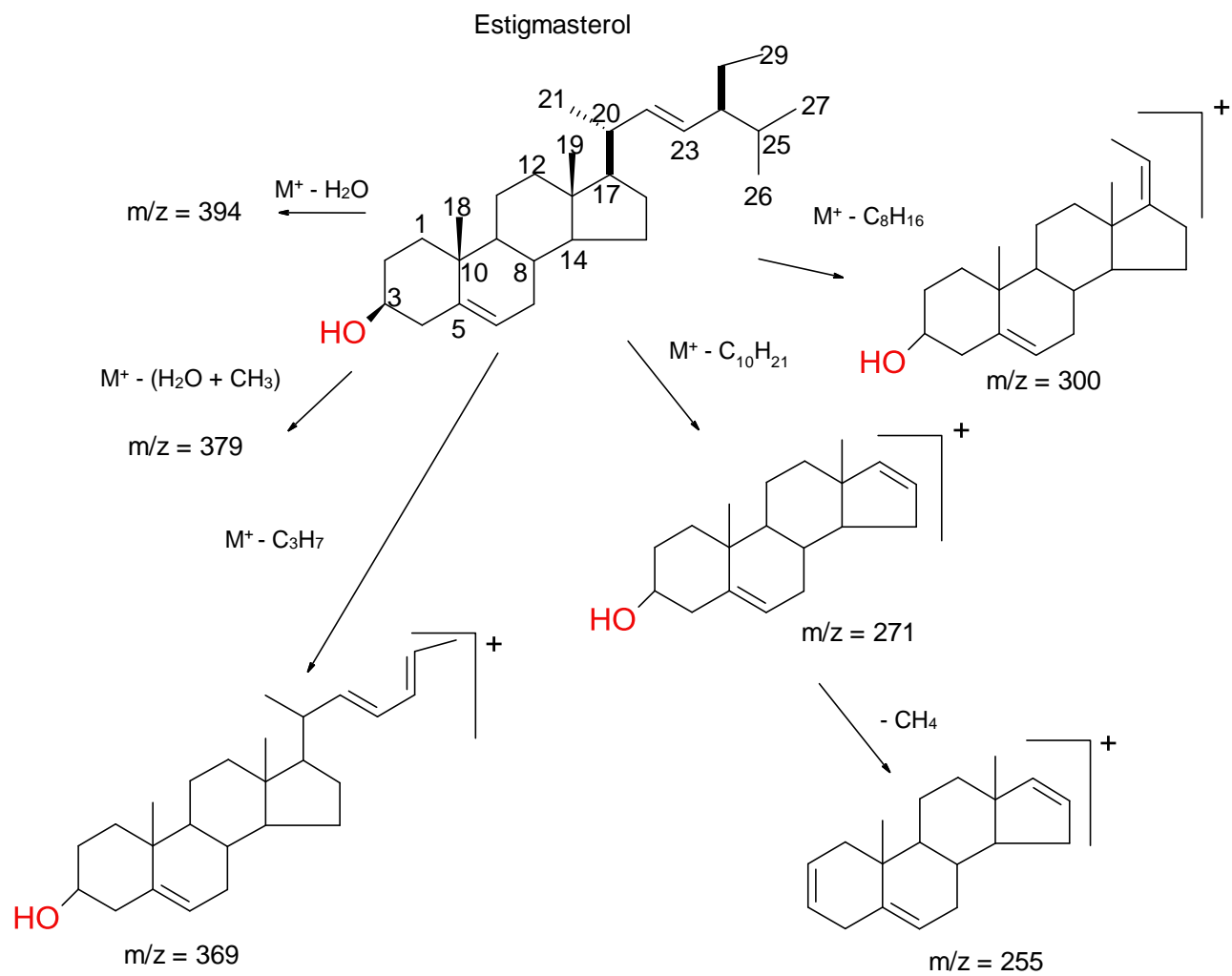


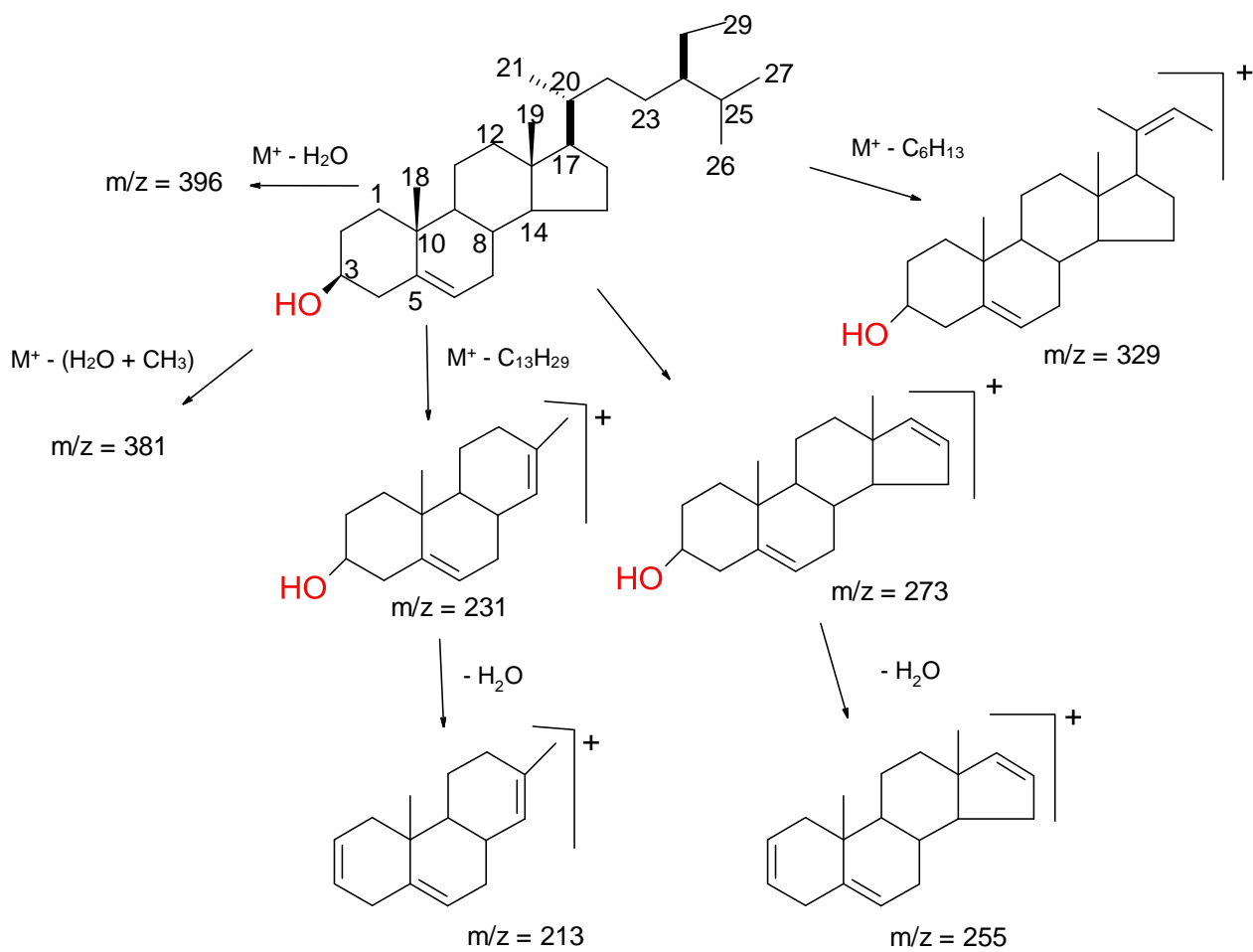
Figura 34 – Espectro de massa do γ -sitosterol.

A análise do espectro permitiu identificar alguns fragmentos como o íon $m/z = 396$, $m/z = 381$ oriundos da perda de uma molécula de água ($M^+ - H_2O$) e a perda água mais metila [$M^+ - (H_2O + CH_3)$], respectivamente (Esquema 9, Pág. 76). Os fragmentos íons $m/z = 329$ e $m/z = 271$ podem ser justificados pela perda da cadeia lateral [$M^+ - (C_6H_{13})$] e [$M^+ - (C_{19}H_{21})$], respectivamente, contudo não foi registrado o fragmento $m/z = 271$. Outros fragmentos, como $m/z = 255$ e $m/z = 213$, são justificados pela perda de uma molécula de água dos íons $m/z = 273$ e $m/z = 231$, respectivamente.



Esquema 8 – Proposta de fragmentação do estigmasterol.

Gama-Sitosterol



Esquema 9 – Proposta de fragmentação do γ - sitosterol.

Tabela 9 – Constituintes químicos das frações diclorometano (FDM) do extrato hexânico das folhas do *P. leptostachyum*.

Ord	Constituintes	T.R. (min)	I.K.	Amostras (%)				
				FDM 1	FDM 11-21	FDM 22-34	FDM 35-59	FDM 60-62
1	α -Copaeno	10,774	1376	1,07	*	*	*	*
2	<i>E</i> -Cariofileno	11,852	1419	1,28	*	*	*	*
3	α -Guaieno	12,276	1439	1,31	*	*	*	*
4	α -Humuleno	12,674	1454	0,56	*	*	*	*
5	γ -Muuroleno	13,207	1479	0,36	*	*	*	*
6	β -Silineno	13,473	1490	4,18	*	*	*	*
7	α -Silineno	13,681	1498	0,69	*	*	*	*
8	α -Muuroleno	13,779	1500	0,40	*	*	*	*
9	γ -Cadineno	14,122	1513	0,85	*	*	*	*
10	δ -Cadineno	14,331	1523	2,40	*	*	*	*
11	Espatulenol	15,656	1578	*	*	*	3,34	*
12	Oxido de Cariofileno	15,790	1583	*	*	19,73	0,62	*
13	Tetradecanal	16,352	1612	*	1,83	*	*	*
14	Não Identificado		*	*	*	5,56	*	*
15	Octadecanal	18,658	*	*	6,03	*	*	*
16	Hexadecanoato de metila	23,138	*	*	7,71	*	*	*
17	Hexadecanoato de etila	24,492	*	*	11,61	*	*	*
18	Octadecanoato de metila	27,035	*	*	1,89	*	*	*
19	Octadecanoato de etila	28,260	*	*	3,10	*	*	*
20	Hexadecanoato de ciclohexila	31,477	*	*	48,47	*	*	*
21	Não identificado	34,275	*	*	*	0,93	*	*
22	Ácido octadec-9-enoico	34,315	*	*	2,87	*	*	*
23	Octadecatri-9,12, 15-enoato de etila	34,418	*	*	*	1,43	*	*
24	(1-Metildecil)-cicloexano	34,715	*	*	11,99	*	*	*
25	Não identificado	39,159	*	*	*	*	*	8,77
26	Pentacosano (C25)	39,330	*	13,62	*	*	*	*
27	Heptacosano (C27)	40,605	*	1,29	*	*	*	*
28	Nonacosano (C29)	41,640	*	58,45	4,49	*	*	*
29	α -Tocoferol	42,152	*	*	*	25,78	*	*
30	Triacotano (C30)	42,645	*	2,27	*	*	*	*
31	Estigmasterol	43,746	*	*	*	*	*	8,14
32	Hentriacotano(C31)	43,835	*	11,27	*	*	*	*
33	γ -Sitosterol	44,555	*	*	*	*	*	83,09
34	Não identificado	44,771	*	*	*	11,10	*	*
35	β -Amerina	45,145	*	*	*	*	32,92	*
36	Lupenona	45,461	*	*	*	35,47	*	*
37	α -Amirina	45,862	*	*	*	*	63,13	*
Total Identificados em Massa (%)				100	100	82,41	100	91,23

T.R. = Tempo de retenção; I.K. = Índice de Kovats segundo Adans (2007); * = Não determinado.

4.2.5.2 – Identificação dos Constituintes das Frações Éter de Petróleo (FEP)

Após sucessivas colunas cromatográficas da fração éter de petróleo (FEP) das folhas do *P. leptostachyum* e as análises das frações obtidas por CCD, foram originadas três misturas impuras que foram codificadas por FEP1-2, FEP3-8 e FEP9-20 (Tabela 10, Pág. 85).

As frações foram analisadas em cromatógrafo gás-líquido acoplado a espectrômetro de massa (CGL/EM). A análise dos espectros de massa oriundos dos cromatogramas das frações analisadas permitiu registrar um total de 29 compostos, sendo que 13 não foram identificados. A análise dos espectros de massa permitiu identificar 8 compostos voláteis monos e sesquiterpenos, 4 triterpenos pentacíclicos, 1 aldeído, 1 éster, 1 hidrocarboneto e 1 composto da classe dos tocoferóis (α -tocoferol).

4.2.5.2.1 – Identificação dos Constituintes da Fração FEP1-2

O cromatograma da fração FEP1-2 registrou um total de 11 compostos, sendo que, 10 compostos foram identificados com 92,17% em massa dos constituintes registrados (Figura 39, Pág. 79). Foram identificados 5 compostos voláteis, sendo o óxido de cariofileno o constituinte em maior concentração (34,57%) entre eles, 1 aldeído: pentadecanal (1,89%), 3 triterpenos: β -amirina (1,76%), lupenona (6,42%) e friedooleanan-3-ona (3,53) e o α -tocoferol (37,92%), sendo este o mais abundante na fração.

O cromatograma da fração FEP1-2 registrou apenas o triterpeno β -amirina, em desacordo com os resultados demonstrados anteriormente na fração FDM, no qual foi identificada a presença da mistura binária (α e β -amirina). Entretanto na fração FEP9-20 foi também observada a presença da mistura binária.

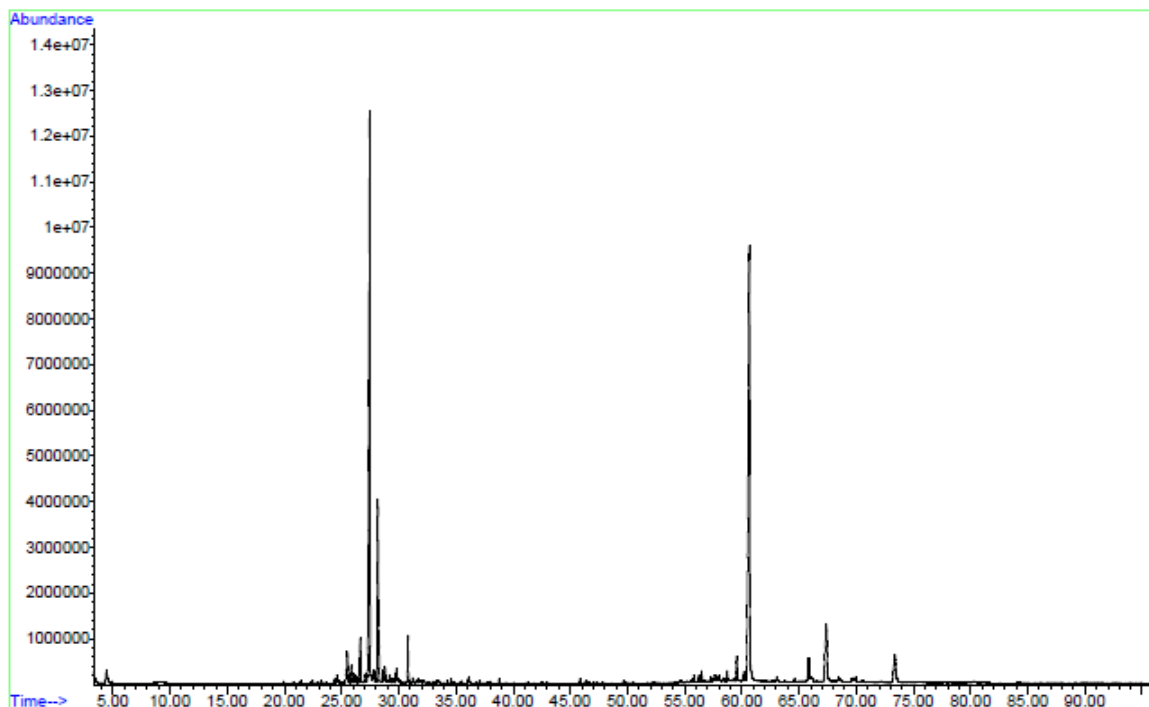


Figura 39 – Cromatograma da fração FEP1-2.

O espectro do infravermelho revelou absorção na região de 1736 cm^{-1} relativo ao grupo funcional carbonila que pode ser relacionado à presença da lupenona e do friedooleanan-3-ona (Figura 40).

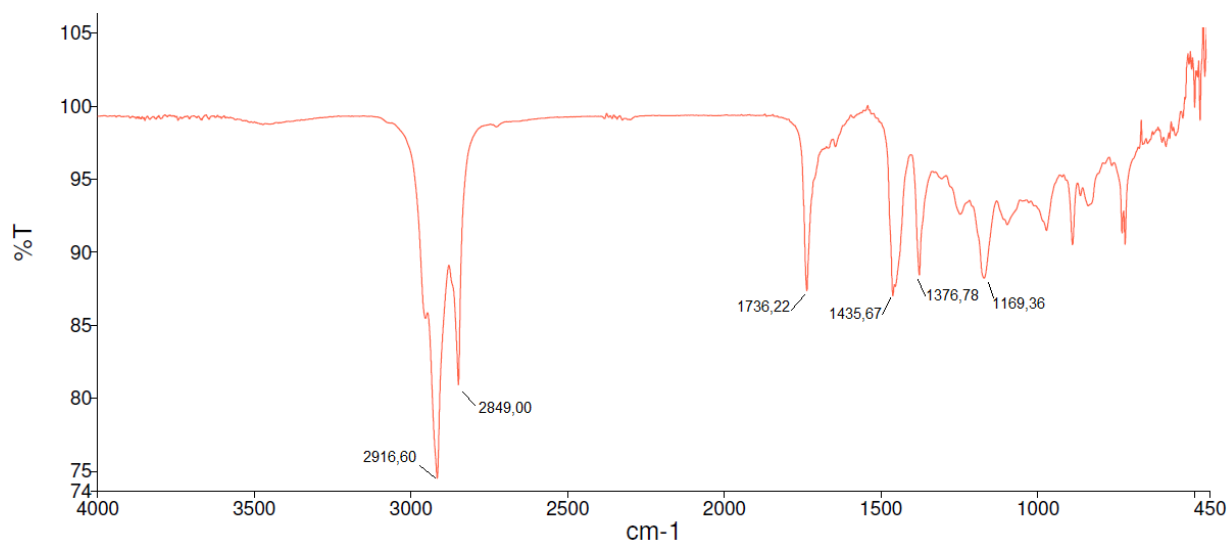


Figura 40 – Espectro na região do infravermelho da fração FEP1-2

O espectro de massa registrado do α -tocoferol (Figura 41, Pág. 80), revelou íon molecular $M^+ = 430\text{ m/z}$, diferentemente do registrado na amostra FDM 22-34. A

vitamina E (α -tocoferol) e o friedooleanan-3-ona foram identificados em todas as frações de éter de petróleo do extrato hexânico da folha (FEP) do *P. leptostachyum*.

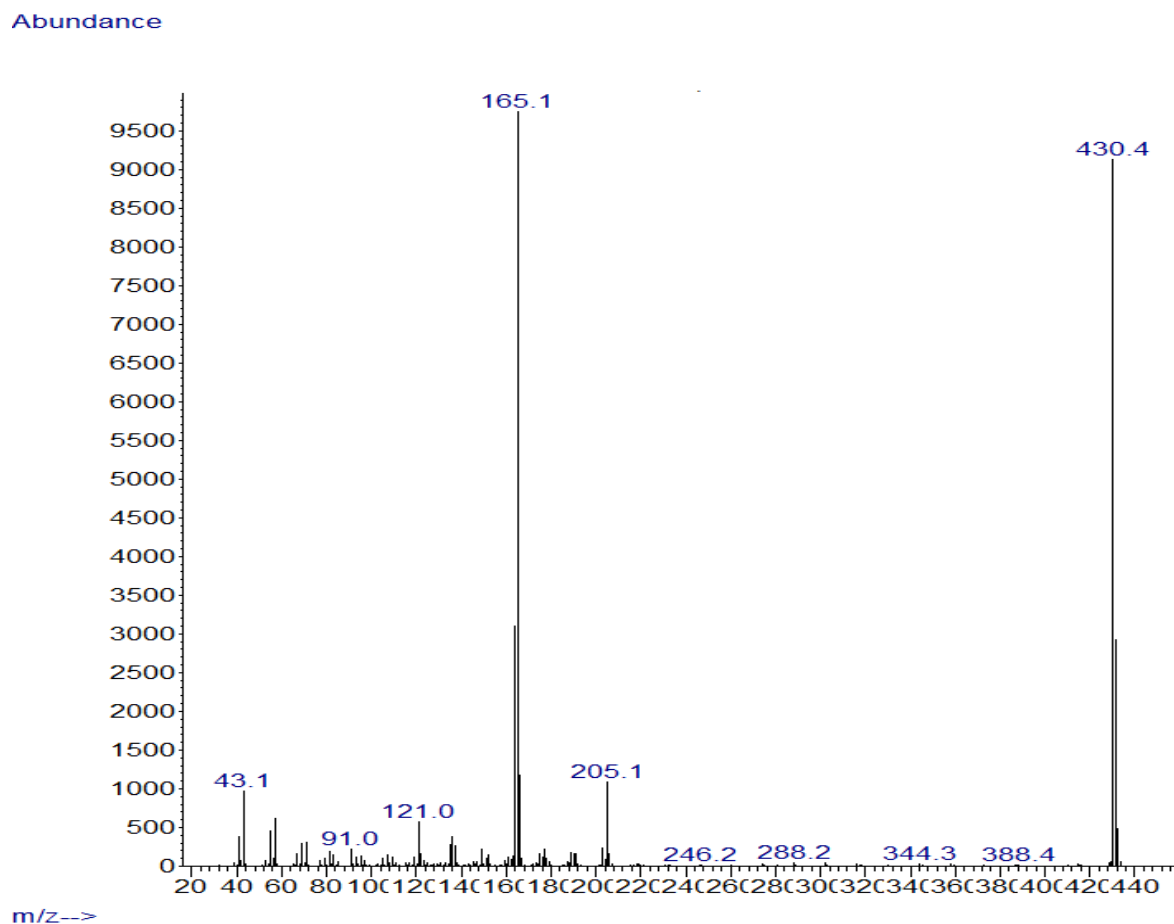


Figura 41 – Espectro de massa do α -tocoferol.

A análise do espectro de massa do friedelina ou friedooleanan-3-ona apresentou o íon molecular em $M^+ = 426$ m/z (Figura 42, Pág. 81). Uma comparação visual com o espectro de massa registrado pelo banco do NIST (2010) mostrou-se compatível com o espectro da friedooleanan-3-ona. O tipo de fragmentação característico de triterpeno pode justificar os fragmentos, como o m/z = 109 (C_7H_9O) contendo o grupo carbonila. Uma fragmentação originada através de rearranjo de hidrogênio e, em seguida, uma quebra do tipo de Retro Diels-Alder, característica dos triterpenos, pode justificar a formação do fragmento m/z = 205 ($C_{15}H_{25}$).

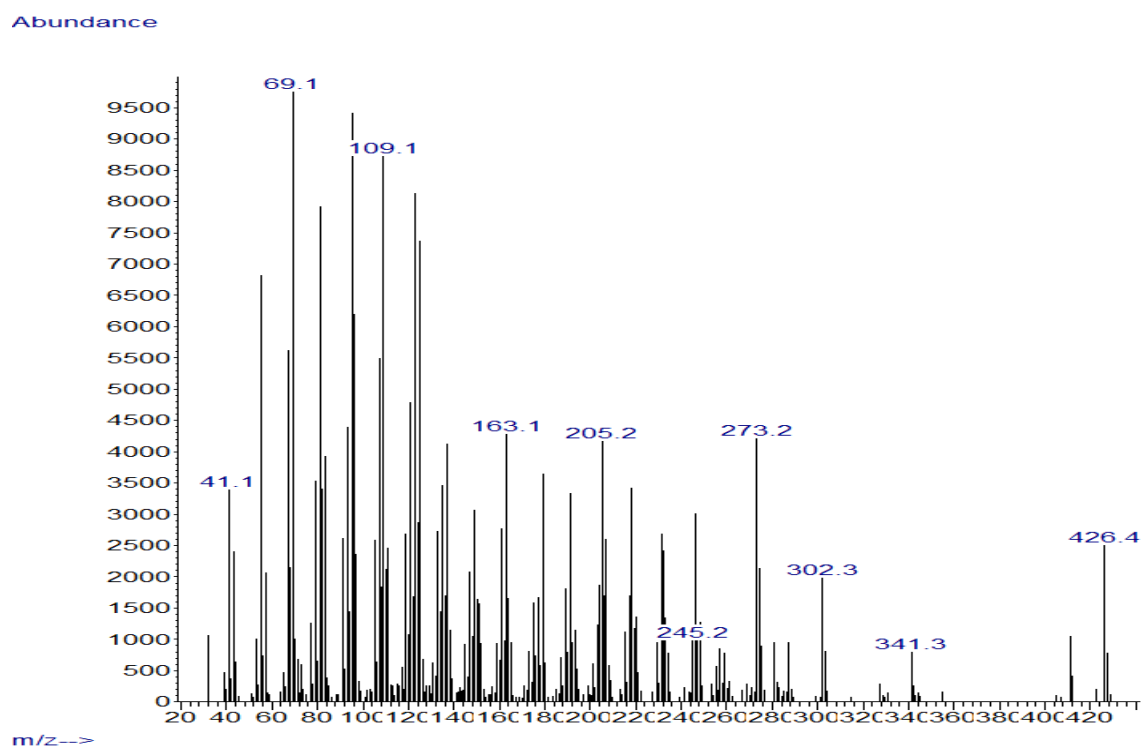


Figura 42 – Espectro de massa do friedooleanan-3-ona (Friedelina).

Friedooleanan-3-ona (Friedelina)

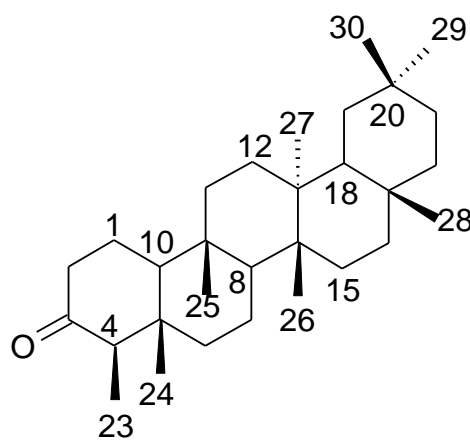


Figura 43 – Estrutura do friedooleanan-3-ona (friedelina).

4.2.5.2.2 – Identificação dos Constituintes da Fração FEP3-8

O cromatograma da fração FEP3-8 registrou um total de 11 compostos, sendo que 2 não foram possíveis de serem identificados, totalizando 87,35% em massa dos constituintes registrados (Figura 44, Pág. 82). Foi identificado o α -tocoferol (38,95%), como o mais abundante na fração, 4 compostos voláteis, sendo o óxido de cariofileno o segundo constituinte em maior concentração (24,44%), um aldeído:

pentadecanal (2,35%), um hidrocarboneto: hentriacotano (1,85%) e 2 triterpenos: lupenona (8,07%) e friedooleanan-3-ona (3,50%) (Tabela 10, Pág 85).

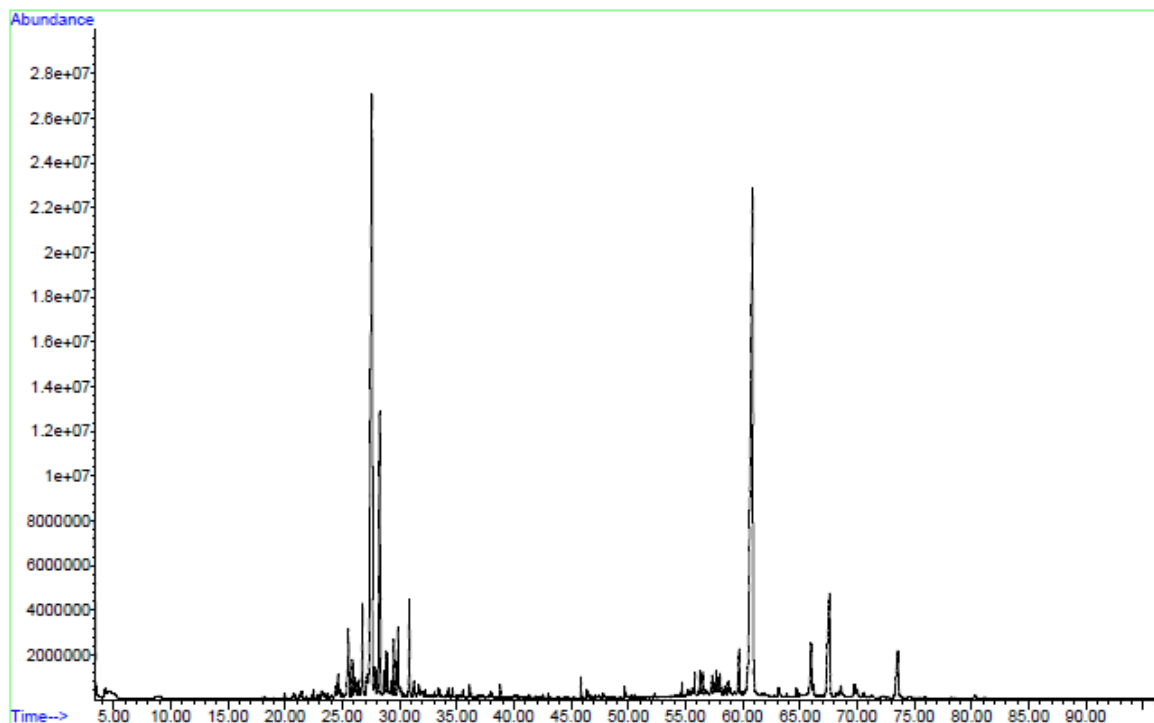


Figura 44 – Cromatograma da fração FEP3-8.

A análise da fração FEP3-8 permitiu registrar um composto com tempo de retenção 28,256 minutos com 11,24% em massa, que não foi possível ser identificado (Figura 45, Pág. 83). Conforme a análise do banco de dados do equipamento foi sugerido o decalino. A comparação com o espectro de massa do decalino do banco de dados do NIST (2010) não foi compatível apresentando divergências significativas.

Abundance

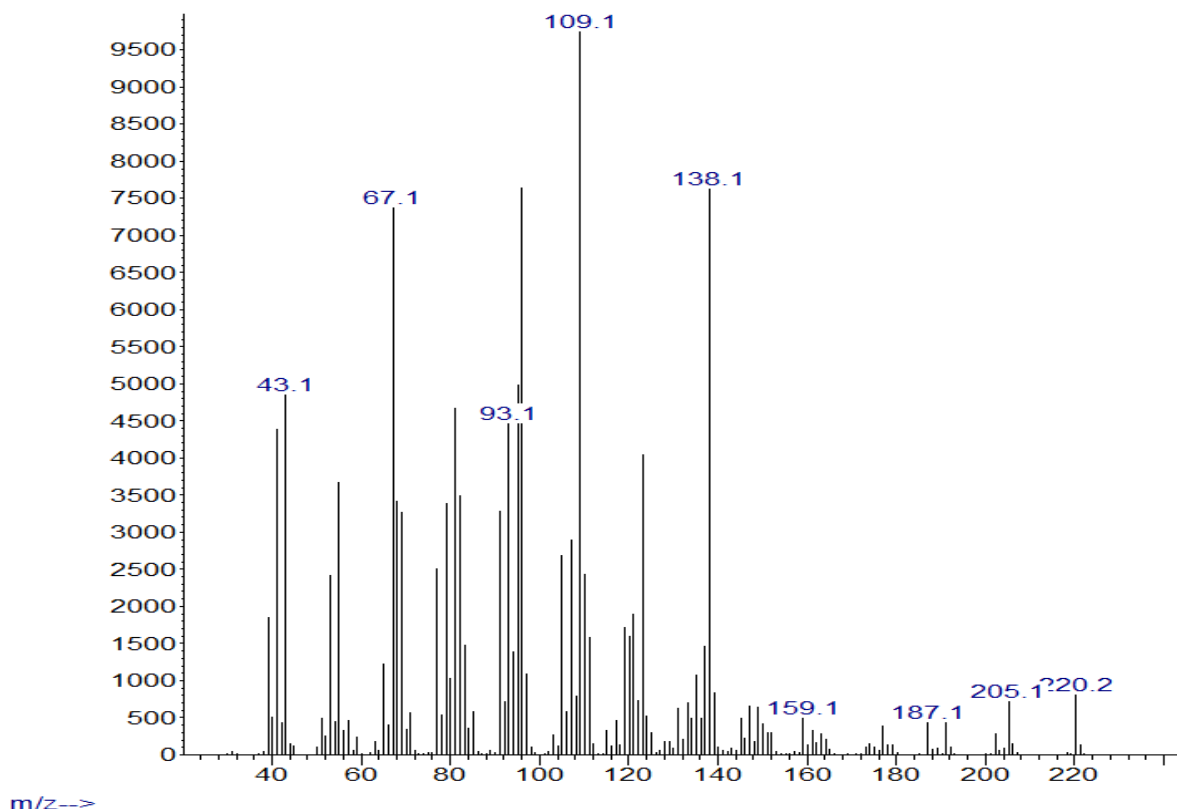


Figura 45 – Espectro de massa do composto não identificado (11% - decalino M^+ = 138 m/z, íon base não confirma).

4.2.5.2.3 – Identificação dos Constituintes da Fração FEP9-20

O cromatograma da fração FEP9-20 registrou um total de 23 compostos, sendo a fração que apresentou o maior número (47,8 %) de compostos não identificados (Figura 46, Pág. 84). Foram identificados 6 compostos voláteis, sendo o óxido de cariofileno (32,30%) o composto mais abundante na fração; 4 triterpenos: lupenona (8,06%), β -amirina (1,72%), α -amirina (2,59%) e friedooleanan-3-ona (1,03%), um éster aromático: fitalato de bi-(2-etilhexil) (1,26%) e o α -tocoferol (1,40%).

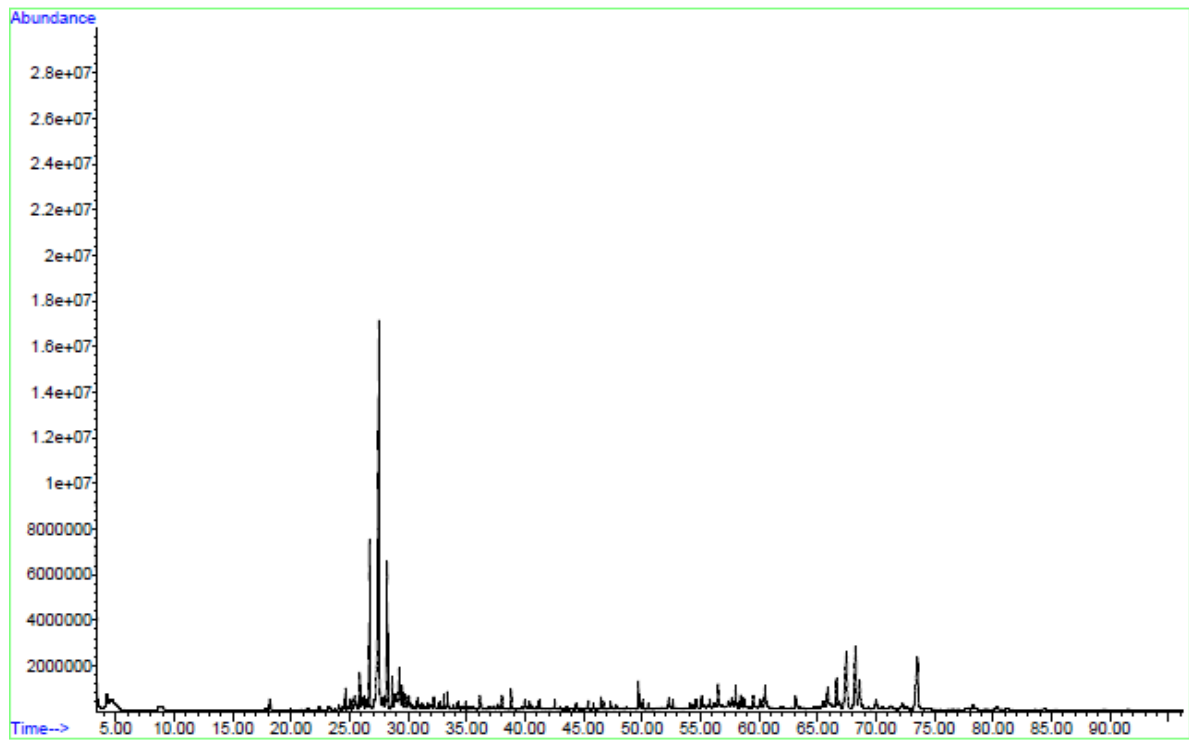


Figura 46 – Cromatograma da fração FEP9-20.

Tabela 10 – Constituintes químicos das frações éter de petróleo (FEP) do extrato hexânico das folhas do *P. leptostachyum*.

Ord	Compostos	T.R. (min)	I.K.	Amostras (%)		
				FEP 1-2	FEP 3-8	FEP 9-20
1	1,2-Dimetilbenzeno	4.432	*	1,39	*	*
2	Carvacrol	18.158	1299	*	*	1,11
3	epi-Cubebol	24.640	1494	*	*	1,44
4	δ-Candineno	25.494	1523	1,24	2,11	2,23
5	Não identificado	26.205	*	*	*	1,10
6	Nerolidol	26,749	1532	1,63	2,37	9,13
7	Oxido Cariofileno	27.454	1583	34,51	24,44	32,30
8	Não identificado	28.159	*	7,83	*	7,63
9	γ-Cadino-1,4-dieno	28.256	1534	1,87	*	1,70
10	Não identificado	28.256	*	*	11,24	*
11	Não identificado	28.282	*	*	*	3,37
12	Não identificado	28,631	*	*	*	1,75
13	Não identificado	29.485	*	*	1,41	*
14	Jatamol A	29.860	*	*	1,35	*
15	Pentadecanal	30.811		1,89	2,35	*
16	Não identificado	33.353	*	*	*	1,19
17	Fitalato de bi-(2-etilhexil)	49.673	*	*	*	1,26
18	Não identificado	56.491	*	*	*	1,02
19	Não identificado	57.992	*	*	*	1,32
20	Hentriacontano (C31)	59.687	*	*	1,85	*
21	α-Tocoferol	60.651		37,92	38,95	1,40
22	Não identificado	63.128	*	*	*	1,20
23	β-Amirina	65.871	*	1,76	*	1,72
24	α-Amirina	66,628	*	*	*	2,59
25	Lupenona	67.385	*	6,42	8,07	8,06
26	Não identificado	68,251	*	*	*	6,80
27	Não identificado	68.594	*	*	*	2,45
28	Não identificado	69.991	*	*	*	1,03
29	Friedooleanan-3-ona	73.374	*	3,53	3,50	1,03
Total de Compostos Identificados (%)				92,17	87,35	71,14

T.R. = Tempo de retenção; I.K. = Índice de Kovats segundo Adans (2007); * = Não determinado.

4.3 Atividade microbiológica

As atividades microbiológicas foram realizadas com as amostras oriundas do extrato hexânico das folhas: FEP, FDM e FET, do extrato hexânico e etanólico da casca e extrato etanólico do lenho da espécie *P. leptostachyum* e do óleo essencial da resina da espécie *P. hebetatum* contra 4 microrganismos responsáveis por infecções na pele, urinárias, gastrointestinais, respiratórias, hospitalares, e que frequentemente adquirem resistências aos antibióticos (Tabela 11).

Tabela 11 – Atividade microbiológica dos extratos do *P. leptostachyum* e do óleo essencial da resina do *P. hebetatum* frente às bactérias *Escherichia coli* (EC); *Klebsiella pneumoniae* (KP); *Staphylococcus aureus* (SA); *Streptococcus pneumoniae* (SP).

Amostras		EC (mm)	KP (mm)	SA (mm)	SP (mm)
Folha <i>P. leptostachyum</i>	FEP	nd	nd	nd	8,67 ± 0,58
	FDM	nd	nd	nd	nd
	FET	nd	nd	nd	nd
Casca <i>P. leptostachyum</i>	Ext. Hexano	nd	nd	nd	nd
	Ext. Etanol	nd	nd	nd	11,67 ± 0,58
Lenho <i>P. leptostachyum</i>	Ext. Etanol	nd	nd	13,00 ± 2,65	12,33 ± 4,73
Resina <i>P. hebetatum</i>	Óleo essencial	7,67 ± 2,89	8,50 ± 0,71	nd	nd

FEP = Fração éter de petróleo do extrato hexânico; FDM = Fração diclorometano do extrato hexânico; FET = Fração etanólica do extrato hexânico; nd = Não detectável.

A análise microbiológica da fração éter de petróleo (FEP) do extrato hexânico das folhas do *P. leptostachyum*, apresentou atividade microbiológica somente para a bactéria gram-positiva *Streptococcus pneumoniae*, com halo de inibição de 8,67 ± 0,58 mm. As amostras FDM e FET não apresentaram halo de inibição de crescimento. A atividade bactericida da amostra FEP pode estar relacionada com a presença dos constituintes majoritários como o óxido de cariofileno e o α-tocoferol, assim como, os triterpenos contidos em menor proporção na amostra ativa.

A amostra de extrato etanólico da casca apresentou atividade microbiológica somente para a bactéria gram-positiva *Streptococcus pneumoniae*, com halo de

inibição de $11,67 \pm 0,58$ mm. A amostra de extrato etanólico da lenho apresentou atividade microbiológica para as bactérias gram-positivas *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pneumoniae*, com halo de inibição de $13,00 \pm 2,65$ mm e de $12,33 \pm 4,73$ mm, respectivamente. Esses resultados podem ser justificados pela presença dos metabólitos secundários, alcaloides, flavonoides, triterpenos e taninos, que possuem atividade microbiológica comprovada (COWAN, 1999; CUNHA, 2005; RESCHKE et al., 2007).

O óleo essencial da resina do *P. hebetatum* apresentou atividade bactericida somente para as bactérias gram-negativas: *Escherichia coli* (EC) e *Klebsiella pneumonia* (KP). A composição química do óleo essencial apresentou uma variação de 28 constituintes, sendo o α -filandreno, E-cariofileno e o D-germacreno os constituintes que apresentaram a maior concentração relativa.

Marques (2010c) avaliou a atividade microbiana do óleo essencial da resina do *Protium hebetatum*, o qual apresentou atividade antimicrobiana frente às bactérias *Escherichia coli*; *Klebsiella pneumoniae*; *Staphylococcus aureus*, não coincidindo com todos os resultados obtidos. Pesquisas demonstram que inúmeros fatores influenciam na composição e no quantitativo dos óleos essenciais, e conseqüentemente podem influenciar nas suas atividades biológicas. Entre estes fatores destacam-se a maturidade da planta, horário de coleta, sazonalidade e recurso hídrico (MORAIS, 2009; OLIVEIRA et al., 2012).

5 CONCLUSÃO

O estudo do óleo essencial da resina do *P. hebetatum* apresentou um total de 28 constituintes correspondido a 77,620% de massa relativa. Os principais constituintes principais foram o α -filandreno (17,363%), E-cariofileno (11,160%) e D-germacreno (10,242%).

A prospecção qualitativa dos extratos etanólicos da casca e do lenho do *P. leptostachyum* apresentou resultados positivos para os metabólitos: taninos hidrolisáveis, ácidos orgânicos livres, açúcares redutores, glicosídeos cardiotônicos, triterpenos, flavonoides, saponinas e alcaloides.

A análise quantitativa de fenóis totais dos extratos metanólico, etanólico e acetônico da lenho e da casca do *P. leptostachyum* apresentou teores elevados de fenóis totais, sendo o extrato metanólico com o maior poder de extração com 185,553 e 226,868 mg EAG g⁻¹, respectivamente, tendo na casca o maior teor de fenóis totais. A quantificação de flavonoides no lenho e na casca do *P. leptostachyum* realizada com os mesmos extrativos, apresentou teor de flavonoides semelhantes para os extratos metanólico e etanólico, correspondendo para o lenho 21,439 e 26,953 mg EQCT g⁻¹, e para a casca 24,395 e 23,698 mg EQCT g⁻¹ respectivamente.

O quantitativo de cera cuticular por área foliar total corresponde a 97,58 $\mu\text{g cm}^{-2}$. A análise em CGL/EM da cera cuticular das folhas do *P. leptostachyum* apresentou 19 compostos voláteis, 3 aldeídos de cadeia longa: tetradecanal (C14), pentadecanal (C15) e octadecanal (C18), 5 hidrocarbonetos de cadeias longas: Pentacosano (C25), heptacosano (C27), nonacosano (C29), triacontano (C30), hentriacontano (C31) e (1-metildecil)-ciclohexano, 2 ésteres metílicos: hexadecanoato (C16), octadecanoato (C18), 3 ésteres etílicos: hexadecanoato (C16), octadecanoato (C18) e octadec-9,12,15-enoato (C18:9,12,15), 2 ésteres de cadeia mista: octadecanoato de ciclohexila e o ftalato de bi(2-metiletil) e um ácido octadecen-9-óico. Além desses constituintes, foram também identificados triterpenos pentacíclicos: β -amirina, α -amirina, lupenona, friedooleanan-3-ona, 2 esteroides o estigmasterol e γ -sitosterol e um composto da classe dos tocoferóis: α -tocoferol.

A amostra de extrato etanólico da casca apresentou atividade microbiológica somente para a bactéria gram-positiva *Streptococcus pneumoniae*. A amostra de extrato etanólico da lenho apresentou atividade microbiológica para as bactérias gram-positivas *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pneumoniae*. O óleo essencial da resina do *P. hebetatum* apresentou atividade bactericida somente para as bactérias gram-negativas: *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*.

Este é o primeiro estudo fitoquímico na literatura sobre a espécie *Protium leptostachyum*, contribuindo para ampliação do conhecimento científico sobre o gênero *Protium*, no qual, a mesma apresentou quantidades expressivas de compostos fenólicos, sendo base para futuras pesquisas, complementando este estudo, com isolamento, identificação de outros compostos e avaliação de suas aplicações.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAS, M. R. B.; SIMONEIT, B. R. T.; ELIAS, V.; CABRAL, J. A.; CARDOSO, J. N. Composition of higher molecular weight organic matter in smoke aerosol from biomass combustion in amazonia. **Chemosphere**, v. 30, n. 5, p. 995-1015, 1995.

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography quadrupole mass spectroscopy**, 4. ed. San Diego: Allured, 2007.

APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. **Anatomia vegetal**, 2 ed. Viçosa: Editora UFV, 2006

ARROYO-SERRALTA, G. A.; ZIZUMBO-VILLAREAL, D. EROSA, F. E.; PEÑA-RODRÍGUEZ, L. M. Cuticular wax composition of coconut palms and their susceptibility to lethal yellowing disease. **Journal of the Mexican Chemical Society**, v. 56, n. 1, p. 67-71, 2012.

BAKKER, M. L.; ALVARADO, P. I. Alcanos lineales de la cera cuticular de hojas de populus alba, *Populus deltoides* (salicaceae), *Robinia pseudoacacia* (fabaceae), *Ulmus pumila* (ulmaceae) y *Fraxinus americana* (oleaceae) en Tandil, Buenos Aires, Argentina. **Darwiniana**, v. 44, n. 1, p. 58-63. 2006.

BARBOSA, L. C. A. **Espectroscopia no Infravermelho na caracterização de compostos orgânicos**. 1. ed. Minas Gerais: Editora UFV, 2007

BARBOSA, W. L. R.; QUINARD, E.; TAVARES, I. C. C.; PINTO, L. N.; OLIVEIRA F. Q.; OLIVEIRA, R. M. Manual para análise fitoquímica e cromatográfica de extratos vegetais, ed. revisada. **Revista Científica da Universidade Federal do Pará**, v. 4, 2001.

BARGEL, H.; KOCH, K.; CERMAN, Z.; NEINHUIS, C. Structure–function relationships of the plant cuticle and cuticular waxes—a smart material?.**Functional Plant Biology**, v. 33, p. 893–910, 2006, apud FURSTNER, R.; BARTHLOTT, W.; NEINHUIS, C.; WALZEL, P. Wetting and self-cleaning properties of artificial superhydrophobic surfaces.**Langmuir**, v. 21, p. 956–961, 2005.

BARGEL, H.; KOCH, K.; CERMAN, Z.; NEINHUIS, C. Structure–function relationships of the plant cuticle and cuticular waxes—a smart material?.**Functional Plant Biology**, v. 33, p. 893–910, 2006.

BONDADA, B. R.; OOSTERHUIS, D. M.; MURPHY, J. B.; KIM, K. S. Effect of water stress on the epicuticular wax composition and ultrastructure of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) leaf, bract, and boll. **Environmental and Experimental Botany**, v. 36, p. 61-69, 1996.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Formulário de Fitoterápicos Farmacopéia Brasileira**, 1. ed. Brasília: Anvisa, 2011

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 971. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília: Ministério da Saúde, 2006a. Disponível em:
<http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2006/prt0971_03_05_2006.html>. Acesso em: 20 maio 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos. Brasília: Ministério da Saúde, 2006b. 60 p.

BUSCHHAUS, C.; JETTER, R. Composition differences between epicuticular and intracuticular wax substructures: How do plants seal their epidermal surfaces?. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 3, p. 841-853, 2011.

CORDEIRO, S. Z.; SIMAS, N. K.; ARRUDA, R. C. O.; SATO, A. Composition of epicuticular wax layer of two species of *Mandevilla* (Apocynoideae, Apocynaceae) from Rio de Janeiro, Brazil. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 39, n. 3, p. 198-202, 2011.

COSTA, T. O. G.; ALMEIDA, R. A.; KOOLEN, H. H. F.; SILVA, F. M. A.; PINTO, A. C. Constituintes químicos do caule de *Protium hebetatum* (Burseraceae). **Acta Amazonica**, v. 42, n. 4, p. 557-560, 2012.

COWAN, M.M. Plants products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v.12, n.4, p.564-82, 1999.

CUNHA, A. P. Estudo dos principais constituintes de natureza fenólica, provenientes da via ácido chiquímico e da via acetato – III. In: _____. **Farmacognosia e Fitoquímica**. 1. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2005. cap 10 – 15, p. 212 – 335.

CUNHA, V. C.; SANTOS, J. B.; GUIMARÃES, C. G.; RIBEIRO, K. G.; MIRANDA, R. R. S.; SILVA, D. V.; CONCENÇOS, G. Leaf area and epicuticular wax content of *Sida* spp. **Revista Ceres**, v. 61, n.2, p. 172-177, 2014.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: A biosynthetic approach**. 2. ed. Inglaterra: John Wiley, 2004. 507p.

DO, Q. D.; ANGKAWIKAYA, A. E.; TRAN-NGUYEN, P. L.; HUYNH, L. H.; SOETAREDJO, F. E.; ISMADJI, S.; JU, Y. Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 22, n. 3, p. 296–302, 2014.

DOMINGUEZ, E.; HEREDIA, A. Waxes: a forgotten topic in lipid teaching. **Biochemical Education**, v. 26, p. 315-316, 1998.

ENCINA, J. **Organización histológica em las plantas vasculares**. Disponível em: <<http://biologiadelatortilla.blogspot.com.br/>>. Acesso em 30 nov. 2015.

FERREIRA, E. A.; DEMUNER, A. J.; SILVA, A. A.; SANTOS, J. B.; VENTRELLA, M. C.; MARQUES, A. E.; PROCÓPIO, S. O. Composição química da cera epicuticular e caracterização da superfície foliar em genótipos de cana-de-açúcar. **Planta Daninha**, v. 23, n. 4, p. 611-619, 2005.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GOTTLIEB, O. R.; KAPLAN, M. A. C. Amazônia: tesouro químico a preservar. **Ciência Hoje**, v. 11, n. 61, p. 17-20, 1990.

GUIMARÃES, A. A.; FERREIRA, E. A.; VARGAS, L.; SILVA, A. A.; VIANA, R. G.; DEMUNER, A. J.; CONCENÇO, G.; ASPIAZU, I.; GALON, L.; REIS, M. R.; SILVA, A. F. Composição química da cera epicuticular de biótipos de azevém resistente e suscetível ao glyphosate. **Planta Daninha**, v. 27, n. 1, p. 149-154, 2009.

HERODIA, A. Biophysical and biochemical characteristics of cutin, a plant barrier biopolymer. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1620, p. 1-7, 2003.

JARDIM, M. A. G.; SILVA, J. C.; COSTA-NETO, S. V. Fitoterapia popular e metabólitos secundários de espécies vegetais da Ilha de Algodual, Município de

Maracanã, Estado do Pará, Brasil – Resultados preliminares. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 83, n. 3, p. 117-118, 2005.

LI F.; WU X.; LAM P.; BIRD D.; ZHENG H.; SAMUELS L.; JETTER R.; KUNST L. Identification of the Wax Ester Synthase/Acyl-Coenzyme A: Diacylglycerol Acyltransferase WSD1 Required for Stem Wax Ester Biosynthesis in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 148, n. 1, p. 97-107, 2008.

LI, Y.; BEISSON, F. The biosynthesis of cutin and suberin as an alternative source of enzymes for the production of bio-based chemicals and materials. **Biochimie**. v. 91, p. 685-691. 2009

LOBO, A. M.; LOURENÇI, A. M. **Biossíntese de produtos naturais**. ISS Press: Lisboa, Portugal, 272p. 2007.

MAGALHÃES, M.; HESPANHA, L.; SCORALICK, L.; MATTOS, V.; CARVALHO, V.; HATHERLY, M. ROCHA, D. **As folhas das Angiospermas**. Disponível em: <<http://angiospermbotanic.blogspot.com.br/2010/07/as-folhas-das-angiospermas.html>>. Acesso em 29 nov. 2015.

MARQUES, D. D. **Contribuição ao conhecimento químico da flora Acreana: *Protium hebetatum* Daly, *Protium heptaphyllum* (Aublet) Marchand subsp. *ulei* (Swat) Daly e *Protium heptaphyllum* (Aublet) Marchand subsp. *heptaphyllum***. 2010. 252 f. Tese (Doutorado em Química Orgânica)-Universidade Federal do Ceara, Fortaleza, 2010c.

MARQUES, D. D.; GRAEBNER, I. B. ; LEMOS, T. L. G. ; MACHADO, L. L. ; MONTE, F. J. Q. ; ASSUNCAO, J. C. C. . Triterpenes from *Protium hebetatum* Resin. **Natural Product Communications**, v. 5, p. 1181-1182, 2010a.

MARQUES, D. D.; SARTORI, R. A.; LEMOS, T. L. G.; MACHADO, L. L.; SOUZA, J. S. N.; MONTE, F. J. Q. Chemical composition of the essential oils from two subspecies of *Protium heptaphyllum*. **Acta Amazonica**, v. 40, n. 1, p. 227-230, 2010b.

MATOS, F. J. A. **Introdução a Fitoquímica Experimental**. 2. ed. Fortaleza: UFC, 1997. 141 p.

MEBE, P. P.; CORDELL, G. A.; PEZZUTO, J. M. Pentacyclic triterpenes and naphthoquinones from *Euclea divinorum*. **Phytochemistry**, v. 47, n. 2 p. 311-313, 1998.

MIMURA, M. R. M.; SALATINO, M. L. F.; SALATINO, A.; BAUMGRATZ, J. E. A. Alkanes from foliar epicuticular waxes of *Huberia* species: Taxonomic implications. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 26, p. 581-588, 1998.

MORAIS, L. A. S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. *Horticultura Brasileira*, v. 27, n. 2, p. 4050-4063, 2009.

NATIONAL Institute of Standards and Technology. Chemistry WebBook. disponível em: <<http://webbook.nist.gov/chemistry/>>. Acesso em 15 de abr. 2016.

NCCLS. Padronização dos Testes de sensibilidade a antimicrobianos por disco-difusão: norma aprovada. 8 ed., p. 58, NCCLS, Pensilvania, Estados Unidos da América., 2003.

OLIVEIRA, A. R. M. F.; JEZLER, C. N.; OLIVEIRA, R. A.; COSTA, L. C. B. Influência da idade da planta na produção de óleo essencial de alevante. *Revista Ceres*, Viçosa, MG, v. 59, n. 2, p. 241-245, 2012

PERES, L. E. P. **Metabolismo secundário**. São Paulo: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2004.

PIGHIN, J. A.; ZHENG, H.; BALAKSHIN, L. J.; GOODMAN, I. P.; WESTERN, T. L.; JETTER, R. KUNST, L.; SAMUELS, A. L. Plant cuticular lipid export requires an ABC transporter. **Science**, v. 306: p. 702-704. 2004.

PORTER, L. J.; HRSTICH, L. N.; CHAN, B. G. The conversion of procyanidin and prodelphinidins to cyaniding and delphinidin. **Phytochemistry** v.25, p. 223–230, 1986.

POST-BIETTENMILLER, D. Biochemistry and molecular biology of wax production in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**.v.47, p. 405-430, 1996.

PROKSCH, P.; STERNBURG, C.; RODRIGUEZ, E. Short Communication: Epicuticular Alkanes from Desert Plants of Baja California. **Biochemical Systematics, and Ecology**, v. 9, n. 2-3, p. 205-206, 1981.

RESCHKE, A.; MARQUES, L.M.; MAYWORM, M.A.S. Atividade antibacteriana de *Ficus benjamina* L. (Moraceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 9, n. 2, p. 67-70, 2007.

RIBEIRO, J. E. L.; HOPKINS, M. J. G.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C. A.; COSTA, M. A. S.; BRITO, M. J.; SOUZA, M. A. D.; MARTINS, L. H. P.; LOHMANN, L. G.; ASSUNÇÃO, P. A. C. L.; PERREIRA, E. C.; SILVA, C. S.; MESQUITA, M. R.; PROCOPIO, L. C. **Flora da reserva Ducke: guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra firme na Amazônia Central**. Manaus: IMPA, 1999.

SIANI, A. C.; GARRIDO, I. S.; MONTEIRO, S. S.; CARVALHO, E. S.; RAMOS, M. F. S. *Protium icariba* as a source of volatile essences. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, n. 5, p. 477-489, 2004.

SIQUEIRA, J. B. G. **Estudo químico do genero Protium: *P. unifoliolatum* (Engl.) Engl. e *P. laxiflorum* Engl. (Burseraceae)**. Manaus, 1991, 189f. Dissertação (Mestrado em Química de Produtos Naturais), Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, Universidade Federal da Amazônia.

TAFOLLA-ARELLANO, J. C.; GONZÁLEZ-LEÓN, A.; TIZNADO-HERNÁNDEZ, A. E.; GARCIA, L. Z.; BÁEZ-SAÑUDO, R. Composición, fisiología y biosíntesis de la cutícula en plantas. **Revista Fitotecnia Mexicana**, v. 36, n. 1, p. 3-12, 2013.

TAMAI, W.; WATANABE, N.; SOMEYA, M.; KONDOH, H.; OMURA, S.; LING, Z. P.; CHANG, R.; MING, C. W. New hepatoprotective triterpenes from *Canarium album*. **Planta Medica**, v. 55, p. 44-47, 1989.

VIANA, R. G.; TUFFI SANTOS, L. D.; DEMUNER, A. J.; FERREIRA, F. A.; FERREIRA, L. R.; FERREIRA, E. A.; MACHADO, A. F. L.; SANTOS, M. V. Quantificação e composição química da cera epicuticular de folhas de eucalipto. **Planta Daninha**, v. 28, n. 4, p. 753-758, 2010.

VRKOSLAV, V.; URBANOVA, K.; CVACKA, J. Analysis of wax ester molecular species by high performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 4184-4194, 2010.

WEEKS, A.; DALY, D. C.; SIMPSON, B. B. The phylogenetic history and biography of the frankincense and myrrh family (Burseraceae) based on nuclear and chloroplast sequence data. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 35, p. 85-101, 2005.

YEATS, T. H.; ROSE, J. K. C. The Formation and Function of Plant Cuticles. **Plant Physiology**, v. 163, p. 5-20, set. 2013.

ZOGHBI, M. G. B.; CUNHA, E. V. L.; WOLTER-FILHO, W. Essential oil of *Protium unifoliolatum* (BURSERACEAE). **Acta Amazonica**, v. 23, n. 1, p. 15-16, 1993.