



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
MESTRADO EM QUÍMICA

Lignóides de Burseraceae da Amazônia

IGOR MEDEIROS DE ASSIS

MANAUS – AM

2013

IGOR MEDEIROS DE ASSIS

Lignóides de Burseraceae da Amazônia

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química, com área de concentração em Química Orgânica.

Orientador: Prof. Dr. Valdir Florêncio da Veiga Junior

MANAUS – AM

2013

Ficha Catalográfica

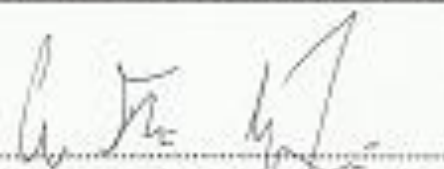
Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

A848l Assis, Igor Medeiros de
Lignóides de Burseraceae da Amazônia / Igor Medeiros de Assis.
2013
107 f.: il. color; 31 cm.

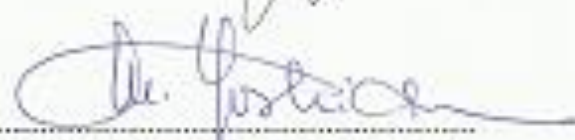
Orientador: Valdir Florêncio da Veiga Junior
Dissertação (Mestrado em Química - Orgânica) - Universidade
Federal do Amazonas.

1. lignanas. 2. Burseraceae. 3. hinoquinina. 4. gadaina. 5. análise
de componentes principais. I. Veiga Junior, Valdir Florêncio da II.
Universidade Federal do Amazonas III. Título

Programa de Pós-Graduação em Química -2-



Prof. Dr. Valdir Florêncio da Veiga Junior – Presidente (UFAM)



Prof. Dr. Masayoshi Yoshida – Membro (CBA)



Profª. Drª. Maria da Paz Lima - Membro (INPA)

Dedico este trabalho às minhas queridas, amadas, amigas e companheiras Edinilza Medeiros (Melhor mãe do mundo) e Caroline Mathias pelo amor, carinho e dedicação a mim, sendo muito compreensivas e pacientes nos meus momentos de desânimo e estresse.

AGRADECIMENTOS

A Deus por sempre me dar “luz” nos momentos mais difíceis ao longo dessa dolorosa e ardorosa caminhada.

Ao Prof. Dr. Valdir Florêncio da Veiga Junior amizade, paciência e orientação, essenciais para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu amigo Dr. André Luís Rüdiger (Papai) que me mostrou o caminho a seguir neste trabalho.

À Lidiam Maia Leandro (Maria José) e a Milena Campelo (Roxelle) que foram as primeiras pessoas que me acolheram no laboratório.

Aos amigos Drs. Iuri Bezerra, Dayana Lacerda e o Fabiano Vargas (Papy Soberano) que sempre estavam dispostos a me ajudar nos momentos de dificuldades.

À Klenicy Yamaguchi, Priscilla Oliver, Joelma Alcântara, Paula Barbosa, Priscila Moraes, Vanessa Campos, Orlando Amazonas e Gisele Mendes, pelos momentos de descontração e companheirismo ao longo desses anos.

À querida Dra. Érika Izumi (Mamãe) pelos seus conselhos, risadas e sushis (que eram feitos pelo André).

Às minhas adoradas amigas D. Bianca Catunda e D. Lourdes Catunda, pelos conselhos e carinho ao longo desses anos.

Aos “Brother’s” João Vitor, Rodrigo Cavalcanti, Ravalry Jefferson, Alfredo, Victor Freitas, Renyer Costa, Fatimérison Farias e Fernando Alves.

Às minhas amigas de laboratório, confessionário e descontração Aimêe Oliveira, Luciana Freire e Diane Cabreira.

Aos meus grandes amigos de infância Igor Picanço (Popótamo), Rammon Araújo (Nariz pequeno) e Josué Nunes (Mr. Bean), que nesses anos me fizeram rir e ouviram minhas lamentações e conquistas.

A todos os alunos de iniciação científica que me aguentaram nesses últimos tempos, em especial à Taciane Brandão, Lorena Moura e Luan Alexandre.

Ao doutorando Felipe “Massas” que sempre foi bastante atencioso e disponível a responder as minhas dúvidas sobre espectrometria de massas.

Ao Prof. Dr. Paulo Couceiro e a doutoranda Fátima que me ajudaram no tratamento de dados no software Excel.

Aos professores da Pós-graduação em Química PPGQ-UFAM pelas aulas ministradas contribuindo na minha formação.

Ao Prof. Dr. Afonso Duarte por disponibilizar os aparelhos do Laboratório da Central Analítica (UFAM) pelas análises realizadas.

Aos Profs. Massayoshi Yoshida e Rita de Cássia Nunomura pelas contribuições no Exame de Conhecimento.

Ao Prof. Massayoshi e aos técnicos Raimundo Júnior, Laura Cristina, Karol e Dácio Montenegro pelas análises de RMN e CG e a Jolene pela intermediação das solicitações de orçamentos.

A CAPES, pelo apoio financeiro, necessário para a conclusão deste trabalho.

RESUMO

Lignóides constituem uma importante classe de substâncias fenólicas das plantas, que são estruturalmente caracterizados por acoplamento de unidades de fenilpropanóides. É um grupo com uma grande variação estrutural resultando na grande diversidade de classes encontradas na natureza como as lignanas e neolignanas. Poucos estudos foram realizados em relação aos lignóides na família Burseraceae, sendo reportados em apenas cinco gêneros, *Bursera*, *Commiphora*, *Crepidospermum*, *Tetragastris* e *Protium*. Com interesse de realizar o perfil químico de várias espécies de uma mesma família utilizando técnicas cromatográficas, espectrométricas e espectroscópicas, a partir do extrato bruto, sem a necessidade do exaustivo trabalho de isolamento, este projeto teve como objetivo direcionar o estudo fitoquímico através das técnicas espectroscópicas de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (^1H RMN) e Espectrometria de massas com ionização por eletrospray (EM-ESI) e das técnicas de cromatografia em fase gasosa acoplada a detectores de ionização de chama (CG-DIC) e espectrometria de massas (CG-EM) dos extratos de baixa e média polaridade de espécies da família Burseraceae da Amazônia. O perfil metabólito realizado por RMN de ^1H , apresentou grande similaridade entre os extratos, em relação à região dos hidrogênios metílicos, sendo justificada pela possível presença de triterpenos. Dentre esses espectros, apenas quatro apresentaram maiores diferenças: ECJN52, ECJN42, ECJN55 e ECON55. Foram observados também, deslocamentos químicos de prótons aromáticos, entre δ 6,5 e 7,5 ppm e de grupos metilenodioxí, entre δ 5,9 e 6,04 ppm. Os resultados obtidos por EM-ISE demonstraram também grande semelhança entre as espécies. Em uma faixa de m/z pré-determinada, entre 300 e 600, foram observados que apenas os extratos EFAM52, ECON52, ECJN42, ECJN55 e ECJN52, apresentaram íons de possíveis lignóides. Assim como ocorreu nas análises por RMN de ^1H e EM-ESI, nas análises por CG-EM foram observados perfis cromatográficos semelhantes entre os extratos. Comparando as fragmentações da literatura com os resultados obtidos nos espectros de massas por CG-EM, verificou-se uma grande semelhança com os padrões de fragmentação de lignanas dibenzilbutirolactônicas. Podendo sugerir que as substâncias com m/z 352 e 354, possam ser das lignanas gadaina e hinoquinina, respectivamente. Os resultados de CCD para os extratos obtidos em éter etílico e em acetato de etila também demonstraram perfis semelhantes, assim como nas análises espectroscópicas. Os resultados obtidos por CCD foram analisados estatisticamente por agrupamento hierárquico pelo método “hclust-ward” demonstrando a presença de 2 grupos químicos para os extratos obtido em éter etílico e AcOEt. Os extratos obtidos em éter etílico e AcOEt foram analisados por EM-ISE, sendo observadas substâncias com massas moleculares características de triterpenos e esteróis acetilados e glicosilados, biflavanóides e lignóides.

Palavras chave: lignanas, hinoquinina, gadaina, análise hierárquica por agrupamento, análise de componentes principais, Burseraceae.

O mundo vai girando
Cada vez mais veloz
A gente espera do mundo
E o mundo espera de nós
Um pouco mais de paciência.

Lenine

ABSTRACT

Lignoids are a class important of plants substances phenolic which is structurally characterized by coupling phenylpropanoids. It is a group with a large structural variation resulting in the wide variety of classes found in nature such as lignans and neolignans. Few studies have been conducted in relation to the family Burseraceae lignoids, being reported in only five genera, *Bursera*, *Commiphora*, *Crepidospermum*, *Tetragastris* and *Protium*. With interest to perform the chemical profile of several species of the same family using chromatographic techniques, spectrometric and spectroscopic, from the crude extract, without the need of thorough insulation work, this project aimed to direct the phytochemical study by spectroscopic techniques of Hydrogen Nuclear Magnetic Resonance (^1H NMR), and mass spectrometry spray ionization of electrons (MS-ESI) techniques and gas chromatography coupled to flame ionization detector (GC-FID) and mass spectrometry (GC-MS) of the extracts of low and medium polarity species in the family Burseraceae Amazon. The metabolic profile was performed by ^1H NMR, showed great similarity among the extracts in relation to the region of methyl hydrogens, which can be explained by the presence of triterpenes. Among these spectra, only four showed major differences: ECJN52, ECJN42, ECJN55 and ECON55. Were also observed, chemical shifts aromatic protons between δ 6.5 and 7.5 ppm and methylenedioxy groups between δ 5.9 and 6.04 ppm. The results obtained by ISE-MS showed also very similar among species. In a range of m/z predetermined between 300 and 600, which were seen only extracts EFAM52, ECON52, ECJN42, ECJN55 ECJN52 and showed ions m/z lignoids possible. As occurred in the analysis by ^1H NMR and MS-ESI, the analysis by GC-MS, similar chromatographic profiles were observed between extracts. Comparing the fragmentation of literature with the results obtained from mass spectra by GC-MS, there was a great similarity with the fragment patterns of lignans dibenzylbutyrolactone. Could suggest that substances with m/z 352 and 354, may be of lignans and gadaina hinokinin respectively. The results for the CCD extracts in ethyl ether and ethyl acetate also a showed similar profile, as well as the spectroscopic analyzes. The results were statistically analyzed by TLC by hierarchical clustering method "hclust-ward" demonstrating the presence of two chemical groups for the extracts obtained in ethyl ether and EtOAc. The extracts obtained in ethyl ether and AcOEt were analyzed by MS-ESI, being observed substances with molecular characteristics of triterpenes and sterols acetylated and glycosylated, and biflavanóides lignoids.

Keywords: lignoids, hinokinin, gadain, hierarchical cluster analysis, principal component analysis, Burseraceae.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estruturas básicas de lignanas e neolignanas	17
Figura 2. Lignana (-)-podofilotoxina e as neolignanas virolina e urinamensina.....	17
Figura 3. Lignanas e neolignanas do gênero <i>Bursera</i>	24
Figura 4. Lignanas do gênero <i>Commiphora</i>	27
Figura 5. Lignanas do gênero <i>Crepidospermum e Tetragastris</i>	28
Figura 6. Lignanas do gênero <i>Protium</i>	29
Figura 7. Diagrama de extração das cascas e cerne dos galhos das Burseraceae.....	34
Figura 8. Principais estruturas encontradas nos lignóides	43
Figura 9. Espectro da RMN de ^1H (CDCl_3) dos extratos em éter	45
Figura 10. Espectros da RMN de ^1H (D_3CCOCD_3) dos extratos em AcOEt.....	46
Figura 11. Ampliação dos espectros da RMN de ^1H dos extratos em AcOEt ECON55, ECJN55, e em éter ECJN42 e ECJN52.....	47
Figura 12. Estruturas aromáticas encontradas em Burseraceae.....	48
Figura 13. Espectros de massas dos extratos obtidos em éter	51
Figura 14. Espectros de massas dos extratos obtidos em AcOEt	52
Figura 15. Espectro de massas do extrato EFAM52	53
Figura 16. Espectro de massas do extrato ECON52	53
Figura 17. Espectro de massas do extrato ECJN42	54
Figura 18. Espectro de massas do extrato ECJN52	54
Figura 19. Espectro de massas do extrato ECJN55	54
Figura 20. ESI(+)-MS/MS do íon de m/z 369	55
Figura 21. ESI(+)-MS/MS do íon de m/z 385	55
Figura 22. ESI(+)-MS/MS do íon de m/z 401	55
Figura 23. Fragmentação de lignanas ariltetralinas (SCHMIDT <i>et al.</i> , 2006).....	57
Figura 24. Fragmentação de lignanas dibenzilbutirolactonas (SCHMIDT <i>et al.</i> , 2006).	58
Figura 25. Fragmentação da lignana deoxipodofilotoxina (SCHMIDT <i>et al.</i> , 2008)	59
Figura 26. Cromatograma do extrato em éter de <i>Protium klugii</i>	61
Figura 27. Padrão de fragmentação de lignanas da classe dibenzilbutirolactonas, por CG-EM (YAMAMOTO <i>et al.</i> , 2010)	63
Figura 28. Espectro de massas do íon m/z 352.....	64
Figura 29. Espectro de massas do íon m/z 354.....	64

Figura 30. Espectro de massas do íon m/z 370.....	64
Figura 31. Lignana hinoquinina	65
Figura 32. Lignana gadaina	66
Figura 33. CCD dos extratos em éter das espécies <i>Protium klugii</i> (ECJN52), <i>P. paniculatum</i> (EDIO52), <i>P. pilosissimum</i> (ECON52), <i>P. trifoliolatum</i> (ECTN52), <i>P. gallosum</i> (ECGN52) e <i>P. apiculatum</i> (ECBM52).....	67
Figura 34. CCD dos extratos em éter das espécies <i>P. apiculatum</i> (ECBM52), <i>Protium nitidifolium</i> (ECKN52), <i>P. cf. rubrum</i> (EDJN52), <i>Trattinnikia glaziovii</i> (EFAM52) e das madeiras das espécies de <i>P. pilosissimum</i> (ECON42), <i>P. klugii</i> (ECJN42), <i>P. trifoliolatum</i> (ECTN42), <i>Trattinnikia glaziovii</i> (EFAM42), <i>P. cf. rubrum</i> (DJN42), <i>P. apiculatum</i> (ECBM42), <i>P. nitidifolium</i> (ECKN42), <i>P. cf. paniculatum</i> (EDIO42) e <i>P. gallosum</i> (ECGN42)	69
Figura 35. Dendrograma de agrupamento químico para as espécies de Burseraceae. Dados dos valores do fator de retenção por CCD para os extratos em éter analisados com software R, utilizando método “ward”	70
Figura 36. Fracionamento do extrato EFAM52	72
Figura 37. Espectro de massas da α -amirina.....	76
Figura 38. Espectro de massas da β -amirina	76
Figura 39. CCD dos extratos em AcOEt das espécies <i>Protium klugii</i> (ECJN55), <i>P. cf. paniculatum</i> (EDIO55), <i>P. pilosissimum</i> (ECON55), <i>P. trifoliolatum</i> (ECTN55), <i>P. gallosum</i> (ECGN55), <i>P. apiculatum</i> (ECBM55), <i>P. nitidifolium</i> (ECKN55), <i>P. cf. rubrum</i> (EDJN55), <i>Trattinnikia glaziovii</i> (EFAM55), e da madeira <i>P. pilosissimum</i> (ECON45) e <i>P. klugii</i> (ECJN45)	77
Figura 40. CCD dos extratos em AcOEt das espécies <i>Protium klugii</i> (ECJN55), <i>P. cf. paniculatum</i> (EDIO55), <i>P. pilosissimum</i> (ECON55), <i>P. trifoliolatum</i> (ECTN55), <i>P. gallosum</i> (ECGN55), <i>P. apiculatum</i> (ECBM55), <i>P. nitidifolium</i> (ECKN55), <i>P. cf. rubrum</i> (EDJN55), <i>Trattinnikia glaziovii</i> (EFAM55), e da madeira <i>P. pilosissimum</i> (ECON45) e <i>P. klugii</i> (ECJN45)	78
Figura 41. Dendrograma de agrupamento químico para as espécies de Burseraceae. Dados dos valores do fator de retenção por CCD para os extratos em AcOEt analisados com software R, utilizando método “ward”	79
Figura 42. Distribuição dos trinta e seis extratos por análise dos componentes principais utilizando como variáveis os íons de maior intensidade. (A) Mapa de Fatores Individuais. (B) Mapa de Variáveis	82
Figura 43. Dendrograma sobre o Mapa de Fatores representando a dissimilaridade entre os trinta e seis extratos	83
Figura 44. Biflavonóide caesalflavona de m/z $[H+H]^+$ 541	84
Figura 45. (-)- <i>para</i> -benzolactona.....	85
Figura 46. <i>oxo-para</i> -benzolactona.....	85

Figura 47. Lignana (-)- <i>trans</i> -2-(3'',4''-dimetoxibenzil)-3-(3',4'-metilenodioxibenzil)butirolactona isolada da espécie <i>Bursera shlechtendalii</i>	86
Figura 48. Lignana thujaplicatina isolada da espécie <i>Thuja plicata donn</i>	86
Figura 49. Liganana 5'-demetoxiepiexcelsina isolada da espécie <i>Commiphora mukul</i>	87
Figura 50. Neoligana 5-metoxipropacina, isolada da espécie <i>P. unifoliolatum</i> (MAGALHÃES <i>et al.</i> , 2006)	87
Figura 51 Lignana (-)- <i>trans</i> -2-(3'',4'',5''-trimetoxibenzil)-3-(3',4'-metilenodioxibenzil)butiralactona, isolada da espécie <i>Bursera schlehtendalii</i> (McDONIEL & COLE 1972)	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lignanas e neolignanas da família Burseraceae	19
Tabela 2. Espécies de Burseraceae coletadas, com sigla utilizada na dissertação	40
Tabela 3. Rendimentos (%) dos extratos brutos e dos materiais vegetais	41
Tabela 4. Principais sinais de deslocamentos dos prótons aromáticos, lactônicos e dos metilenodioxí.....	43
Tabela 5. Fator de retenção para os extratos obtidos em éter etílico	72
Tabela 6. Fator de retenção para os extratos obtidos em AcOEt	80

LISTA DE SÍMBOLOS SIGLAS, E ABREVIACÕES

AcOEt – Acetato de etila

CC - Cromatografia em coluna aberta

CCD - Cromatografia em camada delgada

CG-DIC – Cromatografia em fase gasosa acoplada a detector de ionização por chama

CG-EM – Cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrômetro de massas

EMCI - Espectrometria de massas por captura de íons

EM-ESI – Espectrometria de massas com ionização por eletrospray

HCA – Análise de agrupamento hierárquico

PCA – Análise de componentes principais

Q-BiomA - Grupo de pesquisa em Química de Biomoléculas do Amazonas

Rf - Fator de retenção

RMN ¹H - Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

δ - Deslocamento químico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	15
2.1. OBJETIVO GERAL	15
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3. REVISÃO DA LITERATURA	16
3.1. Lignóides.....	16
3.2. Lignóides de Burseraceae	18
3.2.1. Lignóides do gênero <i>Bursera</i>	22
3.2.3. Lignanas dos gêneros <i>Crepidospermum</i> e <i>Tetragastris</i>	28
3.2.4. Lignóides do gênero <i>Protium</i>	29
4. AVALIAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO.....	31
5. METODOLOGIA	33
5.1. Coleta do material.....	33
5.2. Obtenção dos extratos	33
5.3. Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	34
5.3.1. Cromatografia em Coluna Aberta em Fase Normal (CC).....	34
5.3.2. Recristalização.....	36
5.4. Análise Instrumental	36
5.4.1. Cromatografia a Gás com detector de Ionização de Chama (CG-DIC)	36
5.4.2. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear	37
5.4.3. Espectrometria de Massas.....	37
5.4.3.1. Cromatografia a Gás com detector de Espectrômetro de Massas (CG-EM).....	37
5.4.3.2. Espectrometria de Massas por Captura de Íons (EMCI)	38
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
6.1. Metodologia/filosofia do estudo	39
6.2. Análise do perfil metabólito dos extratos brutos das cascas e madeiras	43
6.2.1. Perfil metabólito por RMN de ¹ H	43
6.2.2. Análise por cromatografia em camada delgada dos extratos obtidos em éter e AcOEt...50	
6.2.2.1. Cromatografia em camada delgada dos extratos obtidos em éter	51
6.2.2.2. Fracionamento do extrato em éter de <i>Trattinnikia glaziovii</i> (EFAM52).....	56
6.2.2.3. Cromatografia em camada delgada dos extratos obtidos em acetato de etila.....	59

6.2.3. Perfil metabólico por espectrometria de massas com ionização por spray de elétrons (EM-ISE)	63
6.2.4. Perfil químico por CG-EM dos extratos em éter etílico das cascas e madeiras	75
6.3. Avaliação quimiométrica dos perfis químicos dos extratos das cascas e madeiras dos extratos em éter e acetato de etila por EM-ISE	81
7. CONCLUSÃO.....	89
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	90

1. INTRODUÇÃO

A utilização de plantas com fins medicinais, para tratamento, cura e prevenção de doenças, é uma das mais antigas práticas da humanidade (VEIGA JUNIOR *et al.*, 2005). O conhecimento sobre plantas medicinais muitas vezes é o único recurso terapêutico de comunidades e grupos étnicos. Ainda hoje, nas regiões mais pobres do país e até mesmo nas grandes cidades brasileiras, plantas medicinais são comercializadas em feiras livres, mercados populares e encontradas em quintais residenciais (MACIEL *et al.*, 2002).

A diversidade biológica da floresta Amazônica oferece a oportunidade para descoberta de moléculas inovadoras e eficientes com potencial de uso em larga escala (SOUZA FILHO *et al.*, 2009). Espécies de plantas desta região são fontes de agentes fitoterápicos e nutracêuticos (DUKE, 1994).

Dentre estas espécies encontram-se as da família Burseraceae, que são conhecidas como "breus", e suas resinas vêm sendo utilizadas ao longo dos anos como repelente de insetos, no calafeto de embarcações (CORREIA, 1926) e, com atividades medicinais evidenciadas há tempos por comunidades de todas as regiões tropicais e subtropicais do mundo, onde estão presentes as árvores e arbustos desta família (PERNET, 1972).

Além das resinas, outras partes das árvores e arbustos das espécies de Burseraceae foram estudadas, como folhas, frutos e madeira, descrevendo uma composição química predominantemente terpênica, sendo encontradas grandes quantidades de mono, sesqui e triperpenos, e compostos aromáticos como fenilpropanoides, coumarinas, flavanoides e lignoides (RÜDIGER *et al.*, 2007).

Poucos estudos foram realizados em relação aos lignoides na família Burseraceae, sendo reportados em apenas cinco gêneros, *Bursera*, *Commiphora*, *Crepidospermum*, *Tetragastris* e *Protium*.

No gênero *Bursera* foram descritas lignanas pertencentes às classes ariltetralina, dibenzilbutano, dibenzilbutirolactona e furano, também sendo descrita a presença de neolignanas (JUTIVIBOONSUK *et al.*, 2005; NAKANSHI *et al.*, 2005; ROJAS-SEPULVEDA *et al.*, 2009).

Apenas lignanas foram reportadas no gênero *Commiphora*, sendo relatadas as classes ariltetralina e furofurano (DEKEBO *et al.*, 2002; ABBASI *et al.*, 2005). Nos gêneros *Crepidospermum* e *Tetragastris* foram descritas apenas lignanas da classe dibenzilbutirolactona (LIMA *et al.*, 2001).

No gênero *Protium* foram relatadas as lignanas pertencentes às classes arilnaftaneleno, dibenzilbutirolactona e furano, e também foram encontradas neolignanas (SIANI *et al.*, 1998; MAGALHÃES *et al.*, 2006).

Lignanas isoladas de espécies de Burseraceae apresentam várias atividades biológicas, como antitumoral, anticâncer, antiviral e anti-inflamatória (WICKRAMARATNE *et al.*, 1995; NOGUERA *et al.*, 2004; CANEL *et al.*, 2000).

Sabendo que a família Burseraceae é constituída principalmente pela classe terpenoídica e que os lignoides possuem características singulares, a varredura do perfil químico de várias espécies de uma mesma família utilizando técnicas cromatográficas, espectrométricas e espectroscópicas, possibilita o estudo do extrato bruto, sem a necessidade do exaustivo trabalho de isolamento, descartando assim espécies que levem à obtenção de compostos já identificados. Ou, obter uma espécie com pequena variação

de constituinte. Dessa forma, a utilização destas técnicas apresenta grande conhecimento na composição de extratos brutos (RÜDIGER, 2012).

Considerando a importância das atividades biológicas dessas lignanas, a escassez de estudos sobre essa classe de metabólitos especiais provenientes de espécies da família Burseraceae da Amazônia e considerando a abundância dessas espécies na Região Amazônica, o presente trabalho pretende realizar o perfil químico das cascas e do cerne dos galhos de espécies da família Burseraceae, a partir de extratos obtidos em éter etílico e acetato de etila, através de técnicas cromatográficas e espectroscópicas.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

- Realizar estudo fitoquímico/espectroscópico dos extratos de baixa e média polaridade de espécies da família Burseraceae da Amazônia.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Determinar o perfil químico dos extratos obtidos em éter etílico e acetato de etila das cascas e madeira pelos métodos de espectrometria de massas e de Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio.

b) Determinar o perfil cromatográfico dos extratos obtidos em éter etílico através da técnica de cromatografia em fase gasosa acoplada ao espectrômetro de massas.

c) Avaliar a composição química dos extratos obtidos em éter etílico e acetato de etila das cascas e madeira pelos métodos de EM-ISE através de técnicas estatísticas multivariadas.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Lignóides

Os lignóides são micromoléculas cujo esqueleto é formado exclusivamente, ou adicionalmente a outros grupos, pelo grupo fenilpropânico $(C_6.C_3)_n$, sendo n restrito a poucas unidades, 1 a 3 (GOTTLIEB, 1984). Possuem importante atividade aleloquímica nas plantas nas quais, tendo também ações farmacológicas no homem, fato que já levou a aplicações terapêuticas importantes (GOTTLIEB, 1988).

É um grupo com uma grande variação estrutural, sendo descritos mais de 500 lignóides, resultando na grande diversidade de classes encontradas na natureza como lignanas, neolignanas, alolignanas, norlignanas, oligolignóides e heterolignóides, sendo as lignanas e neolignanas as classes mais numerosas (GOTTLIEB, 1984).

As lignanas pertencem a uma grande classe de metabólitos especiais que constituem um grupo importante de substâncias fenólicas das plantas. Este termo foi introduzido por Haworth nos meados de 1940 e, aplicado a esqueletos carbônicos em que duas unidades n -propilbenzênicas (C_6C_3) são ligadas pelos carbonos β de suas cadeias laterais propílicas (C_3) e quando estes acoplamentos acontecem entres outros carbonos destas unidades, estes constituintes são chamados neolignanas (Figura 1). (UMEZAWA, 2003; GOTTLIEB, 1984; MOSS 2000).

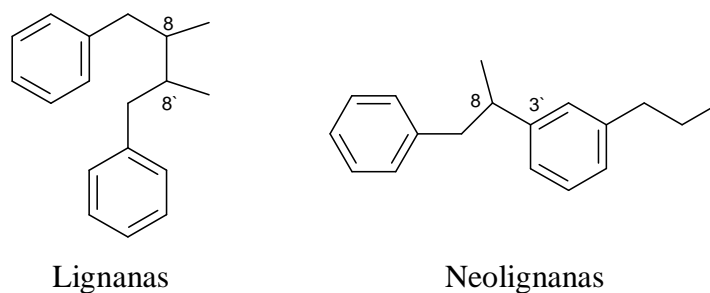


Figura 1: Estruturas básicas de lignanas e neolignanas

Lignanas e neolignanas têm atraído grande interesse, ambos devido à sua ampla ocorrência na natureza e por sua extensa gama de atividades biológicas (AGRAWAL e THAKUR, 1985), como o importante efeito farmacológico da podofilotoxina, obtida a partir do extrato alcoólico da planta *Podophyllum peltatum* (Figura 2), seu uso contra uma variedade de câncer, como de testículos, leucemia aguda linfocítica e em especial a atividade antiviral, relatada para o tratamento de verrugas venéreas (AYRES, 1990; KAPLAN, 1942; VON KROGH, 1981). As neolignanas virolina e susarinamensina isoladas das folhas de *Virola surinamensis* mostraram atividade contra a leishmaniose (COSTA & TAKAHATA, 1996).

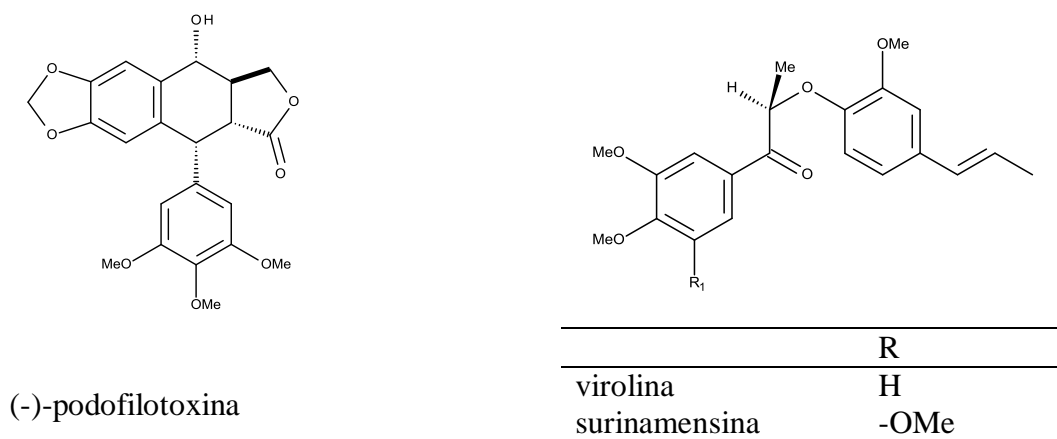


Figura 2: Lignana (-)-podofilotoxina e as neolignanas virolina e urinamensina.

3.2. Lignóides de Burseraceae

Lignanas e neolignanas foram encontradas tanto nos óleoresinas quanto nas folhas, madeiras e raízes, sendo descritas 36 lignanas e 6 neolignanas na família Burseraceae, podendo ser observado na tabela 1 (PERAZA-SÁNCHEZ *et al.*, 1992; SIQUEIRA *et al.*, 1995; JUTIVIBOONSUK *et al.*, 2005). A ocorrência destes lignóides é descrita em apenas cinco gêneros desta família: *Bursera*, *Commiphora*, *Crepidospermum*, *Tetragastris* e *Protium*.

Lignóides isolados de espécies de Burseraceae apresentam várias atividades biológicas, como antitumoral, anticâncer, antiviral e anti-inflamatória (WICKRAMARATNE *et al.*, 1995; NOGUERA *et al.*, 1992; CANEL *et al.*, 2000; JUTIVIBOONSUK *et al.*, 2005).

Tabela 1: Lignanas e neolignanas da família Burseraceae

Lignanas e neolignanas	Espécies	Referencias
[1] deóxipodofilotoxina	<i>Bursera permollis</i> <i>B. morelensis</i> <i>B. fagaroides</i> <i>B. microphylla</i>	Jolad <i>et al.</i> , 1977 Velázquez-Jiménez <i>et al.</i> , 2011 Bianchi <i>et al.</i> , 1968
[2] burserana	<i>B. microphylla</i>	Cole <i>et al.</i> , 1969
[3] 8`β(H) metil-β-petaltina A	<i>B. simaruba</i>	Noguera <i>et al.</i> , 2004
[4] 8`α(H) metil-β-petaltina B	<i>B. simaruba</i>	Noguera <i>et al.</i> , 2004
[5] picropoligamaína	<i>B. graveolens</i> <i>B. simaruba</i>	Nakanishi <i>et al.</i> , 2005 Peraza-Sánchez & Peña Rodríguez, 1992
[6] β-peltatina-O-β-D-glucopiranosídeo	<i>B. simaruba</i>	Maldini <i>et al.</i> , 2009
[7] iateína	<i>B. fagaroides</i> <i>B. simaruba</i>	Velázquez-Jiménez <i>et al.</i> , 2011 Maldini <i>et al.</i> , 2009
[8] hinokinina	<i>B. simaruba</i>	Maldini <i>et al.</i> , 2009
[9] bursehernina	<i>B. simaruba</i>	Maldini <i>et al.</i> , 2009
[10] (-)-podofilotoxina	<i>B. fagaroides</i>	Velázquez-Jiménez <i>et al.</i> , 2011
[11] acetil podofilotoxina	<i>B. fagaroides</i>	Velázquez-Jiménez <i>et al.</i> , 2011 Rojas-Sepulveda <i>et al.</i> , 2009
[12] morelesina	<i>B. fagaroides</i>	Velázquez-Jiménez <i>et al.</i> , 2011
[13] (-)-5`-desmetoxiiatína	<i>B. fagaroides</i>	Velázquez-Jiménez <i>et al.</i> , 2011
[14] burseranina	<i>B. graveolens</i>	Nakanishi <i>et al.</i> , 2005
[15] (-)- <i>trans</i> -2-(3`',4`',5`'-trimetoxibenzil)-3-(3`',4`'-metilenedióxibenzil)butirolactona	<i>B. schlechtendalii</i>	McDoniel & Cole, 1972
[16] (-)- <i>trans</i> -2-(3`',4`'-dimetoxibenzil)-3-(3`',4`'-metilenedióxibenzil)butirolactona	<i>B. schlechtendalii</i>	McDoniel & Cole, 1972
[17] ariesina	<i>B. ariensis</i>	Hernández <i>et al.</i> , 1983

[18] β -petaltina-metil-eter	<i>B. permollis</i>	Wickramaratne <i>et al.</i> , 1995
[19] nemerosina	<i>B. permollis</i>	Wickramaratne <i>et al.</i> , 1995
[20] 5`desmetóxideoxipodofilotoxina	<i>B. morelensis</i>	Jolad <i>et al.</i> , 1977
[21] burselignana	<i>B. tonkinensis Guillaum</i>	Jutiviboonsuk <i>et al.</i> , 2005
[22] (+)-isolariciresinol	<i>B. tonkinensis Guillaum</i>	Jutiviboonsuk <i>et al.</i> , 2005
[23] 5-metóxi-(+)-isolariciresinol	<i>B. tonkinensis Guillaum</i>	Jutiviboonsuk <i>et al.</i> , 2005
[24] 4`-dimetildesóxi podofitoxina	<i>B. tonkinensis Guillaum</i>	Jutiviboonsuk <i>et al.</i> , 2005
[25] 4`-dimetildesóxi podofitoxina-O- β -D-glicosídeo	<i>B. tonkinensis Guillaum</i>	Jutiviboonsuk <i>et al.</i> , 2005
[26] 1-(4`-hidroxi-3-metoxifenil)-2-[4``-(3-hidroxi propil)-2``,6``-dimetóxi fenoxi]propano-1,3-diol	<i>B. tonkinensis Guillaum</i>	Jutiviboonsuk <i>et al.</i> , 2005
[27] burseneolignana	<i>B. tonkinensis Guillaum</i>	Jutiviboonsuk <i>et al.</i> , 2005
[28] dihidrodehidroconiferil álcool	<i>B. tonkinensis Guillaum</i>	Jutiviboonsuk <i>et al.</i> , 2005
[29] 5-metóxi- <i>trans</i> -dihidrodehidroconiferil álcool	<i>B. tonkinensis Guillaum</i>	Jutiviboonsuk <i>e. al.</i> , 2005
[30] 2 β ,3 β -dihidroxi-6-metóxi-4 β -angeloiloxiisopropoligamatina	<i>Commiphora erlangeriana</i>	Habtemarian,2003 Dekebo <i>et al.</i> , 2002
[31] 2 α -acetóxi-6-metóxi picropoligamatina	<i>C. erlangeriana</i>	Habtemarian,2003 Dekebo <i>et al.</i> , 2002
[32] 2 α -acetóxideoxipicropodofilina	<i>C. erlangeriana</i>	Habtemarian,2003 Dekebo <i>et al.</i> , 2002
[33] 2 α -acetóxi-3 β -hidróxiisodeoxipodofilotoxina	<i>C. erlangeriana</i>	Habtemarian,2003 Dekebo <i>et al.</i> , 2002
[34] <i>epiexcelsina</i>	<i>C. mukul</i>	Abbasi <i>et al.</i> , 2005; 2009
[35] 5`-demetóxi <i>epiexcelsina</i>	<i>C. mukul</i>	Abbasi <i>et al.</i> , 2005; 2009
[36] parabenzolactona	<i>Crepidosperrum rhoifolium</i>	Lima <i>et al.</i> , 2001
[37] (-)-savinina	<i>Tetragastris altíssima</i>	Lima <i>et al.</i> , 2001

[38] cubebina	<i>Protium tenuifolium</i>	Siqueira <i>et al.</i> , 1995
[39] oxo- <i>para</i> -benzolactona	<i>P. tenuifolium</i>	Siqueira <i>et al.</i> , 1995
[40] 5-metóxijusticidina A	<i>P. unifoliolatum</i>	Siani <i>et al.</i> , 1998
[41] propacina	<i>P. opacum</i>	Zoghbi, Roque & Gottlieb, 1981 Marques & Yoshida, 1990
[42] 5-metóxiropacina	<i>P. unifoliolatum</i>	Magalhães <i>et al.</i> , 2006

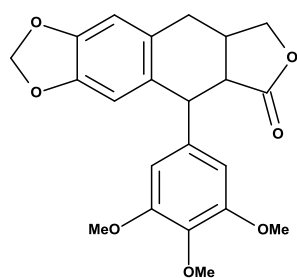
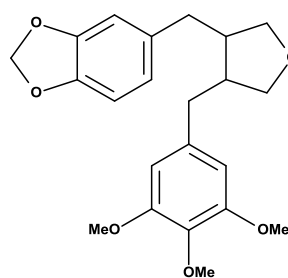
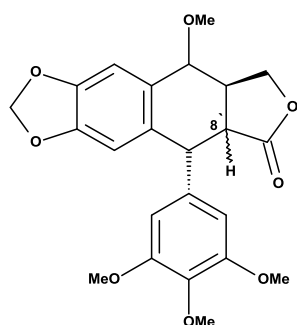
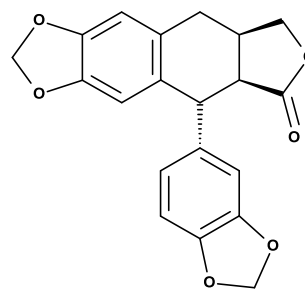
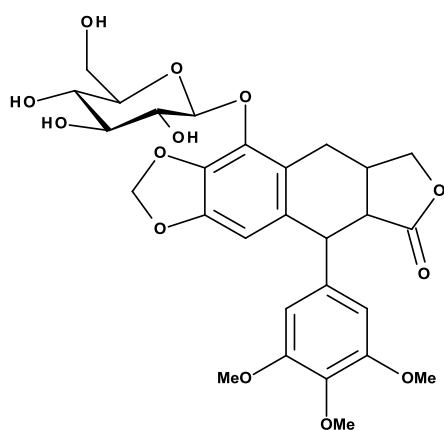
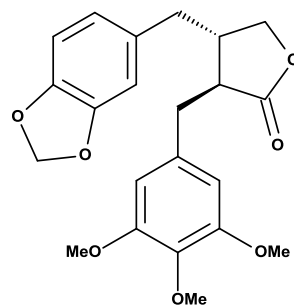
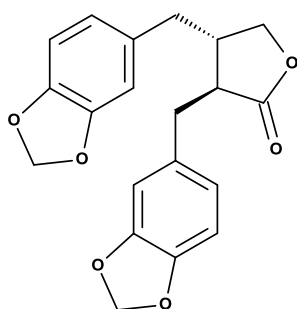
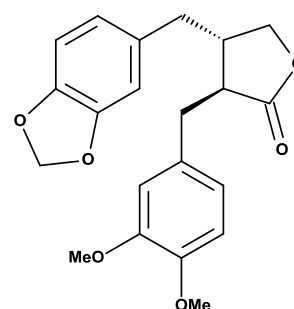
3.2.1. Lignóides do gênero *Bursera*

Bursera é o gênero que apresenta mais estudos e a maior diversidade de classes de lignanas, sendo encontradas as classes ariltetralina, dibenzilbutano, dibenzilbutirolactona e furano, também sendo descrita a presença de neoligananas (Figura 3).

Nos estudos de Bianchi *et. al.* (1968) e Cole *et al.* (1969), com a madeira de *Bursera microphylla*, foram identificados as lignanas deoxipodofilotoxina [1] e burserana [2], pertencentes às classes ariltetralina e furano, respectivamente, apresentando potencial atividade antitumoral.

Em estudo realizado com as folhas da espécie *B. simaruba*, foram identificadas as lignanas ariltetralinas 8`β(H) metil-β-peltalina A [3] e 8`α(H) metil-β-peltalina B [4], sendo sugerido que a lignana metil-β-peltalina A pode ser o princípio ativo envolvido na atividade anti-inflamatória das folhas desta espécie (NOGUERA *et. al.*, 2004), da resina dessa mesma espécie foi isolada a picropoligamaina [5] (PERAZA-SÁNCHEZ & PEÑA-RODRÍGUEZ, 1992).

Maldini *et. al.* (2009), estudando compostos fenólicos das cascas de *B. simaruba*, identificaram a lignana ariltetralina β-peltatina-*O*-β-D-glucopiranosídeo [6] e as lignanas pertencentes à classe dibenzilbutirolactona iateína [7], hinokinina [8] e bursehernina [9]. A análise quantitativa por espectrometria de massas confirmou que estas lignanas são os principais compostos das cascas, sendo que a β-peltatina-*O*-β-D-glucopranosídeo é a mais abundante.

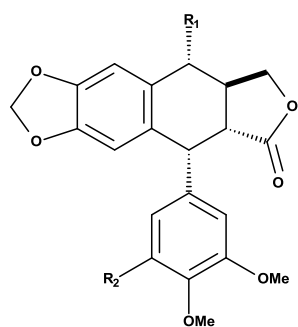
**[1]****[2]****[3] = 8' β(H)****[4] = 8' α(H)****[5]****[6]****[7]****[8]****[9]**Figura 3: Lignoides do gênero *Bursera*.

Nas resinas de *B. fagaroides* foram isoladas as lignanas ariltetralina (-)-podofilotoxina [10], (-)-acetil podofilotoxina [11] e a morelesina [12], e a lignana (-)-5'-desmetoxiiteina [13] (VELÁZQUEZ-JIMÉNEZ *et al.*, 2011). Em *B. graveolens* foi identificada a lignana ariltetralina burseranina [14], isolada do galho, que apresentou efeito inibitório sobre células de fibrosarcoma (NAKANSHI *et al.*, 2005).

Na espécie *B. schlechtendalii* foram identificadas duas lignanas pertencentes à classe dibenzibutirolactona, (-)-*trans*-2-(3'',4'',5''-trimetoxibenzil)-3-(3',4'-metilenedioxibenzil)butirolactona [15] e a (-)-*trans*-2-(3'',4'-dimetoxibenzil)-3-(3',4'-metilenodioxibenzil)butirolactona [16], isoladas das folhas e galhos (McDONIEL 1992).

Da resina de *B. ariensis* foi identificada a lignana pertencente à classe dibenzilbutana ariesina [17] (HERNÁNDEZ *et al.*, 1983). Na espécie *B. permollis* são descritas as lignanas ariltetralina β-petaltina-metil-éter [18] e a nemerosina [19], que foram isoladas das cascas e apresentaram significativo potencial antimitótico contra linhas de células de astrócitos (WICKRAMARATNE *et al.*, 1995). Jolad *et al.* (1977) isolaram as lignanas ariltetralina deoxipodofilotoxina [1] e 5'-desmetoxideoxipodofilotoxina [20] das resinas de *B. morelensis*.

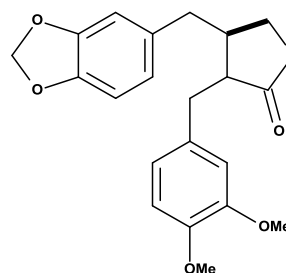
Em *B. tonkinensis* foram descritas as lignanas ariltetralinas burselignana [21], (+)-isolariciresinol [22], 5-metoxi-(+)-isolariciresinol [23], 4'-dimetildesóxi-podofilotoxina [24] e 4'-dimetildesóxi-podofilotoxina -4-O-β-D-glicosídeo [25] isoladas das raízes. Também nesta espécie, foi relatada a presença das neolignanas 1-(4'-hidróxi-3'-metóxi-fenil)-2-[4''-(3-hidróxi-propil)-2'',6''-dimetóxi-fenoxipronano-1,3-diol [26], burseneolignana [27], dihidrodehidroconiferil álcool [28] e 5-metóxi-*trans*-dihidrodehidroconiferil álcool [29] (JUTIVIBOONSUK *et al.*, 2005).



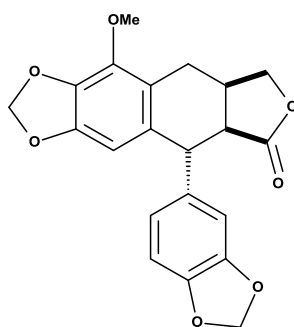
[10] $R_1 = \text{OH}$; $R_2 = \text{OMe}$

[11] $R_1 = \text{OAc}$; $R_2 = \text{OMe}$

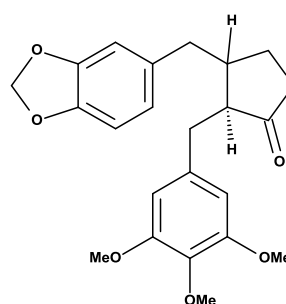
[12] $R_1 = \text{H}$; $R_2 = \text{H}$



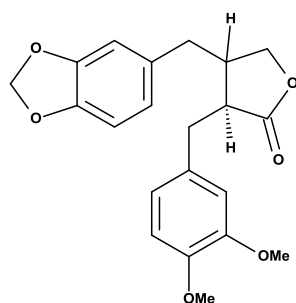
[13]



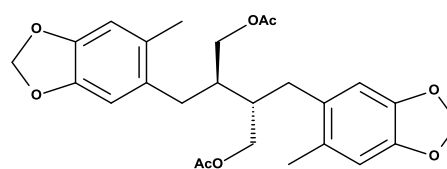
[14]



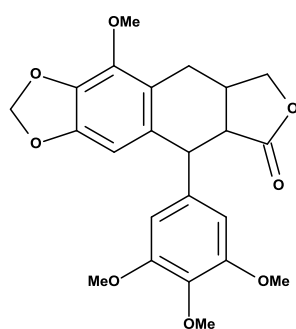
[15]



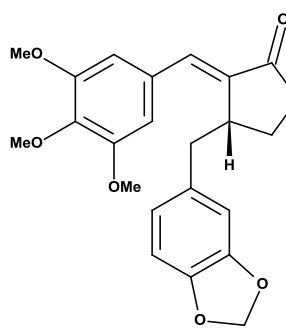
[16]



[17]

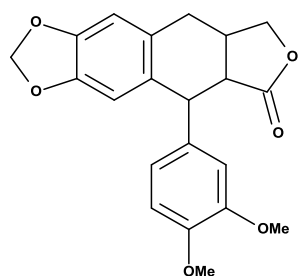


[18]

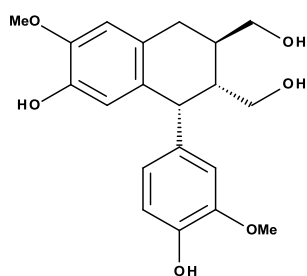


[19]

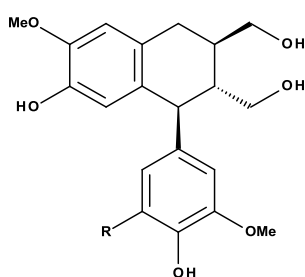
Figura 4: Lignoides do gênero *Bursera*.



[20]

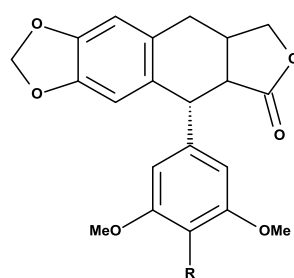


[21]



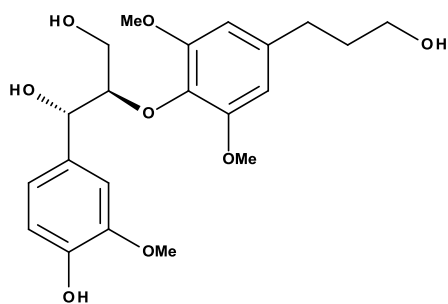
[22] R= H

[23] R= OMe

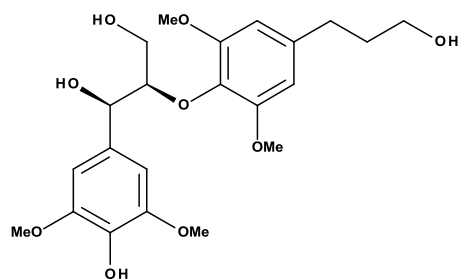


[24] R= OH

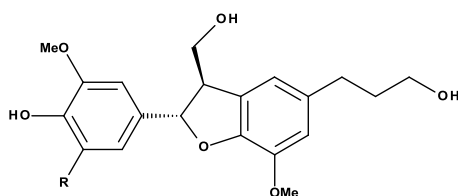
[25] R= OGlc



[26]



[27]



[28] R= H

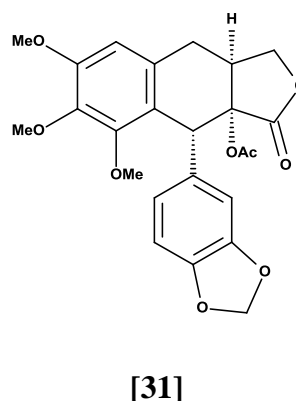
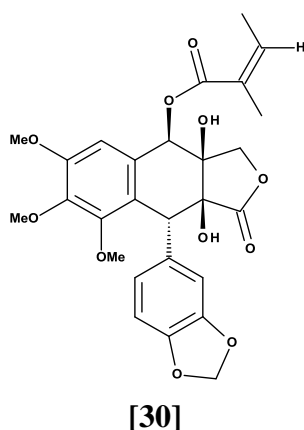
[29] R= OMe

Figura 5: Lignoides do gênero *Bursera*.

3.2.2. Lignanas do gênero *Commiphora*

Em estudos realizados com as resinas de *C. erlangiana*, foram identificadas as lignanas pertencentes à classe ariltetralina 2 β ,3 β -dihidróxi-6-metóxi-4 β -angeloiloxiisopropiloligamatina [30], 2 α -acetoxi-6-metoxipropiloligamatina [31], 2 α -acetoxideoxipropiloligamatina [32] e 2 α -acetoxi-3 β -hidroxiisodeoxipropiloligamatina [33] (DEKEBO *et al.*, 2002). Habtemariam (2003) também isolou estes mesmos constituintes desta mesma espécie, e avaliou o seu efeito citotóxico sobre células humanas e murínicas, sendo observada potencial atividade de ação citotóxica nas células descritas anteriormente.

Abbasi *et al.* (2005) isolaram as lignanas epiexcelsina [34] e 5'-demetoxiepiexcelsina [35] (figura 4), ambas pertencentes à classe furofurano, das folhas da espécie *C. mukul*. Estas lignanas apresentaram efeito inibitório contra a enzima α -glucosidase e citotóxico contra células de macrófago murino (ABBASI *et al.*, 2005; ABBASI *et al.*, 2009).



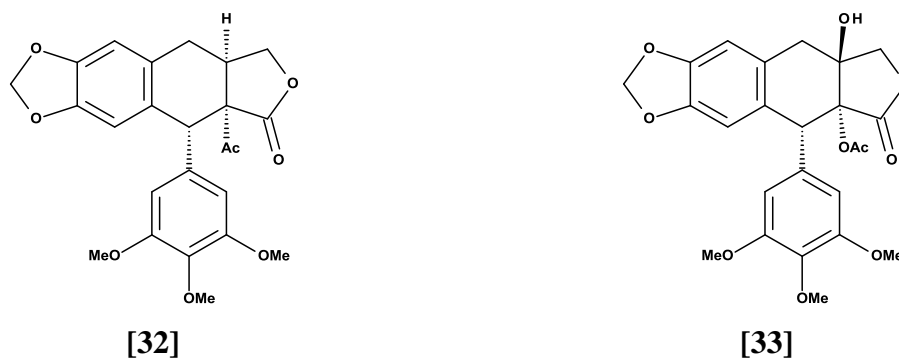


Figura 6: Lignanas do gênero *Commiphora*.

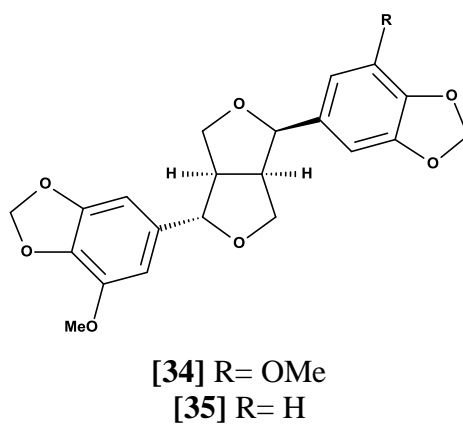


Figura 7: Lignanas do gênero *Commiphora*.

3.2.3. Lignanas dos gêneros *Crepidospermum* e *Tetragastris*

Na espécie *C. rhoifolium* foi identificada a lignana parabenzolactona [36], pertencente à classe dibenzilbutirolactona e, na *T. altissima* foi isolada a lignana (-)-savinina [37], também pertencente à classe dibenzilbutirolactona, podendo ser observadas na figura 8 (LIMA *et al.*, 2001).

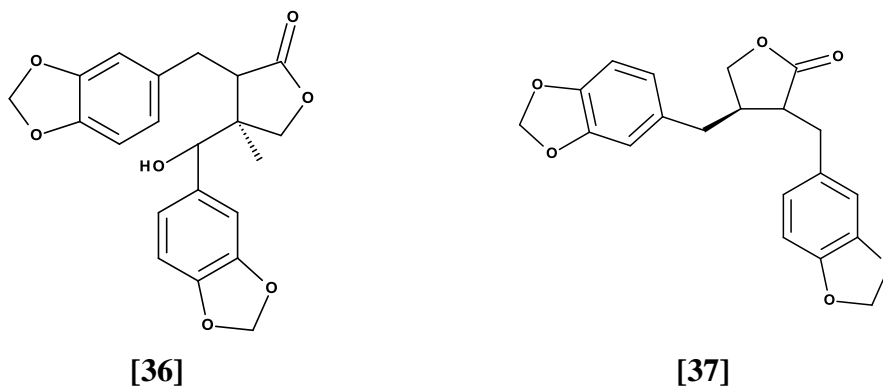
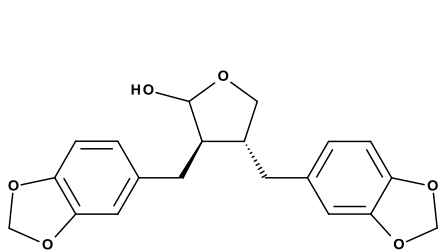


Figura 5: Lignanais do gênero *Crepidospermum* e *Tetragastris*.

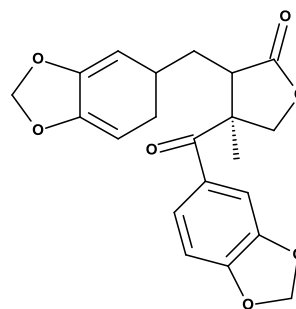
3.2.4. Lignóides do gênero *Protium*

Em estudo realizado com a madeira da espécie *P. tenuifolium*, Siqueira *et al.* (1995) identificaram as misturas epímeras de (-)-cubebina [38] e a lignana oxo-parabenzolactona [39] (figura 6), pertencentes à classe dibenzilbutirolactona. Siani *et al.* (1998) isolaram da madeira dessa espécie a lignana arilnaftaleno 5-metoxijusticidina A [40].

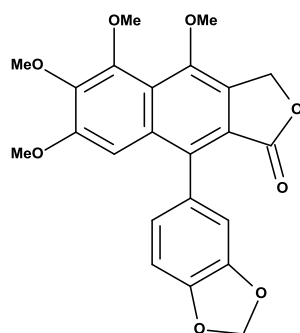
No gênero *Protium* são descritas também as neolignanais. Estudos com a madeira da espécie *P. opacum* é descrita a presença da neolignana propacina [41] (ZOGHBI *et al.*, 1981; MARQUES & YOSHIDA 1990), e Almeida *et al.* (2002) isolaram a neolignana propacina das cascas de *P. heptaphyllum*. Em outra espécie deste gênero, *P. unifoliolatum*, Magalhães *et al.* (2006) isolaram das cascas a neolignana 5-metoxipropacina [42].



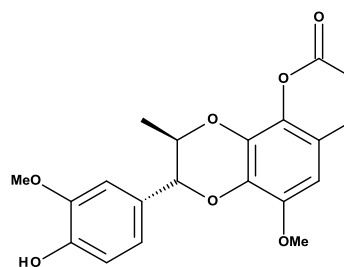
[38]



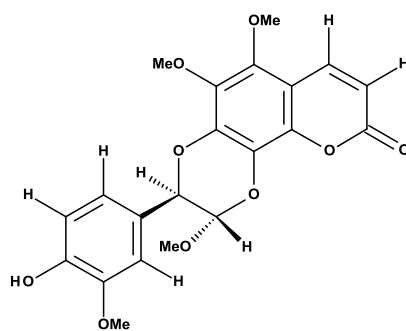
[39]



[40]



[41]



[42]

Figura 6: Lignanas do gênero *Protium*.

4. AVALIAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO

O perfil metabólito de extratos apresenta matriz bastante complexa, em razão da diversidade de estruturas químicas presentes nas plantas. Porém, o avanço tecnológico de técnicas analíticas como: cromatografia em fase gasosa, espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear, proporcionou um papel importante na elucidação de composições químicas complexas de origem vegetal (RODRIGUES *et al.*, 2006).

O uso destas técnicas possibilita a varredura ou determinação do perfil químico dos metabólitos presentes nos extratos de produtos naturais, pelo fato de serem análises rápidas e confiáveis para a distinção entre substâncias previamente identificadas ou de novas moléculas, a partir do extrato bruto. Dessa forma, eliminando ou diminuindo o exaustivo processo de isolamento e identificação de substâncias já conhecidas, ou ainda podendo levar a espécies de plantas onde a composição química similar, pode levar a obtenção de uma fonte exclusiva de um constituinte específico (CORDELL & SHIN 1999; HOSTETTMANN *et al.*, 2001; NIELSEN & SMEDGAARD, 2003; RODRIGUES *et al.*, 2006).

Com o advento destas técnicas, a quantidade de conjunto de dados produzidos são cada vez maiores e mais complexos. Desta forma, a quimiometria e a evolução dos computadores, tem grande importância no tratamento destes dados.

Nesse contexto, a quimiometria permite explorar os resultados obtidos por meio de análises químicas, a fim de verificar a existência de similaridades entre as amostras que, por sua vez, correspondem às semelhanças na composição química (CORREIA & FERREIRA, 2007).

Entre elas encontram-se as análises multivariadas de agrupamento hierárquico (HCA) e de componente principais (PCA). A análise de agrupamento hierárquico (HCA) é um processo que identifica grupos de amostras que se comportam da mesma forma ou apresentam características semelhantes, até a reunião de todos os pontos em um único grupo. Os resultados são apresentados na forma de um dendrograma que são especialmente úteis na visualização de semelhanças entre amostras ou objetivos representados por pontos em espaço com dimensão maior do que três, onde a representação de gráficos convencionais não é possível (NETO & MOITA, 1998).

A análise de componentes principais (PCA) é uma das principais ferramentas da análise multivariada sendo aplicada na análise de dados com muitas variáveis que tem sido bastante utilizada em diversos campos da ciência. Esta técnica tem sido muito empregada nas análises de “fingerprints” de metabólitos (CABRAL, 2010; RÜDIGER, 2012; BARBOSA, 2012). O PCA nos permite observar a existência ou não de amostras singulares, de relações entre as variáveis medidas e de relações ou agrupamentos entre amostras, separando a informação importante da redundante e aleatória.

5. METODOLOGIA

5.1. Coleta do material

As cascas e madeiras de Burseraceae fazem parte das amostras armazenadas do Projeto de Pesquisa Breus da Amazônia do Grupo de Pesquisa Química de Biomoléculas da Amazônia (Q-BiomA).

As coletas foram realizadas na Reserva Florestal Ducke (INPA) localizada na Rodovia AM 010 (Manaus – Itacoatiara), Km 26, Manaus, Amazonas e na Universidade Federal do Amazonas (UFAM) – Campus Setor Sul (Mini-campus), Manaus, Amazonas, nos meses de julho e outubro de 2009.

5.2. Obtenção dos extratos

A extração foi realizada submetendo as amostras das cascas e cerne dos galhos à solubilização exaustiva a temperatura ambiente (três extrações para cada solvente, trocados a cada dois dias) com solventes em ordem crescente de polaridade. As amostras foram pesadas em balança analítica TECNAL modelo Mark 210A e transferidas para frascos Erlenmeyer sendo adicionado hexano. Os extratos foram filtrados e submetidos à concentração em evaporador rotatório sob pressão reduzida. Após 3 extrações, foi obtido o extrato em hexano. O material residual foi submetido à extração em éter etílico e após 3 extrações foi obtido o extrato em éter etílico, sendo realizadas também com o solvente acetato de etila, assim como os outros solventes, após 3 extrações sendo obtido o seu extrato.

Em seguida os extratos foram deixados à temperatura ambiente para secagem e, posteriormente, acomodados em dessecador visando a eliminação total dos solventes e

da possível presença de água. Após este processo, as amostras foram cuidadosamente vedadas e armazenadas em refrigerador. O esquema de extração encontra-se na figura 7.

5.3. Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Para realização da placa cromatográfica (CCD) utilizou-se placa de sílica com espaçamento de 0,5 cm nos lados e entre as amostras, assim como o próprio espaço para aplicação da amostra também com essa dimensão. Nas margens inferior e superior da placa foi demarcado 1,5 e 0,5 cm respectivamente, sendo 8 cm o espaço total percorrido pelas amostras na placa.

Após aplicar 10 μ L da fração obtida com concentração de 5 mg/mL, as placas de sílica foram eluídas com os seguintes sistemas:

Extratos	Eluentes
Obtidos em éter etílico	Hexano/acetona 8:2
Obtidos em AcOEt	clorofórmio/acetato de etila 8:2

5.3.1. Cromatografia em Coluna Aberta em Fase Normal (CC)

Os extratos submetidos à cromatografia em coluna aberta em fase normal utilizaram como fase estacionária gel de sílica Silicycle G60 (70-230 mesh). Os eluentes utilizados nos processos foram determinados por CCD.

As CC foram realizadas em colunas de vidro com diâmetro interno ($\varnothing_{\text{int.}}$) de 1,5 e 2 cm. As colunas foram preparadas com uma base inferior de algodão (1 cm de altura).

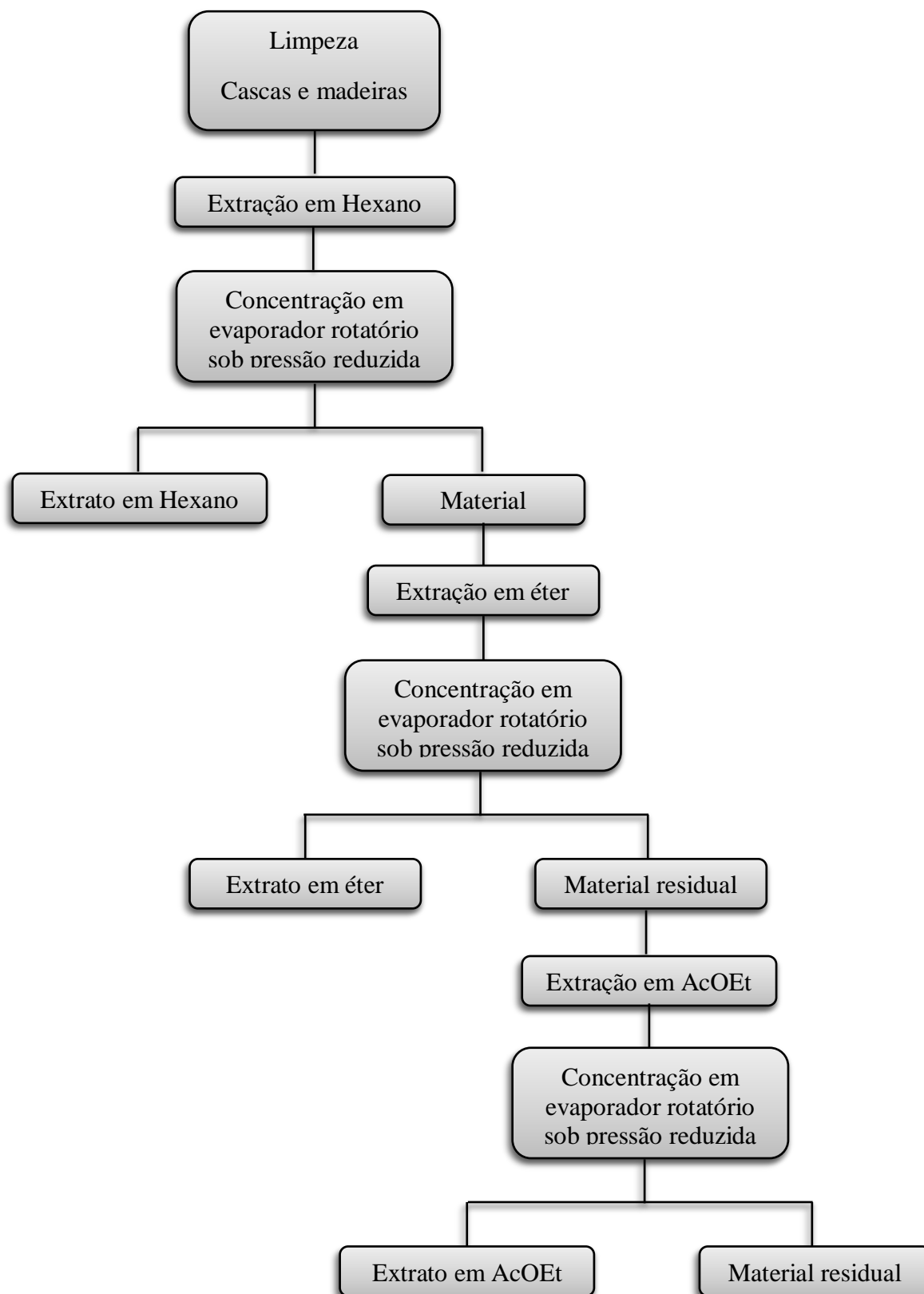


Figura 7: Diagrama de extração das cascas e cerne dos galhos das Burseraceae

5.3.2. Recristalização

Em sistemas onde uma substância apresenta-se majoritária na forma de cristais contendo contaminantes, e que apresentem dificuldade de separação pelos processos de cromatografias clássicos, utilizou-se a técnica de recristalização visando obter a substância majoritária cristalizada e a substância minoritária (contaminante) dissolvida no solvente utilizado (água mãe). Para este processo ser eficiente, é necessário no mínimo 3 recristalizações. Para cada amostra um solvente (ou mistura de solventes) em específico foi utilizado.

5.4. Análise Instrumental

5.4.1. Cromatografia a Gás com detector de Ionização de Chama (CG-DIC)

Os extratos obtidos em éter etílico de 10 espécies da família Burseraceae foram analisados em CG-DIC modelo GC 2010 da Shimadzu. Para a análise foram utilizadas as seguintes condições, temperatura do injetor: 250 °C; modo de injeção: split 1:10, gás de arraste: hélio (He), fluxo de 1,00 mL/min. Coluna CPSIL 5CB (15 m x 0,25 mm x 0,25 m). A programação do forno teve como temperatura inicial de 50 °C com gradiente de 30 °C/min até 200 °C, seguido de um gradiente de 5 °C/min até 250 °C e mais um gradiente de 5 °C/min até 290 °C com isoterma de 10 min. Total: 33 min. Temperatura do Detector: 300 °C. As áreas determinadas por integração dos picos gerados no cromatograma foram utilizadas para a quantificação das substâncias. Os cromatogramas foram obtidos na Central Analítica do Centro da Biotecnologia da Amazônia (CBA).

5.4.2. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

Os experimentos de ressonância magnética nuclear de próton (RMN de ^1H) foram realizados em espectrômetro INOVA-500 ($B_0 = 11,7 \text{ T}$) da Varian, localizado na Central Analítica do Centro de Biotecnologia da Amazônia.

Foram utilizados os solventes clorofórmio deuterado (CDCl_3), acetona deuterada ($\text{D}_3\text{CC}(=\text{O})\text{CD}_3$) e metanol deuterado (D_3COD).

Como referência para os deslocamentos químicos (δ) dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C foram utilizados os deslocamentos conhecidos dos solventes utilizados. Os decaimentos livres por indução (FID – Free Induction Decay) obtidos nos experimentos foram tratados no software ACD/NMR Processor Academic Edition versão 12.01 da Advanced Chemistry Development, Inc (ACD Labs).

5.4.3. Espectrometria de Massas

5.4.3.1. Cromatografia a Gás com detector de Espectrômetro de Massas (CG-EM)

Para a análise do perfil químico, os TIC's dos extratos em éter etílico de 9 espécies foram obtidos em cromatógrafo a gás modelo GC6890 da Agilent. Para a análise foram utilizadas as seguintes condições, temperatura do injetor: $250 \text{ }^\circ\text{C}$; modo de injeção: split 1:10, gás de arraste: hélio (He), fluxo de $1,00 \text{ mL/min}$. Coluna DB-5 (5% fenil 95% metilpolisiloxano) da Agilent ($30\text{m} \times 0,25\text{mm} \times 0,25\text{m}$). A programação do forno teve como temperatura inicial de $50 \text{ }^\circ\text{C}$ até $200 \text{ }^\circ\text{C}$ ($30 \text{ }^\circ\text{C/min}$), seguido de um gradiente de $200 \text{ }^\circ\text{C}$ até $250 \text{ }^\circ\text{C}$ ($5 \text{ }^\circ\text{C/min}$), e em $250 \text{ }^\circ\text{C}$ até $290 \text{ }^\circ\text{C}$ ($5 \text{ }^\circ\text{C/min}$) e aplicação de isoterminia de 10 min. Os espectros de massas foram obtidos por ionização gerada por Impacto Eletrônico (70eV).

5.4.3.2. Espectrometria de Massas por Captura de Íons (EMCI)

Os íons *Quasi* moleculares e seus fragmentos foram adquiridos em espectrômetro de massa por captura de íons LCQ-Fleet, da Thermo Fisher Scientific. As amostras foram solubilizadas em metanol HPLC na concentração de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e injetadas por inserção direta no espectrômetro de massas com fluxo de $30 \mu\text{L}/\text{min}$. Posteriormente, as amostras foram infundidas por uma bomba de injeção automática com um fluxo contínuo de $10 \mu\text{L}/\text{min}$ e ionizadas por eletrospray (IES), sendo os íons observados no modo positivo $[\text{M} - \text{H}]^+$. Para analisar os extratos das cascas e madeiras utilizaram-se os seguintes parâmetros de operação: *capilar voltage* 4,5 kV, *skimmer* 50 V e fluxo de gás nitrogênio de 250 e 30 L.h^{-1} . Os espectros de Massas por Captura de Íons foram editados no software Xcalibur 2.0.7.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Metodologia/filosofia do estudo

Após décadas de exploração da biodiversidade química pelos métodos da fitoquímica clássica, o imenso conjunto de dados disponíveis especialmente de RMN de ^1H e espectrometria de massas, possibilita a utilização de outras abordagens.

A análise de um complexo perfil metabólico baseando-se na aplicação de experimentos conjuntos de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H), espectrometria de massas com ionização por spray de elétrons (EM-ISE) e cromatografia em fase gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG-EM) é uma dessas abordagens cada vez mais viáveis, confiáveis e utilizadas para o estudo de moléculas orgânicas utilizando quantidades diminutas, com grande economia de tempo e recursos de consumíveis de laboratório.

Os lignóides constituem um grupo importante de substâncias fenólicas das plantas, estruturalmente caracterizados pelo acoplamento de unidades de fenilpropanóides, um grupo com uma grande variação estrutural resultando em uma diversidade de classes encontradas na natureza, como as lignanas e neolignanas.

Os lignóides presentes na família Burseraceae foram isolados e identificados de várias partes das plantas, apresentando grande diversidade estrutural, com estruturas fenólicas ou anéis aromáticos ligados a metoxilas e, portanto, com diferentes polaridades. Grande parte dos lignóides com anéis aromáticos ligados a metoxilas foram descritos principalmente nos gêneros encontrados na região amazônica (SIQUEIRA *et al.*, 1995; SIANI *et al.*, 1998; MAGALHÃES *et al.*, 2006). No presente estudo, o método de extração foi desenvolvido visando o direcionamento para a obtenção de

lignóides de baixa e média polaridade, com extrações sequenciais em éter etílico e acetato de etila após uma extração com hexano para que fossem retiradas as substâncias de baixa polaridade, ácidos graxos e terpenos muito comuns na família, como os triterpenos.

Assim, para as extrações de média polaridade (obtidas em éter e AcOEt) de dez espécies de Burseraceae: nove espécies do gênero *Protium* e uma de *Trattinnikia*, o trabalho foi dividido em três partes: análise do perfil metabólico por RMN de ^1H , EM-ISE e CG-EM; perfil cromatográfico (CCD); e análise quimiométrica.

Primeiramente, foi realizada a descrição do perfil metabólico de um conjunto de amostras de forma rápida, onde um grande e diferente número de metabólitos foi avaliado, sem a intenção de identificar cada metabólito detectado, mas comparar e classificar perfis ou modelos metabólicos, ou podendo identificar “novas substâncias” ou biomarcadores (DETTMER *et al.*, 2007). Essas análises foram realizadas pelas técnicas de RMN de ^1H e EM-ISE dos extratos obtidos em acetato de etila e éter etílico e análises por CG-EM foram feitas apenas para os extratos em éter na busca por substâncias de baixa polaridade.

A análise do perfil químico foi realizada na busca por extratos que apresentassem sinais de hidrogênios com deslocamentos químicos (δ) característicos de aromáticos (entre $\delta 6,5$ e $7,5$ ppm) na RMN de ^1H e por massas (m/z) de lignóides já descritas na literatura.

A segunda parte apresenta o perfil cromatográfico dos extratos obtidos em éter etílico e acetato de etila por CCD, a fim de avaliar as similaridades dos sinais observados com o revelador vanilina sulfúrica e promovendo-se a comparação entre as amostras.

Na terceira etapa foi realizada a análise quimiométrica dos dados obtidos por EM-ISE, em função do vasto volume de informações a ser considerado e pelo fato de grande parte do que se deseja elucidar são relações complexas, lineares ou não lineares.

Os extratos foram obtidos por maceração das cascas e madeiras de espécies do gênero *Protium* e *Trattinnickia* com os solventes éter etílico e acetato de etila. A lista com as espécies estudadas e os rendimentos (%) dos extratos encontra-se nas tabelas 2 e 3, respectivamente.

Tabela 2: Espécies de Burseraceae coletadas, com siglas utilizadas na dissertação.

Espécie	Éter etílico		AcOEt	
	Madeira	Casca	Madeira	Casca
<i>Trattinnickia glaziovii</i>	EFAM42	EFAM52	EFAM45	EFAM55
<i>Protium klugii</i>	ECJN42	ECJN52	ECJN45	ECJN55
<i>P. pilosissimum</i>	ECON42	ECON52	ECON45	ECON55
<i>P. cf. rubrum</i>	EDJN42	EDJN52	EDJN45	EDJN452
<i>P. apiculatum</i>	ECBM42	ECBM52	ECBM45	ECBM55
<i>P. trifoliolatum</i>	ECTN42	ECTN52	ECTN45	ECTN55
<i>P. cf. paniculatum</i>	EDIO42	EDIO52	EDIO45	EDIO55
<i>P. gallosum</i>	ECGN42	ECGN52	ECGN45	ECGN55
<i>P. nitidifolium</i>	ECKN42	ECKN52	ECKN45	ECKN55

Tabela 3: Rendimentos (%) dos extratos brutos e dos materiais vegetais.

Solvente	Parte da planta (100 g)	Extratos	Rendimento (%)
Éter etílico	Madeira	EFAM42	0,16
	Casca	EFAM52	0,96
	Madeira	ECJN42	0,15
	Casca	ECJN52	1,20
	Madeira	ECON42	0,08
	Casca	ECON52	0,32
	Madeira	EDJN42	0,16
	Casca	EDJN52	0,81
	Madeira	ECBM42	0,22
	Casca	ECBM52	1,50
	Madeira	ECTN42	0,08
	Casca	ECTN52	0,74
	Madeira	EDIO42	0,08
	Casca	EDIO52	0,65
	Madeira	ECGN42	0,15
	Casca	ECGN52	1,22
	Madeira	ECKN42	0,13
	Casca	ECKN52	1,60
AcOEt	Madeira	EFAM45	0,19
	Casca	EFAM55	0,36
	Madeira	ECJN45	0,21
	Casca	ECJN55	0,38
	Madeira	ECON45	0,26
	Casca	ECON55	0,57
	Madeira	EDJN45	0,37
	Casca	EDJN55	0,72
	Madeira	ECBM45	0,18
	Casca	ECBM55	0,50
	Madeira	ECTN45	0,11
	Casca	ECTN55	0,45
	Madeira	EDIO45	0,20
	Casca	EDIO55	0,36
	Madeira	ECGN45	0,19
	Casca	ECGN55	0,43
	Madeira	ECKN45	0,10
	Casca	ECKN55	0,60

Analisando os rendimentos observa-se maior quantidade nos extratos das cascas que da madeira, tanto em éter como em AcOEt.

O extrato que apresentou maior rendimento foi o obtido em éter das cascas (ECBM52), seguido do extrato obtido em AcOEt das cascas (EDJN55).

6.2. Análise do perfil metabólito dos extratos brutos das cascas e madeiras

6.2.1. Perfil metabólito por RMN de ^1H

Primeiramente, foi realizada análise dos extratos em éter e AcOEt pela técnica de RMN de ^1H , com o objetivo de identificar o maior número de classes de compostos presentes no extrato, não se preocupando com a sua quantificação. Esta técnica é fundamentalmente utilizada para a elucidação estrutural de metabólitos especiais, mas nas últimas duas décadas tem se mostrado bastante eficiente nos estudos de perfis químicos de amostras complexas (LOPES DA SILVA *et al.*, 2011). Isso se deve ao fato das análises serem realizadas com rapidez, e principalmente, pela grande quantidade de informação gerada em um único espectro. Esta informação é de grande importância, pois observando a região específica de hidrogênios aromáticos é possível sugerir que em determinado extrato encontram-se substâncias que possuem tais átomos, desta forma possibilitando encontrar várias classes de substâncias, como: flavanóides e lignóides.

As lignanas são classificadas em oito grupos, baseando-se na forma em que o oxigênio está incorporado no esqueleto, e cada grupo varia substancialmente em níveis de oxidação de ambos os anéis aromáticos da estrutura, possuindo dessa forma, distintas estruturas aromáticas, como pode ser visto na figura 8 (UMEZAWA, 2003). Por serem muito oxidadas e carregadas em funcionalidades com os anéis lactônicos de cinco membros e possuindo também grupos substituintes: hidroxí, metoxi e metilendioxí nos anéis aromáticos, cada estrutura aromática possuirá deslocamento químico característico

no espectro de RMN de ^1H , possibilitando sugerir quais tipos de compostos aromáticos poderá ser encontrado em uma determinada matriz vegetal.

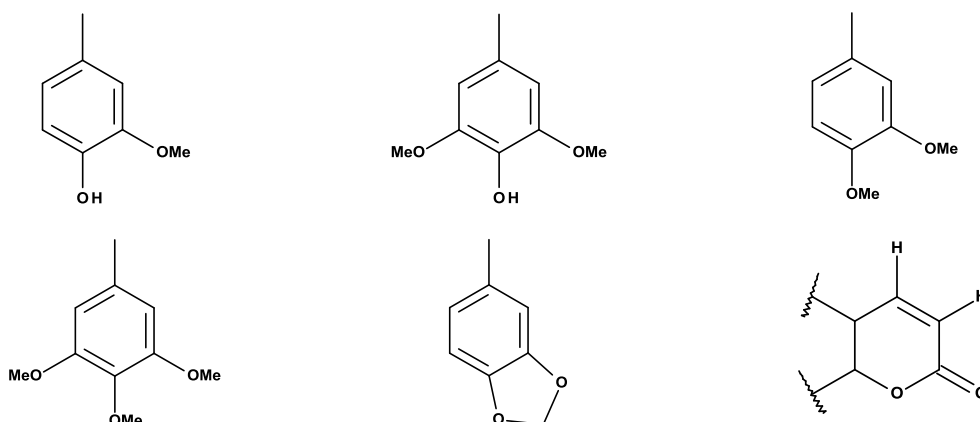
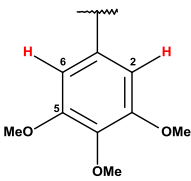
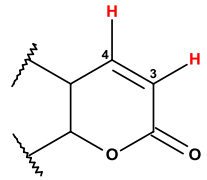
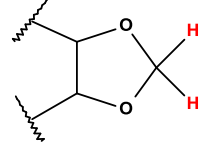


Figura 8: Principais estruturas encontradas nos lignóides.

Os dados da literatura da RMN de ^1H dos lignóides de Burseraceae nos permite realizar uma filtração bastante eficiente dos principais sinais de deslocamentos dos prótons aromáticos, lactônicos e dos metilenodióxi presentes nas estruturas dos lignóides, como pode ser visto na tabela 4.

Tabela 4: Principais sinais de deslocamentos dos prótons aromáticos, lactônicos e dos metilenodióxi

Prótons	Deslocamentos químicos	Referência
	$\text{H-2} = 6,70$; $\text{H-5} = 6,66$; $\text{H-6} = 6,46$	JUTIVIBOONSUK <i>et al.</i> , (2005)
	$\text{H-2} = \text{H-6} = 6,44$	JUTIVIBOONSUK <i>et al.</i> , (2005)
	$\text{H-2} = 6,90$; $\text{H-5} = 6,89$; $\text{H-6} = 6,70$	MALDINI <i>et al.</i> , (2009)

	H-2 = H-6 = 6,49	DEKEBO <i>et al.</i> , (2002)
	H-3 = 6,28; H-4 = 7,96	MAGALHÃES <i>et al.</i> , (2006)
	5,88; 5,90; 6,03; 6,08; 6,06	SIANI <i>et al.</i> , (1998); SIQUEIRA <i>et al.</i> , (1995)

Os espectros da RMN de ^1H dos extratos obtidos em éter etílico e AcOEt (Figuras 9 e 10) apresentaram grande similaridade, devido à região dos hidrogênios metílicos entre δ 0,80 e 1,70, o que se justifica pela possível presença de triterpenos, que são marcadores desta família.

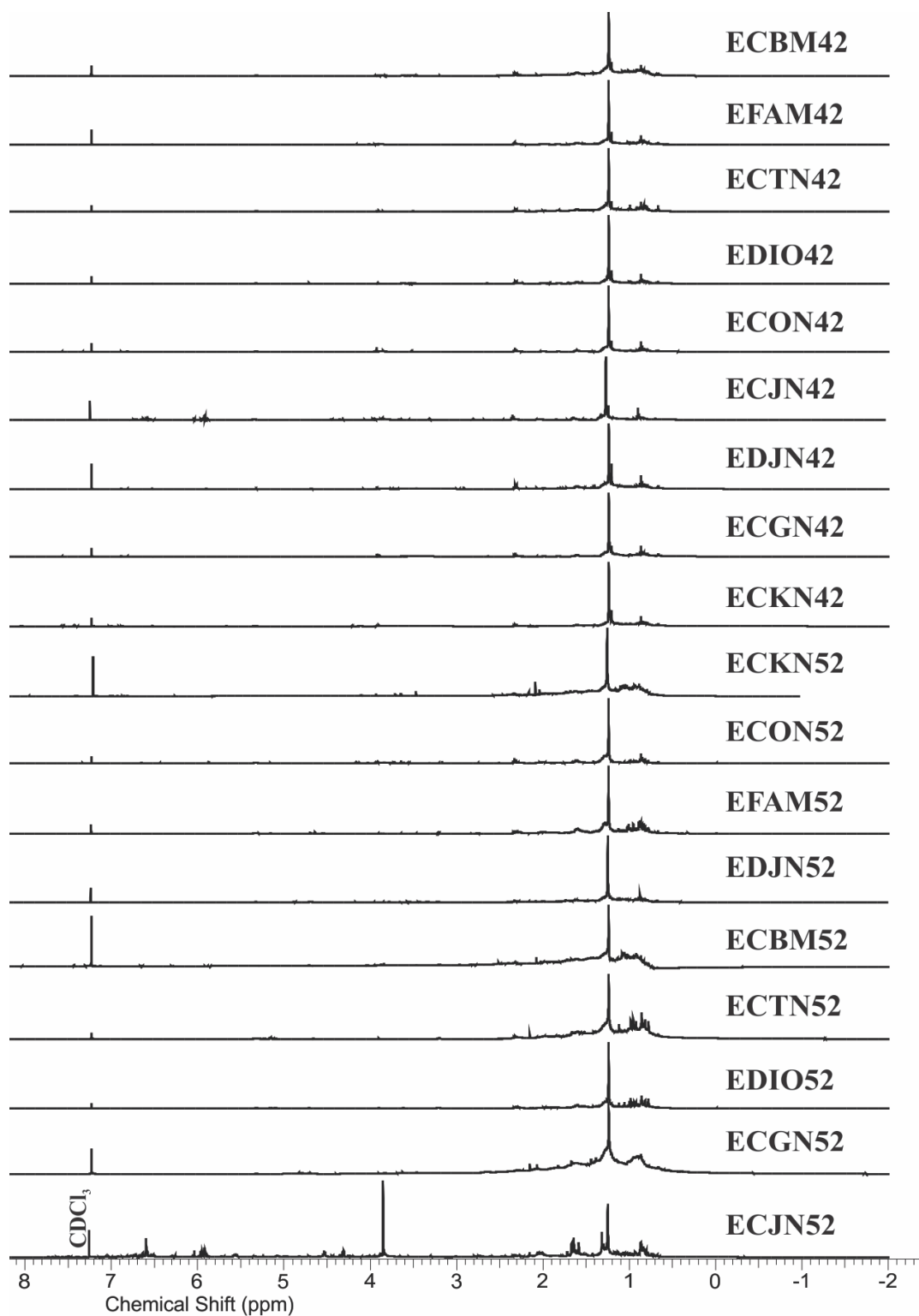


Figura 9: Espectro da RMN de ^1H (CDCl_3) dos extratos em éter.

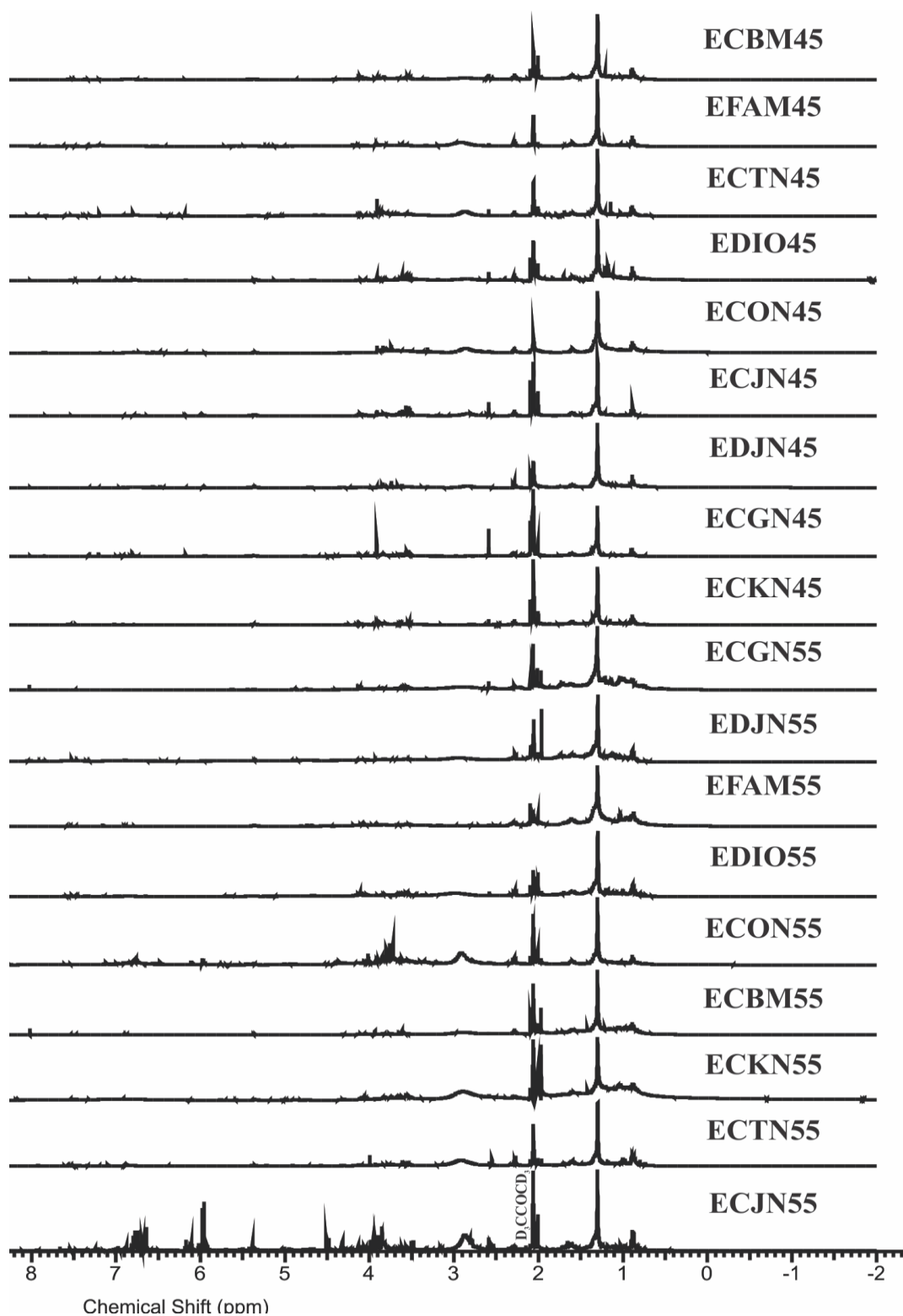


Figura 10: Espectros da RMN de ^1H (D_3CCOCD_3) dos extratos em AcOEt.

Dentre os espectros das figuras 9 e 10, apenas quatro apresentaram maiores diferenças: ECJN52, ECJN42 e ECJN55 da espécie *Protium klugii*, e o extrato ECON55 pertencente à espécie *P. pilosissimum*. Os extratos ECJN42 e ECJN52 foram obtidos da madeira e casca, respectivamente, em éter. E os extratos ECJN55 e ECON55 foram obtidos das cascas em AcOEt.

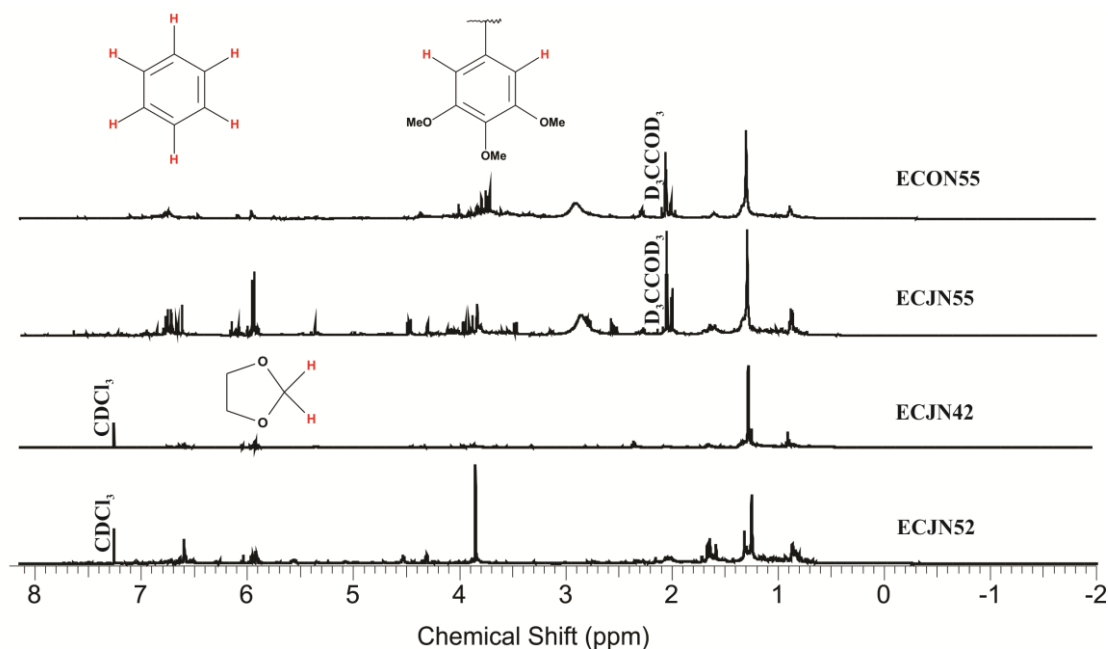


Figura 11: Ampliação dos espectros da RMN de ^1H dos extratos em AcOEt ECON55, ECJN55, e em éter ECJN42 e ECJN52.

Na ampliação dos espectros da figura 11, são encontrados sinais do tipo multiplete em região característica de prótons aromáticos, entre δ 6,5 e 7,5 ppm (PAVIA *et al.*, 2001), podendo sugerir que estes extratos possam ter substâncias desta classe orgânica, visto que na família Burseraceae, há relatos da coumarinas escopoletina (JUTIVIBOONSUK *et al.*, 2005; COSTA *et al.*, 2012), dos flavonóides 8-(3''-hidroxi-3''-metilbutil)-5,7,4'-trihydroxidihydroflavonol e 6'',6''-dimetildihidropirano-(2'',3'':7,8)-5,4'-dihydroxidihydroflavonol (SOUZA *et al.*, 1989) os lignóides (7'R,8R,8'R)-(-)-

deoxipodofilotoxina, burseneolignana (JUTIVIBOONSUK *et al.*, (2005); VELÁZQUEZ-JIMÉNEZ *et al.*, 2011), ilustradas na figura 12.

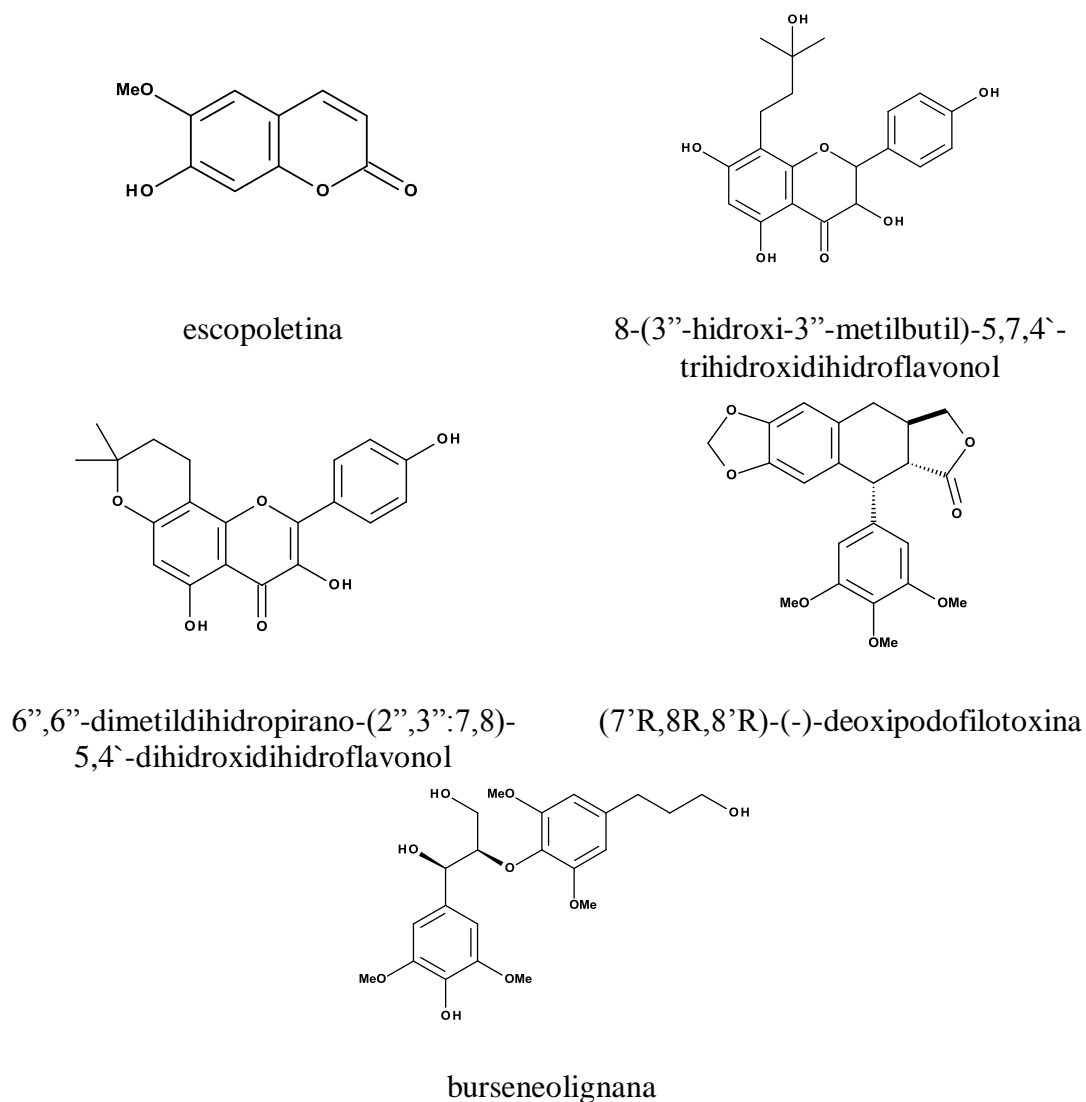


Figura 12: Estruturas aromáticas encontradas em Burseraceae.

São observados também, deslocamentos químicos com sinais de integração entre δ 5,9 e 6,04 ppm que podem sugerir estruturas constituídas de grupos metilenodioxí, como descrito no trabalho realizado por Siqueira *et al.*, (1995), no isolamento de lignanas de *Protium tenuifolium*, onde foram identificadas as lignanas (-)-*para*-benzolactona e o derivado oxidado oxo-*para*-benzolactona, ou ainda a lignana 5-

metoxijusticidina A, isolada por Siani *et al.* (1998) (Figura 6) página 30, isoladas do extrato etéreo da madeira.

É possível observar nos espectros dos extratos ECON55, ECJN55 e ECJN52, intenso sinal com deslocamento químico em δ 3,85 ppm, região essa, onde são descritos sinais de prótons referentes a grupos metoxilas.

Em Burseraceae já foram relatados alguns lignóides que apresentam grupos metoxilas em sua estrutura, sendo extraídas em diferentes polaridades de solventes. Estes lignóides metoxilados foram descritos apenas nas espécies do gênero *Bursera*, *Commiphora* e *Protium*, podendo ser observadas nas figuras 3, 4 e 6, respectivamente (BIANCHI *et al.*, 1968; JOLAD *et al.*, 1977; SIANI *et al.*, 1998; JUTIVIBOONSUK *et al.*, 2005; DEKEBO *et al.*, 2002; ABBASI *et al.*, 2005; VELÁZQUEZ-JIMÉNEZ *et al.*, 2011), que podem ser encontradas em extratos de baixa polaridade, como a neolignana 5-metoxipropacina isolada do extrato etéreo da espécie *P. unifoliolatum*, como ilustrado na figura 6 (MAGALHÃES *et al.*, 2006).

Com estes resultados preliminares, foi possível caracterizar os extratos a partir dos sinais característicos de determinadas funções e grupos orgânicos, como os aromáticos, os dioxi-metilenos e as metoxilas, e a partir destes deslocamentos químicos (δ) pode-se sugerir algumas estruturas de lignóides descritos na família. Portanto, definem-se as espécies que apresentam sinais de prótons de substâncias de interesse, como os aromáticos, por exemplo.

6.2.2. Análise por cromatografia em camada delgada dos extratos obtidos em éter e AcOEt.

A partir dos resultados da RMN de ^1H foi possível selecionar a espécie *Protium klugii* (ECJN52), onde observou-se intensos sinais de prótons aromáticos, metilenodióxi e metoxilas, para que fossem realizadas as análises por CCD.

Os perfis cromatográficos obtidos por CCD das amostras dos extratos em éter e AcOEt, permitiram uma análise comparativa entre as espécies estudadas, quanto a um estudo intrafamiliar da família Burseraceae. A partir das similaridades químicas de seus metabólitos, foi possível realizar uma correlação entre a complexidade da composição química das espécies.

6.2.2.1. Cromatografia em camada delgada dos extratos obtidos em éter

No cromatograma 1 (Figura: 33) foram analisados os extratos obtidos em éter etílico das cascas das espécies de *Protium klugii* (ECJN52), *P. paniculatum* (EDIO52), *P. pilosissimum* (ECON52), *P. trifoliolatum* (ECTN52), *P. gallosum* (ECGN52) e *P. apiculatum* (ECBM52). Os extratos ECJN52, EDIO52, ECON52, ECTN52 e ECBM52 apresentaram perfis cromatográficos semelhantes em relação às manchas roxas com fatores de retenções (R_f s) 0,90, 0,82 e 0,64. Os extratos ECJN52 e ECGN52 apresentaram os perfis cromatográficos mais distintos, sendo que o extrato ECJN52 é o que apresenta maior diferença. Neste extrato, é possível observar a presença de três substâncias com R_f s 0,24 (cor marrom), 0,28 (cor azul) e 0,31 (cor marrom) que somente aparecem nesta amostra. No extrato ECGN52, não há uma boa separação com esse eluente, pois as substâncias presentes nesta amostra são de maior polaridade.

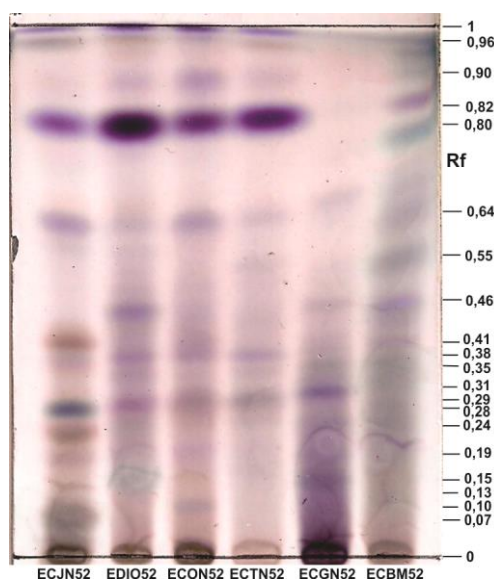


Figura 33: CCD dos extratos em éter das espécies *Protium klugii* (ECJN52), *P. paniculatum* (EDIO52), *P. pilosissimum* (ECON52), *P. trifoliolatum* (ECTN52), *P. gallosum* (ECGN52) e *P. apiculatum* (ECBM52).

No cromatograma 2 (Figura: 34) foram analisados os extratos obtidos em éter etílico das cascas das espécies de *P. apiculatum* (ECBM52), *Protium nitidifolium* (ECKN52), *P. cf. rubrum* (EDJN52), *Trattinnikia glaziovii* (EFAM52) e das madeiras das espécies de *P. pilosissimum* (ECON42), *P. klugii* (ECJN42), *P. trifoliolatum* (ECTN42), *Trattinnikia glaziovii* (EFAM42), *P. cf. rubrum* (DJN42), *P. apiculatum* (ECBM42), *P. nitidifolium* (ECKN42), *P. cf. paniculatum* (EDIO42) e *P. gallosum* (ECGN42). Estas espécies apresentaram perfil cromatográfico semelhante, sendo observada a presença da substância com Rf 0,2 em todos os extratos, e assim como no cromatograma 1, as manchas roxas com fatores de retenções (Rf) 0,82 e 0,64 foram predominantes nestas espécies. A mancha roxa com Rf 0,82 foi observada nas espécies ECKN52, EDJN52, EFAM52, ECON42, ECTN42, EFAM42, ECBM42, ECKN42 e EDIO42.

As espécies ECBM52, ECKN52 e ECDM42 apresentaram perfis cromatográficos semelhantes, sendo observada a mesma substância (cor azul) com Rf 0,80. A amostra EFAM52 apresentou poucas manchas, e com a substância de Rf 0,82

com alta concentração. A espécie EDIO42 apresentou perfil cromatográfico semelhante com as demais espécies, mas apresentando uma mancha azul com alta concentração com Rf 0,10.

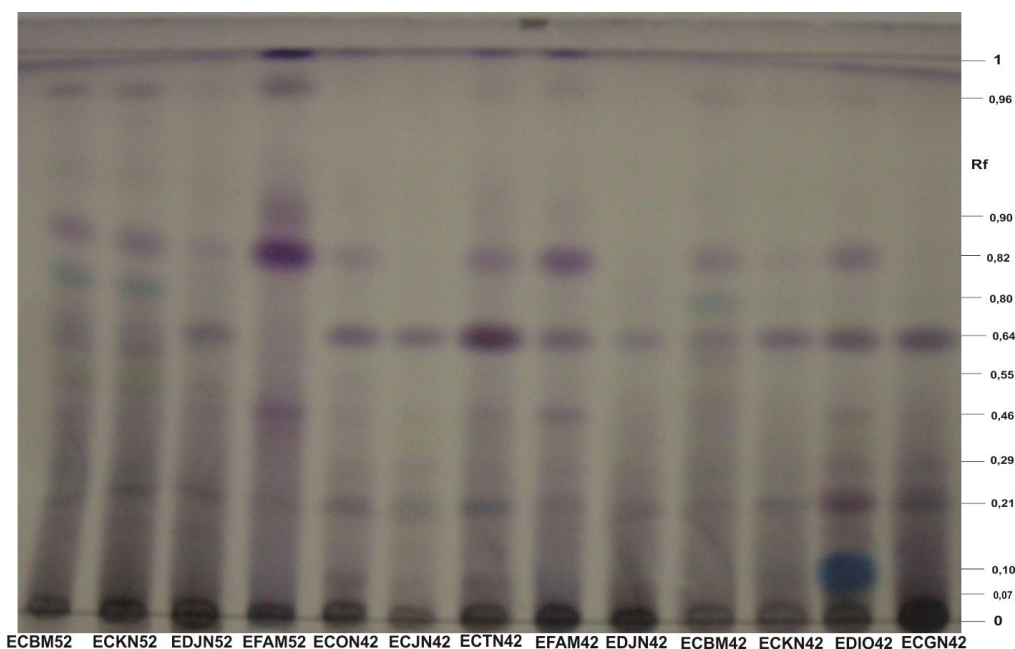


Figura 34: CCD dos extratos em éter das espécies *P. apiculatum* (ECBM52), *Protium nitidifolium* (ECKN52), *P. cf. rubrum* (EDJN52), *Trattinnikia glaziovii* (EFAM52) e das madeiras das espécies de *P. pilosissimum* (ECON42), *P. klugii* (ECJN42), *P. trifoliolatum* (ECTN42), *Trattinnikia glaziovii* (EFAM42), *P. cf. rubrum* (DJN42), *P. apiculatum* (ECBM42), *P. nitidifolium* (ECKN42), *P. cf. paniculatum* (EDIO42) e *P. gallosum* (ECGN42).

Os dados coletados nos cromatogramas obtidos por CCD para os extratos em éter etílico foram inseridos na tabela 5 e distribuídos em uma matriz X:Y, sendo descrito a presença dos Rf para cada amostra avaliada. A matriz foi constituída considerando a presença (1) ou ausência (0) do Rf, não sendo considerada a quantidade da substância presente. A análise do Software R® gerou o dendrograma com a distribuição hierárquica química das espécies por CCD, que é apresentado na figura 35.

Tabela 5: Fator de retenção para os extratos obtidos em éter etílico

Amostra	Fator de Retenção (<i>R_f</i>)																			
	0,07	0,1	0,13	0,15	0,19	0,24	0,21	0,28	0,29	0,31	0,35	0,38	0,41	0,46	0,55	0,64	0,8	0,82	0,9	0,96
ECJN52	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1		1
EDIO52	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1
ECON52	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1
ECTN52	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1
ECGN52R	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
ECBM52	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
ECKN52	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1
EDJN52	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1
EFAM52	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1
ECON42	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
ECJN42	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
ECTN42	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1
EFAM42	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1
EDJN42	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
ECBM42	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1
ECKN42	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
EDIO42	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1
ECGN42	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
ECDM42	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1
ECRM42	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1

Obs.: 1 - presença de *R_f*; 0 - ausência de *R_f*.

A análise hierárquica por agrupamentos (Figura 35) para os extratos obtidos em éter etílico das espécies de Burseraceae foi dividida em dois grupos conforme suas variações químicas.

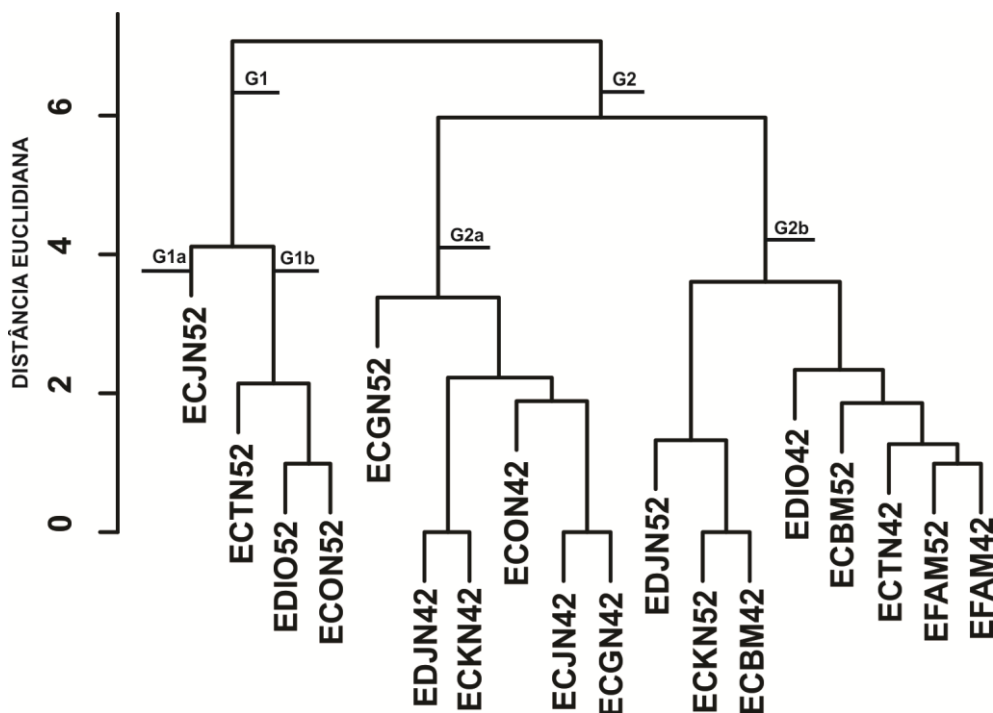


Figura 35: Dendrograma de agrupamento químico para as espécies de Burseraceae. Dados dos valores do fator de retenção por CCD para os extratos em éter analisados com software R, utilizando método “ward”.

O agrupamento no grupo G1 ocorreu devido às espécies ECJN52, EDIO52, ECON52 e ECTN52 apresentarem em comum, as manchas com Rf 0,19, 0,35 e 0,38. Diferentemente do grupo G2, em que nenhuma espécie apresentou manchas com esses Rfs.

O grupo G1 foi dividido em dois grupos G1a e G1b. O G1a, referente à espécie *Protium klugii*, apresentou as manchas com Rf 0,13, 0,24, 0,28 e 0,41, que somente foram observadas nela, sendo que esta amostra apresentou maior diversidade de substâncias eluídas nesse eluente. O grupo G1b, com as espécies *P. paniculatum*, *P.*

pilosissimum e *P. trifoliolatum*, foram agrupadas devido a presença das substâncias com Rfs 0,15 e 0,29.

O grupo G2 também foi dividido em dois subgrupos, G2a e G2b. O grupo G2a foi agrupado com as espécies ECGN52, EDJN42, ECKN42, ECON42, ECJN42 e ECGN42 que apresentaram comumente as substâncias com Rf 0,46, 0,82 e 0,96, contrariamente ao grupo G2b.

A partir destes resultados foram observadas que algumas espécies apresentaram perfis cromatográficos diferentes das demais e que exibiram substâncias que majoritárias. Correlacionando estes resultados com os dados obtidos das análises de RMN de ^1H , EM-ISE e CG-EM, verifica-se que o extrato ECJN52 (*Protium klugii*), apresentou o perfil cromatográfico mais distinto e com maior riqueza de substâncias no eluente utilizado, sendo mais um forte indicativo da presença de substâncias de classes diferentes.

A fim de identificar os constituintes majoritários presentes em todas ou na maioria das espécies, foram selecionadas as espécimes *Trattinnikia glaziovii* (cromatograma 2), com uma mancha roxa de Rf 0,82, *P. apiculatum* (cromatograma 1), apresentando mancha azul clara com Rf 0,80, e *P. cf. paniculatum* (cromatograma 2), exibindo uma interessante mancha azul majoritária com Rf 0,10.

6.2.2.2. Fracionamento do extrato em éter de *Trattinnikia glaziovii* (EFAM52)

O extrato EFAM52 foi selecionado para o fracionamento devido à presença, em alta concentração, da substância com Rf 0,82 que está presente em quase todas as espécies analisadas por CCD.

O extrato etéreo (0,5 g) foi fracionado em coluna com gel de sílica (70-230 mesh), eluída com hexano, acetato de etila e metanol, em ordem crescente de polaridade, sendo recolhidas 10 frações, conforme a figura 36. A fração 5 apresentou precipitados, que foi submetido a lavagens com metanol, acetona e AcOEt para purificação do mesmo, denominada EFAM52C1F5P.

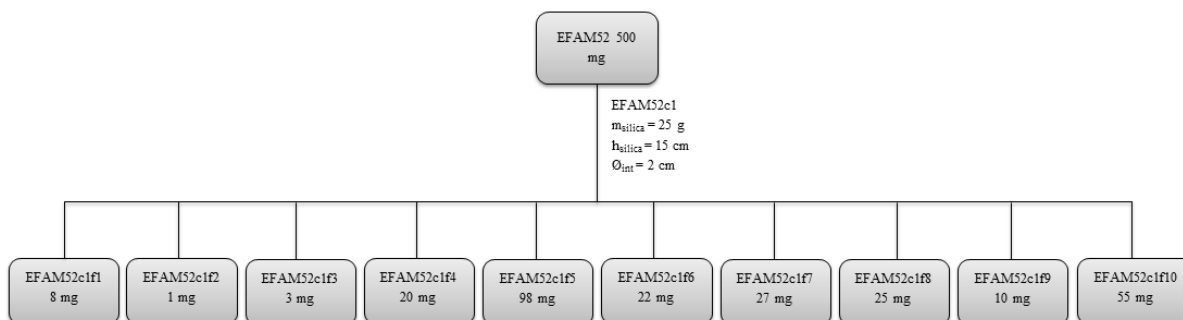


Figura 36: Fracionamento do extrato EFAM52.

Para identificação da EFAM52C1F5P, 10mg foram submetidas à análise de cromatografia gasosa com detector de espectrômetro de massas (CG-EM). Com essa análise, foram gerados dois espectros (figura: 37 e 38), os quais apresentaram fragmentações semelhantes, indicando uma possível mistura de isômeros. Na análise dos espectros, verificou-se que ambos apresentaram o mesmo íon molecular de 426 m/z $[M]^+$ e o íon m/z 218 (pico base) que é característico de triterpenos pentacíclicos (SHIOJIMA *ET AL.*, 1992), e apresentaram fragmentações menos intensas com m/z 203 e 189 por perda de CH_3 ou C_2H_5 .

Os triterpenos α - e β -amirina são relatados como constituintes majoritários de espécies de Burseraceae, principalmente de suas resinas, já tendo sido isolados dos gêneros *Aucoumea* (TESSIER *et al.*, 1982), *Boswellia* (XAASAN *et al.*, 1984), *Bursera* (KHALID, 1983), *Canarium* (VIDAL & DELAVEAU, 1985), *Commiphora* (KHALID,

1983), *Dacryodes* (KHALID, 1983), *Protium* (ZOGHBI ET AL., 1993) e *Trattinnickia* (LIMA ET AL., 2004).

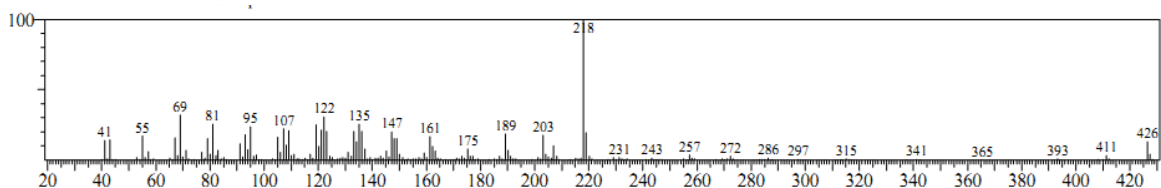


Figura 37: Espectro de massas da α -amirina.

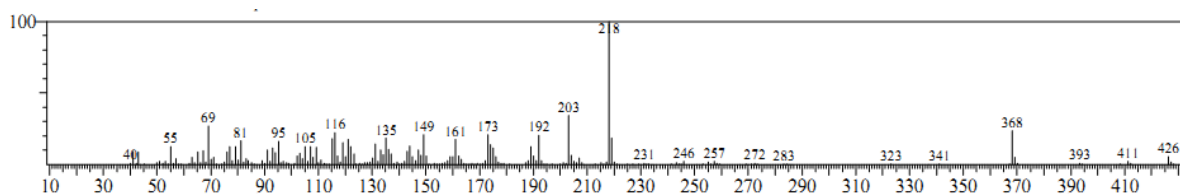


Figura 38: Espectro de massas da β -amirina.

Antes da escolha dessa amostra, foram realizadas CCDs com padrões de triterpenos e esteróis, mas não foi possível realizar a comparação, pois não apresentavam o mesmo Rf, talvez ocasionado pelo efeito de matriz, já que se tratava de uma amostra de extrato bruto e que tinha sido previamente desengraxada com hexano, dessa forma sendo preciso ser realizado o fracionamento.

Após a análise dos fracionamentos dos extratos em éter de *P. apiculatum* (ECBM52) e *P. cf. paniculatum* (EDIO42), foram realizadas CCDs para a avaliação do perfil cromatográfico, porém, foi observado que o rendimento e a separação dos constituintes não foram satisfatórios. Como o objetivo deste trabalho não foi o estudo de fitoquímica clássica, os fracionamentos posteriores não foram realizados.

6.2.2.3. Cromatografia em camada delgada dos extratos obtidos em acetato de etila.

No cromatograma 3 (Figura: 39) foram analisados os extratos obtidos em acetato etílico das cascas das espécies *Protium klugii* (ECJN55), *P. cf. paniculatum* (EDIO55), *P. pilosissimum* (ECON55), *P. trifoliolatum* (ECTN55), *P. gallosum* (ECGN55), *P. apiculatum* (ECBM55), *P. nitidifolium* (ECKN55), *P. cf. rubrum* (EDJN55), *Trattinnikia glaziovii* (EFAM55), e da madeira *P. pilosissimum* (ECON45) e *P. klugii* (ECJN45). Em todas as espécies foi observada a mancha rocha com Rf 0,83. Os extratos ECBM55 e ECKN55 apresentaram perfis cromatográficos semelhantes, com a presença das substâncias com Rf 0,88, 0,89 e 0,98.

E as espécies ECJN55, EDIO55, ECTN55 e ECJN45 foram as amostras que exibiram perfis cromatográficos mais distintos deste grupo, apresentando substâncias com Rfs 0,08, 0,11, 0,23, 0,33 e 0,59.

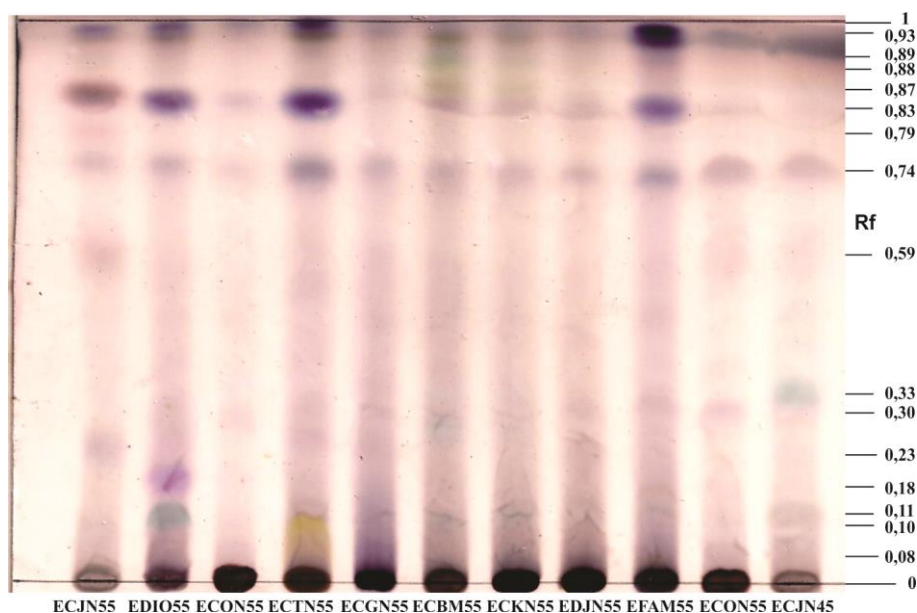


Figura 39: CCD dos extratos em AcOEt das espécies *Protium klugii* (ECJN55), *P. cf. paniculatum* (EDIO55), *P. pilosissimum* (ECON55), *P. trifoliolatum* (ECTN55), *P. gallosum* (ECGN55), *P. apiculatum* (ECBM55), *P. nitidifolium* (ECKN55), *P. cf. rubrum* (EDJN55), *Trattinnikia glaziovii* (EFAM55), e da madeira *P. pilosissimum* (ECON45) e *P. klugii* (ECJN45).

No cromatograma 4 (Figura: 40) foram avaliados os extratos obtidos em acetato etílico das madeiras das espécies *P. klugii* (ECJN45), *P. trifoliolatum* (ECTN45), *Trattinnikia glaziovii* (EFAM45), *P. cf. rubrum* (EDJN45), *P. apiculatum* (ECBM45), *P. nitidifolium* (ECKN45), *P. cf. paniculatum* (EDIO45) e *P. gallosum* (ECGN45). Em todas as espécies foi verificada a substância com Rf 0,83, assim como no cromatograma 3, sendo uma substância que está presente tanto nas cascas, quanto nas madeiras. Os extratos ECBM45 e ECKN45 apresentaram perfil cromatográfico idêntico, com as substâncias de Rf 0,11 (mancha azul clara), 0,18 (mancha rosa) e 0,33. E a espécie EDIO45 foi a mais distinta, exibindo duas substâncias bastante concentradas, com Rfs 0,11 (mancha azul escura) e 0,18 (mancha roxa).

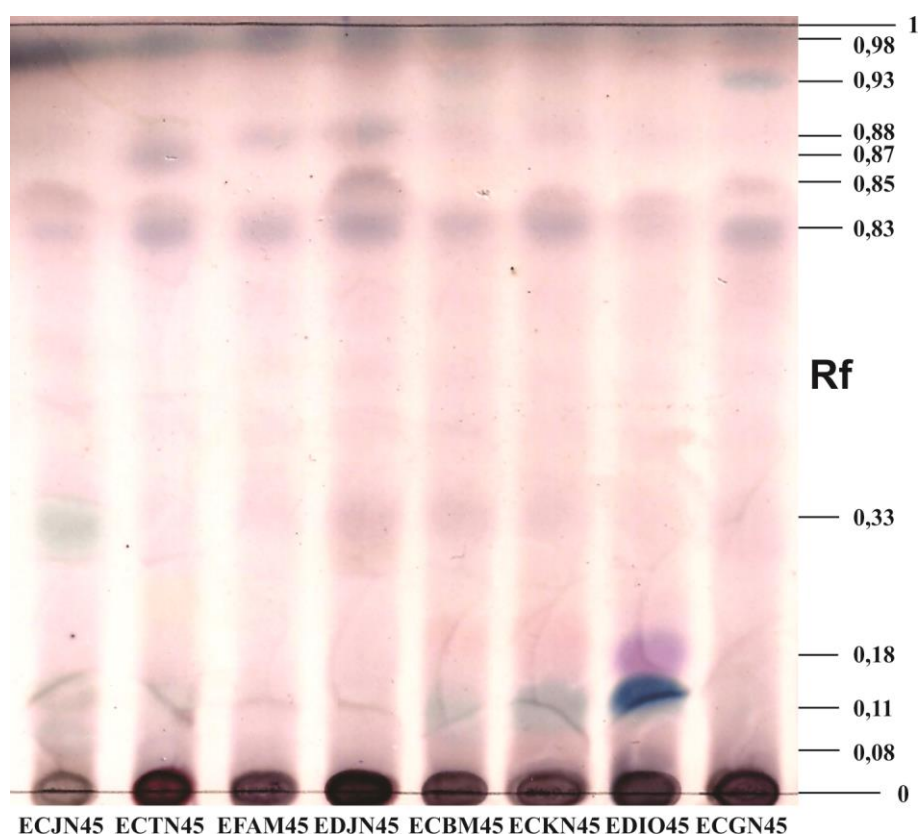


Figura 40: CCD dos extratos em AcOEt das espécies *Protium klugii* (ECJN55), *P. cf. paniculatum* (EDIO55), *P. pilosissimum* (ECON55), *P. trifoliolatum* (ECTN55), *P. gallosum* (ECGN55), *P. apiculatum* (ECBM55), *P. nitidifolium* (ECKN55), *P. cf.*

rubrum (EDJN55), *Trattinnikia glaziovii* (EFAM55), e da madeira *P. pilosissimum* (ECON45) e *P. klugii* (ECJN45).

Os dados coletados nos cromatogramas obtidos por CCD para os extratos em éter etílico foram inseridos na tabela 6 e distribuídos em uma matriz X:Y, sendo descrito a presença dos Rf para cada amostra avaliada. A matriz foi constituída considerando a presença (1) ou ausência (0) do Rf, não sendo considerada a quantidade da substância presente. A análise do Software R® gerou o dendrograma com a distribuição hierárquica química das espécies por CCD, que é apresentado na figura 41.

A análise hierárquica por agrupamentos (figura: 41) dos extratos obtidos em acetato de etila foi dividida em dois grupos conforme as variações químicas distribuídas pelo Software R no método Ward.

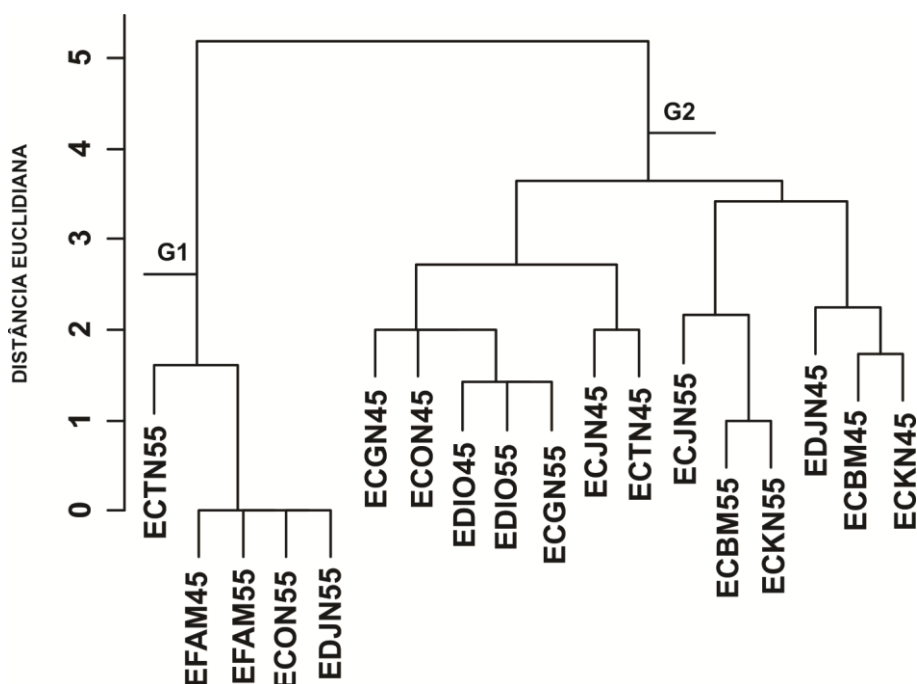


Figura 41: Dendrograma de agrupamento químico para as espécies de Burseraceae. Dados dos valores do fator de retenção por CCD para os extratos em AcOEt analisados com software R, utilizando método “ward”.

Tabela 6: Fator de retenção para os extratos obtidos em AcOEt.

Amostra	Fator de Retenção (<i>R_f</i>)																
	0,08	0,1	0,11	0,18	0,23	0,3	0,33	0,59	0,74	0,79	0,83	0,85	0,87	0,88	0,89	0,93	0,98
ECJN55	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1
EDIO55	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
ECON55	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1
ECTN55R	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1
ECGN55R	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
ECBM55	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1
ECKN55R	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1
EDJN55	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1
EFAM55	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1
ECON45	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
ECJN45	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
ECTN45	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0
EFAM45	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1
EDJN45	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1
ECBM45	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1
ECKN45	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1
EDIO45	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
ECGN45	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1

Obs.: 1 - presença de *R_f*; 0 - ausência de *R_f*.

Grupo químico 1 (G1): constituído pelas cascas das espécies *P. trifoliolatum*, *Trattinnikia glaziovii*, *P. pilosissimum*, *P. cf. rubrum* e a madeira da espécie *Trattinnikia glaziovii*.

Grupo químico 2 (G2): constituído pelas cascas e madeiras das espécies *P. trifoliolatum*, *P. pilosissimum*, *P. cf. rubrum*, *P. apiculatum*, *Protium nitidifolium*, *P. klugii*, *P. cf. paniculatum* e *P. gallosum*.

No G1 observa-se o agrupamento entre as espécies pela presença da substância com Rf 0,87 e 0,98. E verifica-se também a proximidade da casca e madeira da espécie *Trattinnikia glaziovii*, que apresentaram perfil cromatográfico semelhante.

No grupo G2 foram observadas que a similaridade das espécies, em relação às substâncias analisadas por CCD, ocorreu devido a maior presença das manchas com Rf 0,11, 0,18, 0,74, 0,85 e 0,88.

6.2.3. Perfil metabólico por espectrometria de massas com ionização por spray de elétrons (EM-ISE)

A espectrometria de massas é uma técnica bastante ampla, abrangendo várias áreas da química e biologia. Isso se deve principalmente ao desenvolvimento de novas técnicas de ionização que a revitalizaram, fazendo que as análises sejam realizadas com rapidez, sensibilidade de picomol a femtomol, seletividade e preparo mínimo de amostra.

Esta técnica pode ser aplicada em análises com um grande conjunto de amostras de forma rápida, onde uma matriz complexa de extrato bruto com diferentes classes de metabólitos especiais pode ser analisada, ainda tendo a possibilidade confirmar a identidade dos constituintes presentes em amostras biológicas complexas (KATJA *et al.*, 2007; VILLAS-BÔAS *et al.*, 2005).

Diante desse contexto, as análises dos extratos em éter e AcOEt foram realizadas em uma faixa de m/z pré-determinada (Figuras 13 e 14), entre 300 e 600, com objetivo de gerar um perfil de m/z de lignóides já descritos em Burseraceae, que variam entre m/z 352 e 528, e sendo realizadas por infusão direta no modo positivo.

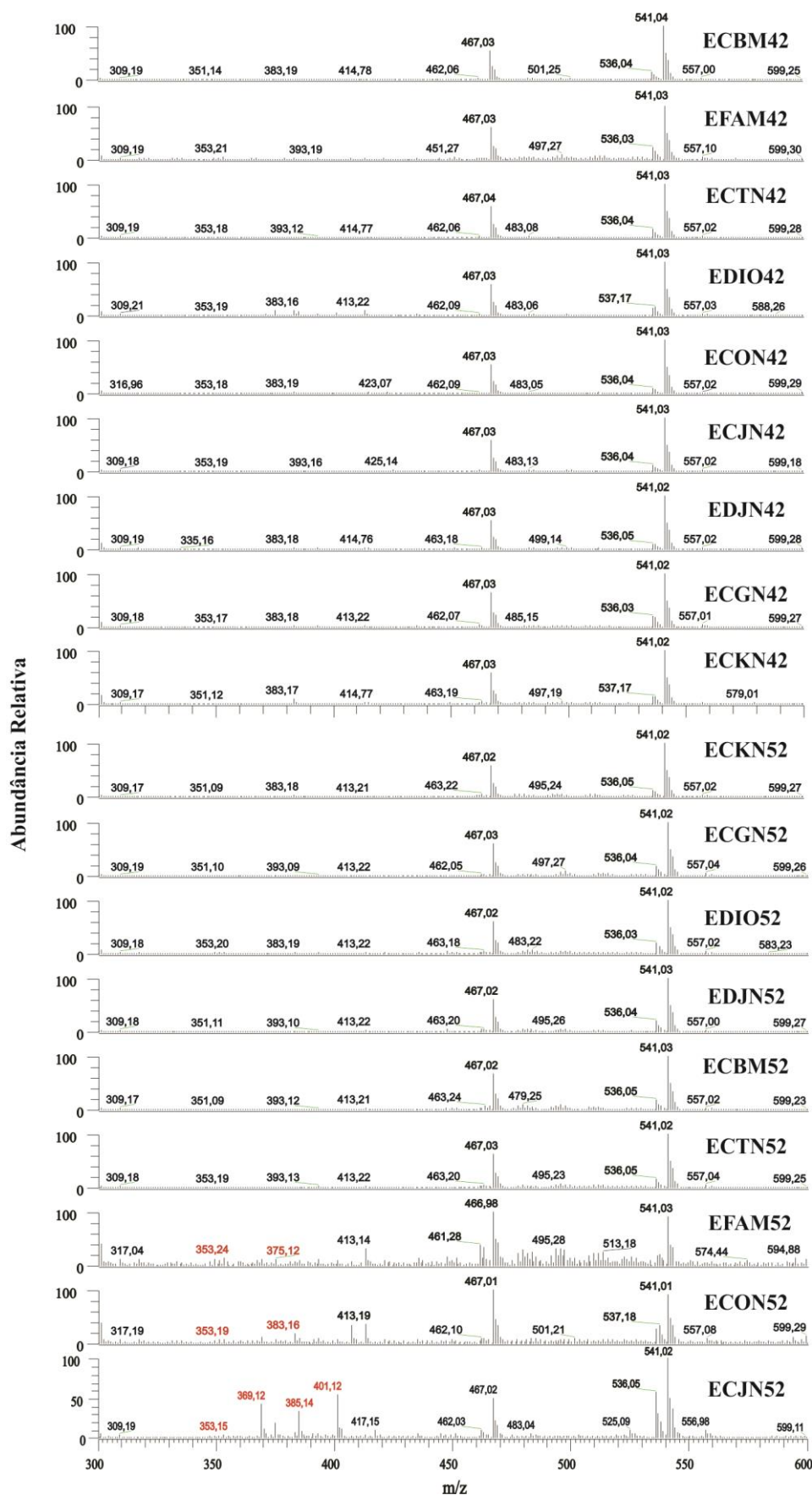


Figura 13: Espectros de massas dos extratos obtidos em éter.

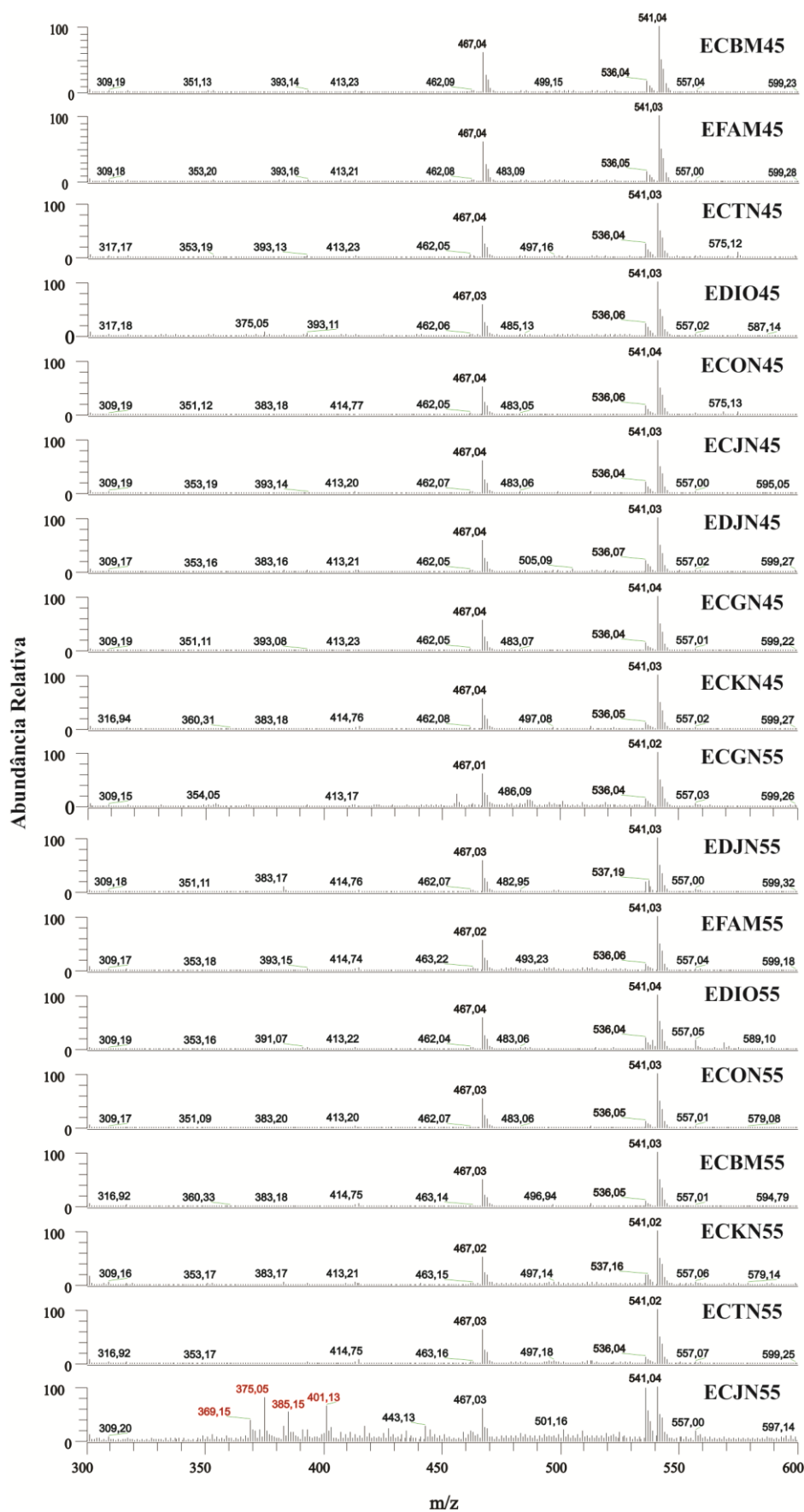


Figura 14: Espectros de massas dos extratos obtidos em AcOEt.

Nas análises de RMN de ^1H (Figuras 9 e 10) foram observados que apenas os extratos ECJN52 e ECJN55, apresentaram sinais mais intensos na região dos aromáticos, e pela análise de ISE-EM, além desses extratos, as amostras EFAM52 e ECON52, obtidas das cascas em éter, apresentaram íons m/z de possíveis lignoides ($[\text{M}-\text{H}]^+$ 353, 369, 375, 385 e 401) (MAGALHÃES *et al.*, 2006; SIQUEIRA *et al.*, 1995; ABBASI *et al.*, 2009; PERAZA-SÁNCHEZ *et al.*, 1992), como pode ser visto nas figuras 15, 16, 17, 18 e 19.

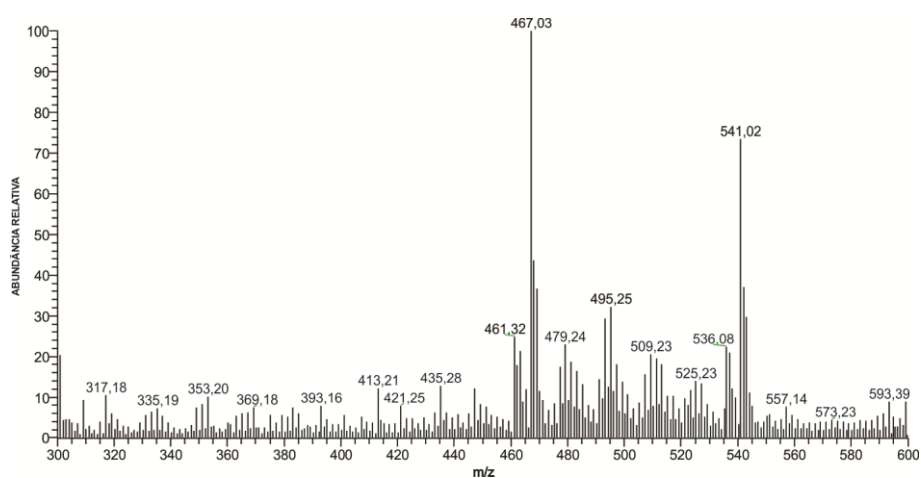


Figura 15: Espectro de massas do extrato EFAM52

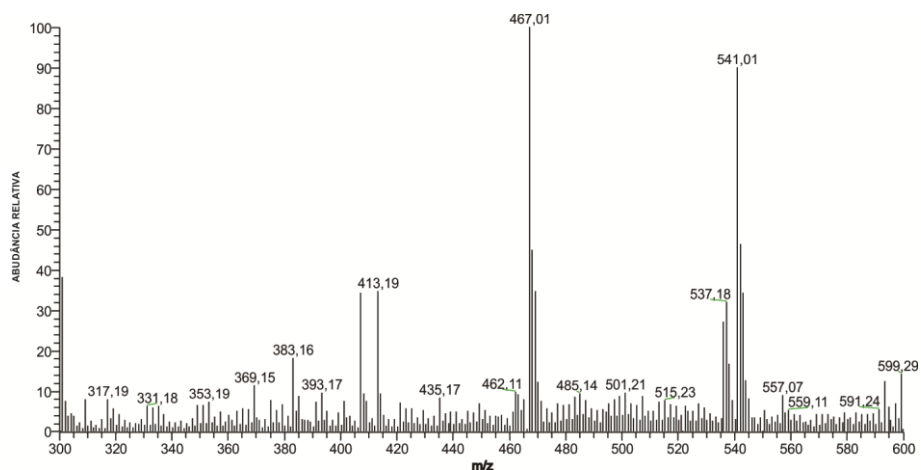


Figura 16: Espectro de massas do extrato ECON52

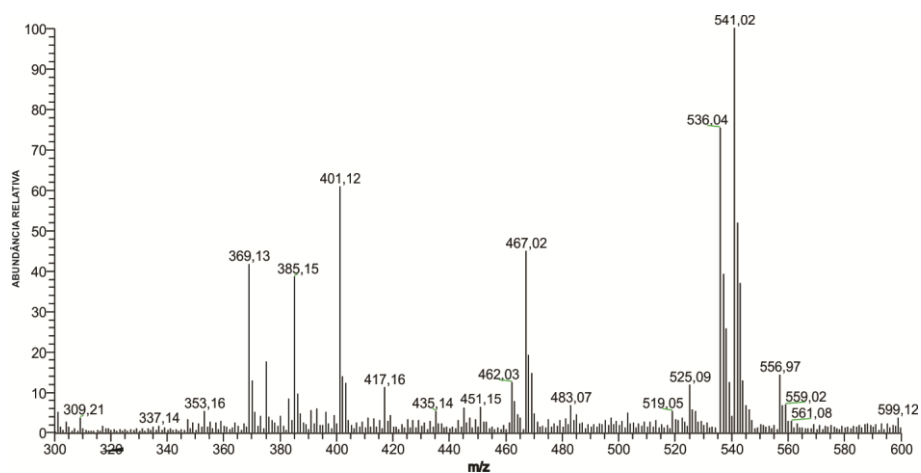


Figura 18: Espectro de massas do extrato ECJN52

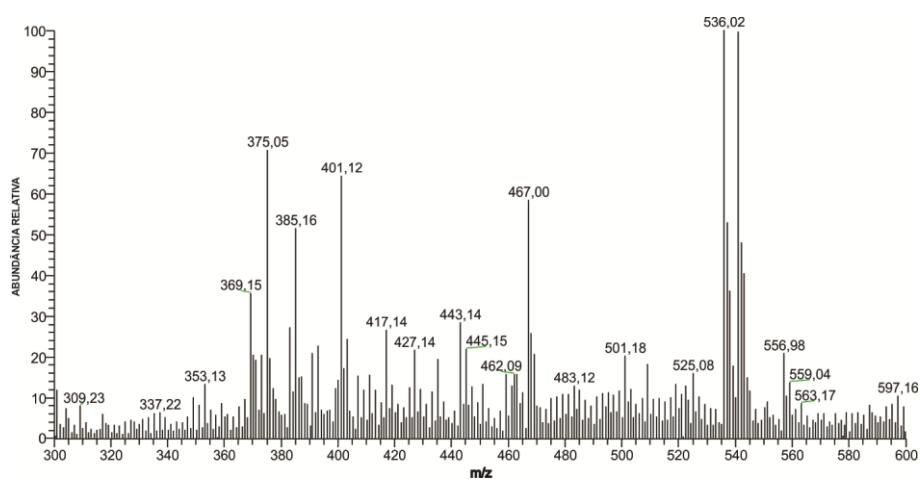


Figura 19: Espectro de massas do extrato ECJN55

Também foram feitos experimentos de ISE(+)-MS/MS dos possíveis íons dos lignóides. Os espectros das figuras 20, 21 e 22 mostram o perfil de fragmentação desses íons. As análises dos íons m/z $[M-H]^+$ 353 e 375 não apresentaram fragmentações, pois suas estruturas eram bastante estáveis.

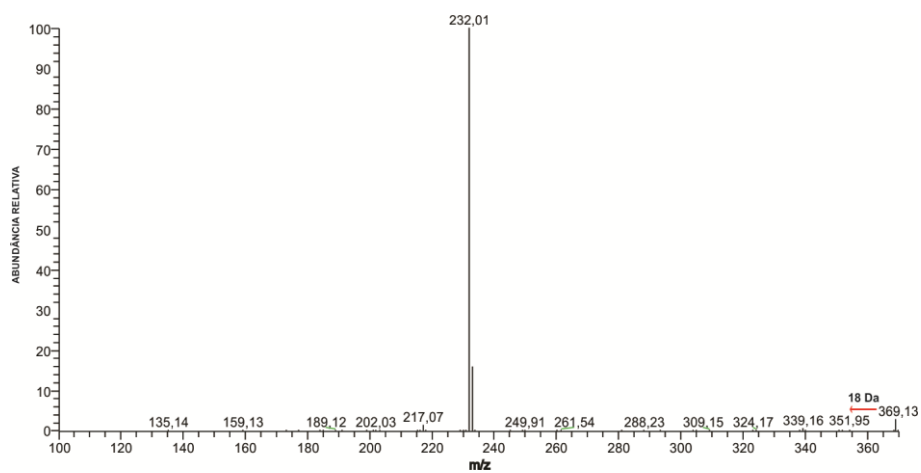


Figura 20: ESI(+)-MS/MS do íon de m/z 369

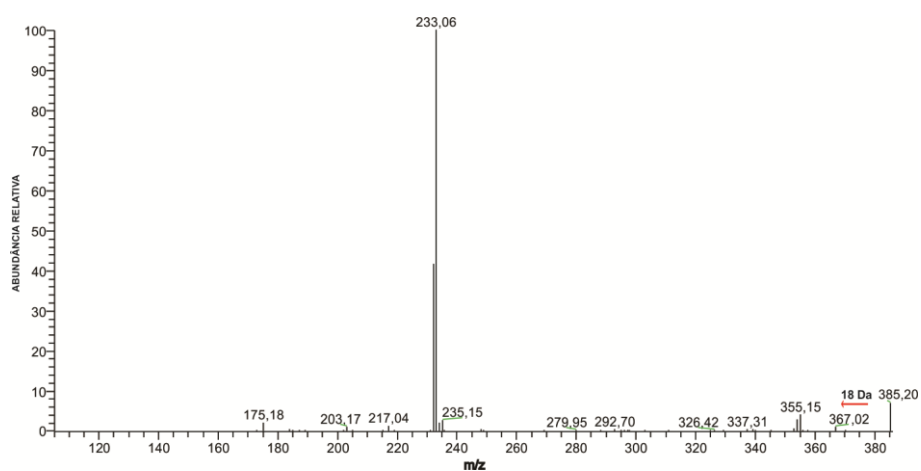


Figura 21: ESI(+)-MS/MS do íon de m/z 385

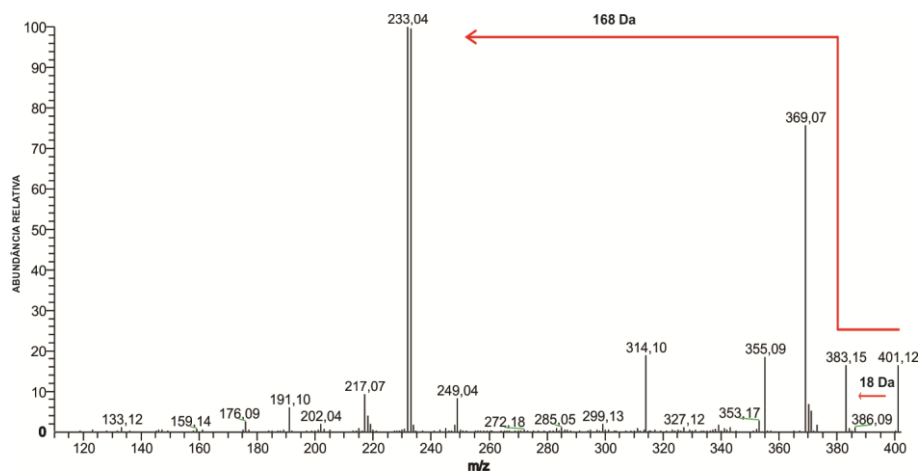


Figura 22: ESI(+)-MS/MS do íon de m/z 401

Não há relatos na literatura sobre fragmentações de lignanas e neolignanas com estes pesos moleculares utilizando a técnica de ISE-MS/MS. Mas Schimdt *et al.*, (2006) propuseram as fragmentações de duas classes de lignanas, das oito já descritas (UMEZAWA, 2003), a ariltertralina e a dibenzilbutirolactona.

Nas lignanas ariltetralinas, dois subgrupos podem ser distinguidos em relação à substituição no C-7. Os compostos hidroxilados nesta posição apresentam uma fragmentação mais complexa do que as lignanas sem o substituinte em C-7. Eles formam um fragmento característico $[A+H]^+$ (Figura 23), formado pela perda do substituinte oxigênio em C-7, junto com o anel lactônico, seguido por um rearranjo retro-Diels-Alder, produzindo o derivado antraceno estável. Outra forma de fragmentação em lignanas ariltetralinas, é a perda do substituinte fenil $[B+H]^+$ e subsequentemente a perda de CO_2 a partir do anel lactônico $[B-CO_2-H]^+$ (SCHIMDT *et al.*, 2006).

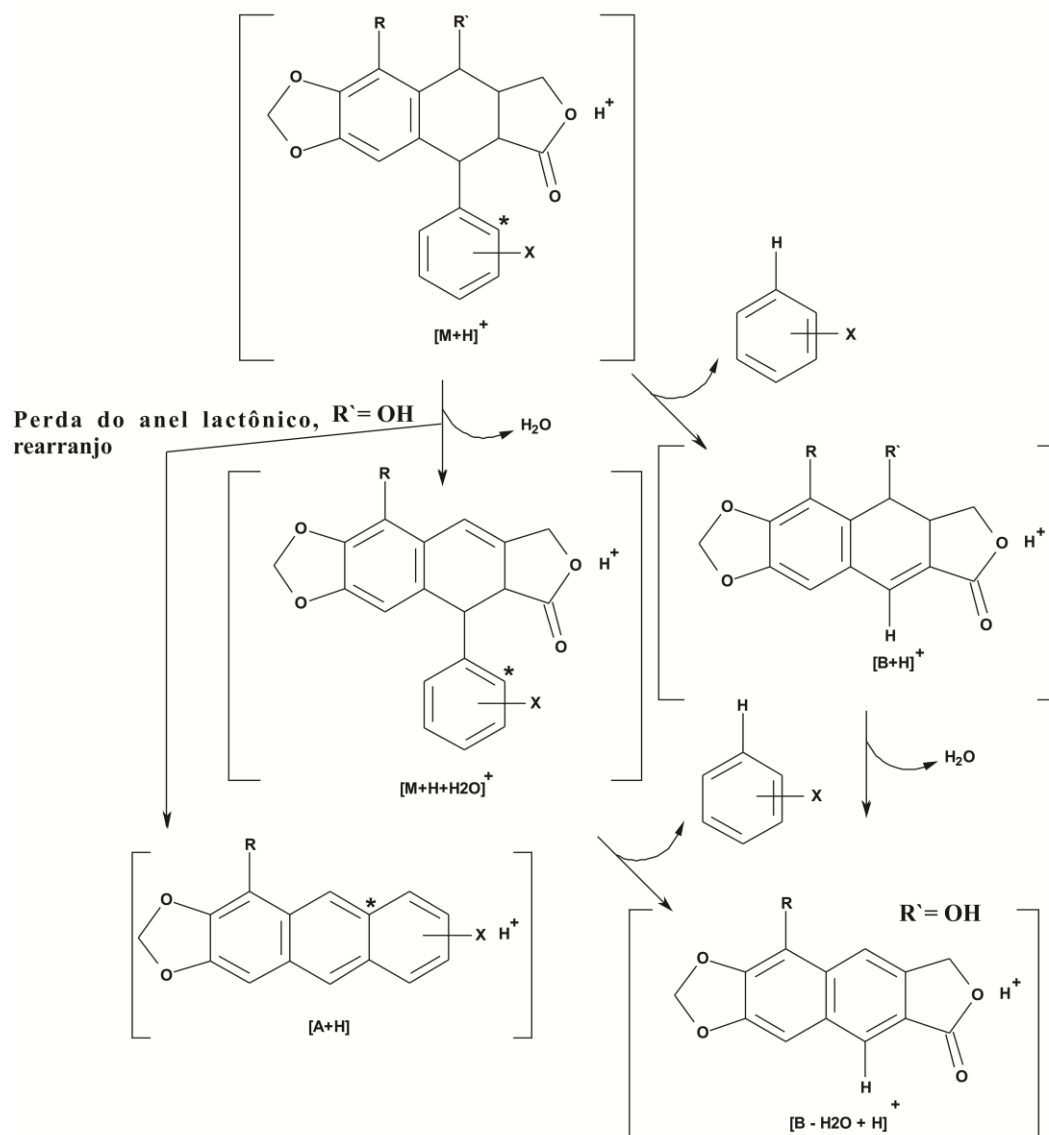


Figura 23: Fragmentação de lignanas ariltetralinas (SCHMIDT *et al.*, 2006).

Em relação às lignanas dibenzilbutirolactônicas, há a formação de dois fragmentos característicos $[A]^+$ e $[B]^+$ que fornecem informações que permitem distinguir esta classe com o isômero furofurano. Apresentando um fragmento com maior intensidade $[M+H-H_2O]^+$ do que $[M+H]^+$, como ilustrado na figura 24 (SCHIMDT *et al.*, 2006).

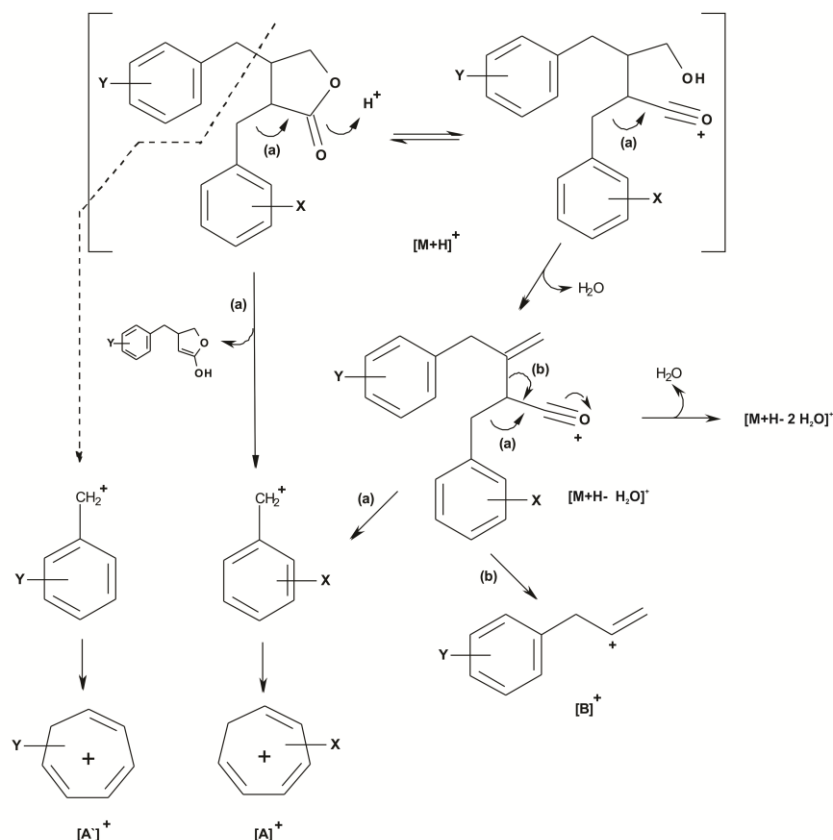


Figura 24: Fragmentação de lignanas dibenzilbutirolactonas (SCHMIDT *et al.*, 2006).

A partir das propostas de fragmentações das lignanas ariltetralinas e dibenzilbutirolactônicas (Figuras 23 e 24), e os resultados observados nas fragmentações dos espectros de massas referentes aos íons moleculares $[M+H]^+$ 369, 385 e 401, verifica-se que em todos espectros ocorre a perda de água $[H+H_2O]^+$, podendo observar a presença do grupo OH nas estruturas dos possíveis lignóides, como é mostrado nas fragmentações de Schmidt (2006).

Em Burseraceae, relata-se apenas o íon molecular de m/z $[M+H]^+$ 369 com o grupo OH em sua estrutura, podendo sugerir que seja a lignana oxo-*para*-benzolactona, da classe dibenzilbutirolactona. Esta lignana foi identificada a partir do extrato etéreo da madeira da espécie *P. tenuifolium* (SIQUEIRA *et al.*, 1995), e no presente trabalho, este íon foi detectado nos extratos EFAM52, ECON52 e em maior em maior intensidade no extrato ECJN52, também obtidos em éter etílico. Observa-se também, que no extrato

ECJN55, em AcOEt, há a presença do íon m/z $[M+H]^+$ 369, sugerindo uma grande concentração nas cascas desta espécie.

Também é possível observar que os espectros dos íons moleculares de m/z $[M+H]^+$ 369, 385 e 401 (Figuras 20, 21 e 22), apresentam fragmentações semelhantes, onde o pico base nos três espectros são os íons m/z 232 e 233.

No estudo de identificação de lignanas da classe dibenzilbutirolactonônicas por ISE-MS e ISE-MS/MS, Schimdt *et al.* (2008) observaram que a lignana ligna-7-eno-9,9'-lactona de m/z 399 $[M+H]^+$ apresentou espectro com pico base com íon m/z 231, e perda de 168 Da. sendo que esta perda é semelhante ao que é visto no espectro do íon m/z 401 $[M+H]^+$ (Figura 22).

Ao verificar que estes íons ($[M-H]^+$ 369, 385 e 401) apresentam o mesmo perfil de fragmentação e com perdas de H_2O , e na literatura estas fragmentações sugerem que estas possíveis lignanas pertençam à classe dibenzilbutirolactona, mas não correspondendo ao perfil de fragmentação desta classe observada na figura 24, sugere-se que estas lignanas apresentem isômeros. Assim como relatado por Schimdt *et al.* (2008), onde observaram que a lignana deoxipofilotoxina apresenta o mesmo pico base, assim como os isômeros *E*-anhydropodorhizol e *Z*-anhydropodorhizol, pertencentes a classe dibenzilbutirolactona, como pode ser observado na figura 25.

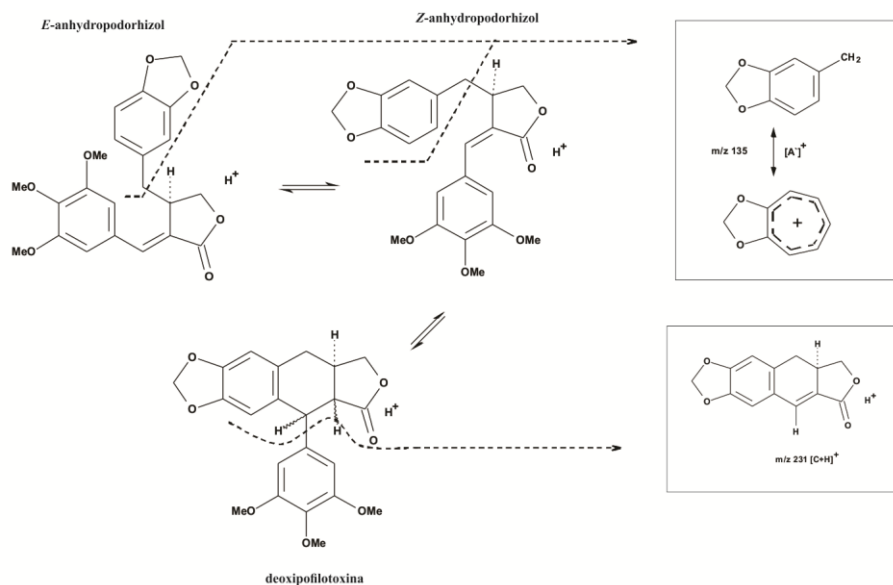


Figura 25: Fragmentação da lignana deoxipofiloxina (SCHMIDT *et al.*, 2008).

Apesar da rapidez e elevado número de amostras serem analisadas por MS-ISE, algumas limitações, como esta, são observadas por esta técnica. Pois os isômeros não podem ser diferenciados uma vez que apresentam a mesma fórmula molecular, conseqüentemente apresentam as mesmas massas e, portanto podem possuir o mesmo perfil de fragmentação (VILLAS-BOAS *et al.*, 2005).

Desta forma, estes resultados obtidos são de grande importância, pois, na família Burseraceae a classe dibenzilbutirolactona já foi comumente descrita nos gêneros: *Bursera*, *Crepidospermum* e *Protium*. Sendo que no gênero *Bursera* foram identificadas as lignanas (-)-*trans*-2-(3'',4'',5''-trimetoxibenzil)-3-(3',4'-metilenodioxibenzil)butirolactona e (-)-*trans*-2-(3'',4''-dimetoxibenzil)-3-(3',4'-metilenodioxibenzil)butirolactona, no gênero *Crepidospermum* a lignana *para*-benzolactona e no gênero *Protium* foi identificado a lignana oxo-*para*-benzolactona (MCDONIEL & COLE, 1972; LIMA *et al.*, 2001; SIQUEIRA *et al.*, 1995).

6.2.4. Perfil químico por CG-EM dos extratos em éter etílico das cascas e madeiras

A CG-EM é uma técnica hifenada que visa a obtenção de informações estruturais de metabólitos de interesse a partir de misturas, possibilitando o estudo de várias matrizes complexas, sem a necessidade do trabalho de isolamento que, muitas vezes, leva a compostos já conhecidos.

Poucos estudos foram realizados na família Burseraceae envolvendo esta técnica na avaliação do perfil químico de várias espécies. Dentre eles encontram-se o trabalho realizado por Silva (1995), verificando a variação química de dez óleorresinas de espécies de *Protium*, avaliando principalmente a presença de monoterpenos, sesquiterpenos e os triterpenos: α -amirina, β -amirina, β -amirona e friedelina. E o estudo realizado por Rüdiger & Veiga-Junior (2012), observando a quimiodiversidade dos triterpenos das classes ursano e oleanano nas óleorresinas de Burseraceae da Amazônia utilizando ferramentas estatísticas.

Observando a eficiência desta técnica e os resultados alcançados, no presente trabalho realizou-se o perfil cromatográfico dos extratos obtidos em éter etílico avaliando a presença de lignóides nas cascas e madeiras de nove diferentes espécies de Burseraceas da Amazônia.

As análises por CG-EM foram realizadas em busca de uma melhor sensibilidade e definição dos resultados, de forma que os compostos mais leves saíssem mais rapidamente, para que ocorresse uma maior área de percurso cromatográfico, onde fossem identificados os lignóides.

Os cromatogramas dos extratos analisados das madeiras e cascas apresentaram perfis cromatográficos semelhantes, sendo possível observar três diferentes regiões de classe de compostos (Figura 26).

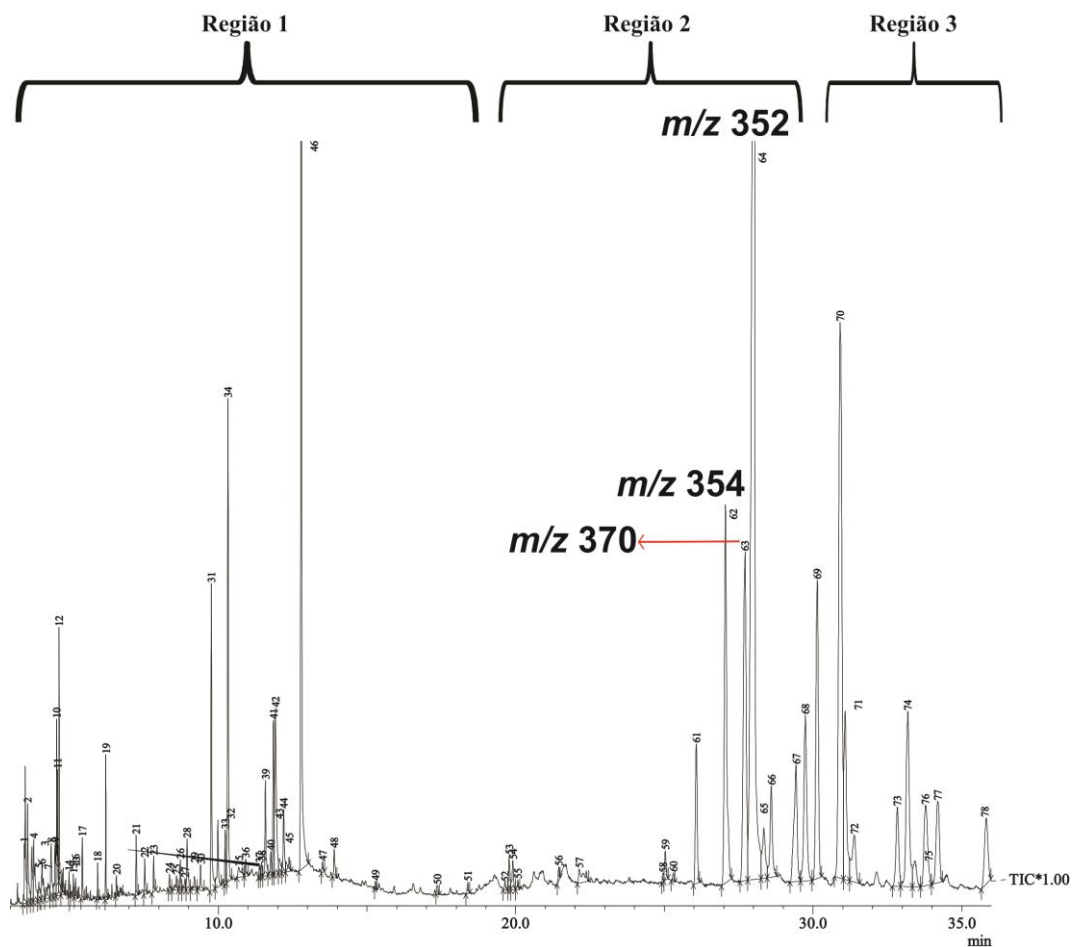


Figura 26: Cromatograma do extrato em éter de *Protium klugii*.

Primeira região: nos primeiros vinte minutos de corrida cromatográfica, foram detectadas substâncias com m/z que variam entre 136 e 340, que podem corresponder a ésteres formados no processo de extração, fenilpropanóides, cumarinas ou derivados do ácido elágico, substâncias já descritas na família Burseraceae (ZOGHBI *et al.*, 1981; ZOGHBI *et al.*, 1993; COSTA, 1996; SIANI, 1999).

Segunda região: a partir dos vinte até os trinta minutos, são observadas as m/z 352, 354, 370, 382 e 396 características de lignóides, e que já foram relatadas nas espécies de Burceraceae.

Terceira região: o restante do percurso, de trinta a trinta e cinco minutos, foram detectadas m/z típicas dos esteróis estigmasterol (m/z 412) e β -sitosterol (m/z 414), e os isômeros triterpênicos α - e β -amirina (m/z 426) e α - e β -amirona (m/z 424).

Os íons detectados na segunda região são observados em todos os extratos, mas em concentrações distintas. Além das m/z , verificou-se também as fragmentações desses íons moleculares, sendo possível observar fragmentos característicos de lignóides, pois diversos destes já possuem seus espectros de massas amplamente estudados (YAMAMOTO *et al.*, 2004), embora nem todos os mecanismos envolvidos nas reações de fragmentações sejam compreendidos.

Assim como foi visto nas análises realizadas por ISE-EM, os padrões de fragmentações observados por CG-EM, são característicos de lignanas pertencentes à classe dibenzilbutirolactona.

Yamamoto *et al.* (2010), analisando os extratos da resina de *Callitris preissii* por CG-EM, identificaram 34 lignanas, derivatizadas e não-derivatizadas, por interpretação de seus espectros de massas, dentre elas encontra-se a lignana matairesinol e seus derivados, pertencentes à classe dibenzilbutirolactona, que apresentaram vários padrões de fragmentações, como ilustrado na figura 27.

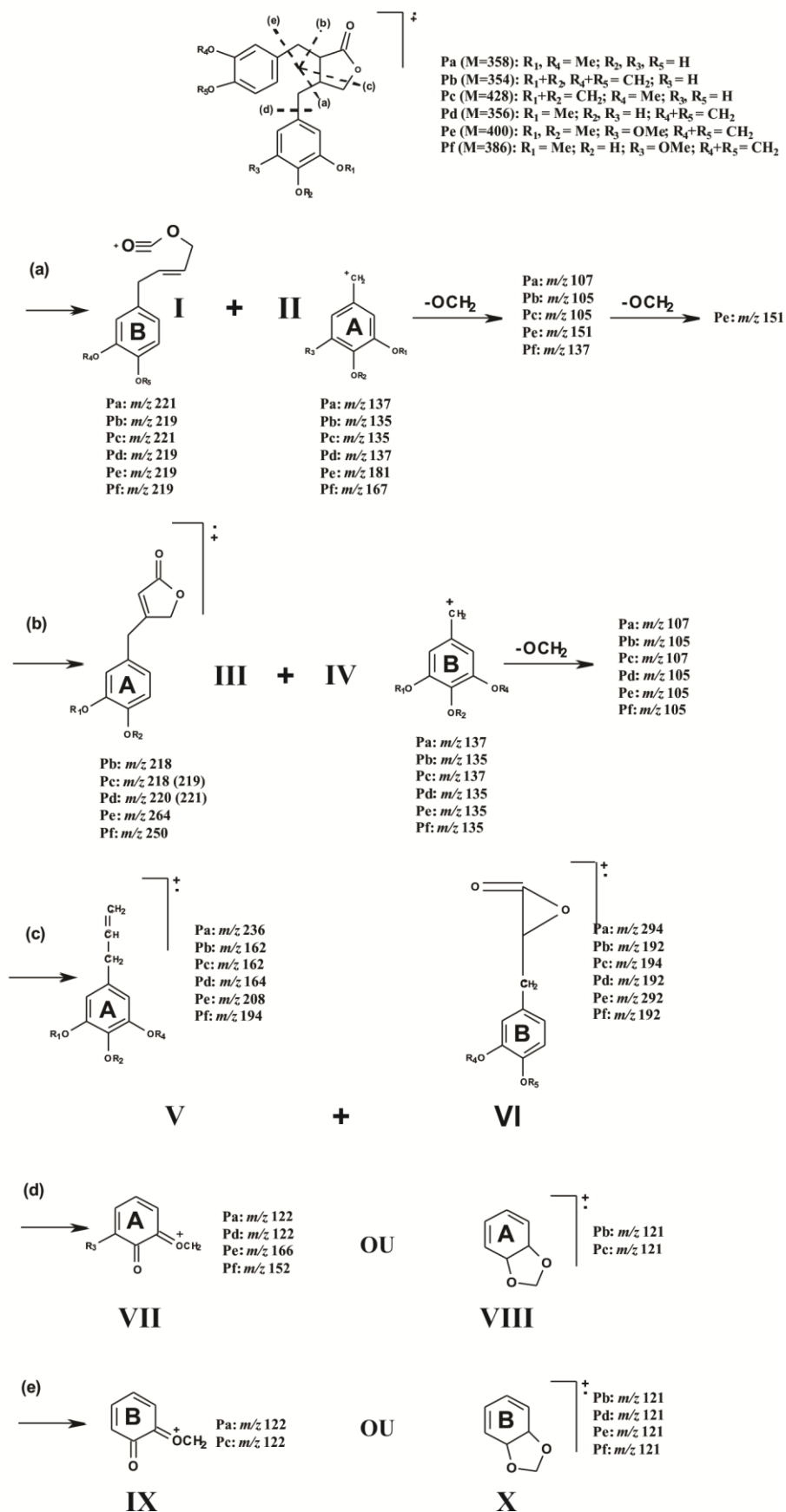


Figura 27: Padrão de fragmentação de lignanas da classe dibenzilbutirolactonas, por CG-EM (YAMAMOTO *et al.*, 2010)

Comparando essas fragmentações (Figura 27) com as observadas nos espectros de massas (Figuras 28, 29 e 40) dos picos correspondentes as m/z 352, 354 e 370 do cromatograma 26, verifica-se uma grande semelhança com a proposta de fragmentação B, figura 27, onde a clivagem do íon molecular ocorre na posição β do grupo fenil, produzindo os fragmentos III e IV.

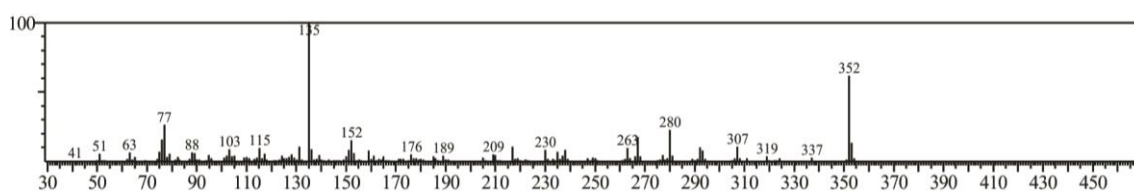


Figura 28: Espectro de massas do íon m/z 352.

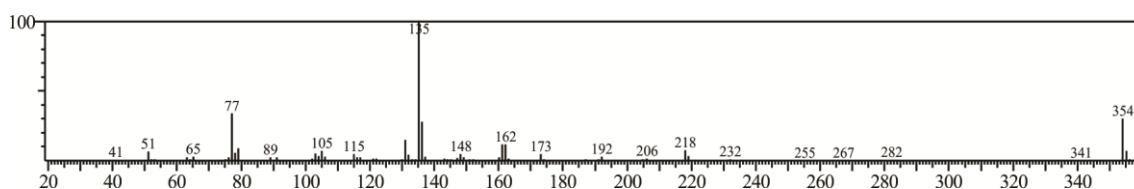


Figura 29: Espectro de massas do íon m/z 354.

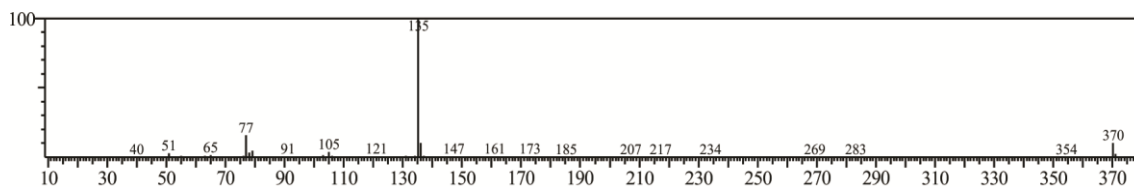


Figura 30: Espectro de massas do íon m/z 370.

O fragmento III, m/z 219 ou 218, aparece em menor intensidade, enquanto que o fragmento IV, m/z 135, é bem mais intenso e muitas vezes é o pico base, em seguida este fragmento produz vários íons, no caso em questão o de m/z 105, pela perda de OCH_2 (LOPES *et al.*, 1983; BANERJI *et al.*, 1984; YAMAMOTO *et al.*, 2010), assim como é observado nos espectro de massas dos íons m/z 352 e 354.

Anteriormente Banerji *et al.*, (1984), observaram fragmentos semelhantes aos descritos acima, com m/z 217, 189, 135 (pico base), 77 e 28. Os fragmentos 217 e 135 são resultados da clivagem do anel benzílico na posição 3,5.

Conhecendo estes padrões de fragmentação presentes nas lignanas e ao observarmos o espectro de massas obtido para os picos com m/z 354 e 352, pode-se sugerir que estes compostos se tratam das lignanas hinoquinina e gadaina, respectivamente.

A hinoquinina (Figura 31) é uma lignana pertencente à classe dibenzilbutirolactona, que já foi descrita na família Burseraceae, no gênero *Bursera* (MALDINI *et al.*, 2009), e sendo relatada pela primeira vez no gênero *Protium*. Estudos mostram que esta lignana apresenta efeitos antiespasmódicos (ZHANG *et al.*, 2008), genotóxicos e eficaz redução dos danos induzidos pelo cromossomo DXR (doxorubicina), fármaco utilizado na quimioterapia contra o câncer (MEDOLA *et al.*, 2007).

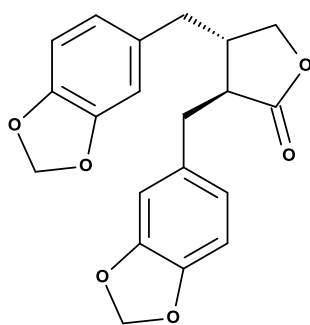


Figura 31: Lignana hinoquinina

A lignana gadaina (Figura 32) também é pertencente à classe dibenzilbutirolactona, mas ainda não foi descrita em nenhum gênero da família Burseraceae, sendo que esta classe já foi relatada nos gêneros *Bursera* (MALDINI *et*

al., 2009) *Crepidospermum*, *Tetragastris* (LIMA *et al.*, 2001) e principalmente nas espécies do gênero *Protium* (ZOGHBI *et al.*, 1981; SIQUEIRA *et al.*, 1995).

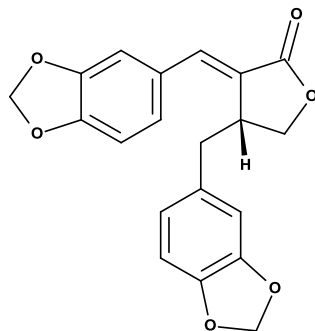


Figura 32: Lignana gadaina

Com estes resultados observa-se que em todas as espécies estudadas foram detectadas m/z e fragmentações características de lignóides. Mas apenas nos extratos ECJN42 e ECJN52, referentes à madeira e casca da espécie *Protium klugii*, foram observados concentrações mais elevadas destes constituintes.

Os resultados quantitativos do CG-DIC, as lignanas hinoquinina e gadaina apresentaram percentagens de 1,14 e 16,91% para o extrato ECJN42, e 4,45 e 26,71% para o extrato ECJN52, respectivamente. Observa-se que a cascas da espécie *P. klugii* (ECJN52) apresenta elevadas concentrações da lignana gadaina, dessa forma, esta espécie possui grande potencial em estudos futuros com objetivos de isolamento e testes biológicos.

6.3. Avaliação quimiométrica dos perfis químicos dos extratos das cascas e madeiras dos extratos em éter e acetato de etila por EM-ISE

Com base nas intensidades das m/z de cada constituinte presentes foram realizados análises de PCA e HCPC, visando detectar semelhanças e diferenças no

conjunto amostral. A avaliação dos dados multivariados de todos os extratos foi realizada correlacionando a matriz computada com as nove espécies para as 16 m/z principais detectadas nas análises por ISE-EM. No gráfico de PCA (Figura 42) foram avaliadas as dimensões 1 (Dim 1) e 2 (Dim 2), representado na forma de gráficos de mapa de fatores individuais e de mapa de variáveis (Figura 42 A e 42 B, respectivamente), isto é, os gráficos da distribuição das amostras em função da importância das variáveis, representando 81,68% das informações totais.

A variância mostrou que a Dim 1 representa 50,46% de toda a informação, sendo observado no mapa de fatores das variáveis (42 B) um “loaded” positivo para as variáveis de m/z $[H]^+$ 353, 369, 371, 375, 385, 401, 407, 413, 467, 469, 479, 493, 495, 537 e 543, e o “loaded” negativo para a m/z $[H]^+$ 541.

A Dim 2, tem representatividade de 30,82% das informações, com um “loaded” positivo para as m/z $[H]^+$ 353, 369, 371, 375, 385, 401, 407, 537, 541 e 543, e “loaded” negativo para os íons $[H]^+$ 413, 467, 469, 479, 493 e 495.

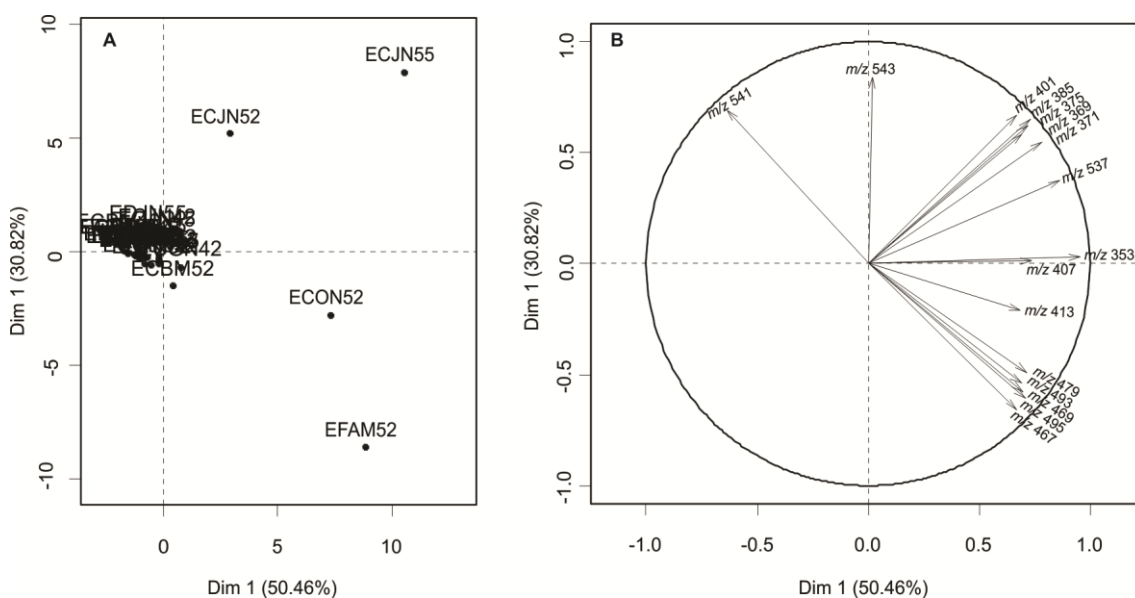


Figura 42: Distribuição das trinta e seis espécies por análise dos componentes principais utilizando como variáveis os íons de maior intensidade. (A) Mapa de Fatores Individuais. (B) Mapa de Variáveis.

Para determinação dos agrupamentos das amostras expostas na PCA, foi realizada a HCPC sobre o mapa de fatores, apresentada na figura 43.

A avaliação do HCPC sobre o mapa de fatores mostrou o posicionamento de cada cluster no PCA, apresentando a influência das m/z $[H]^+$ 541 e 543, na formação do primeiro agrupamento (A1), a influência da variação dos íons $[H]^+$ 407, 413, 467, 469, 479, 493 e 495 na formação do terceiro (A3). O segundo agrupamento (A2) foi definido pela alta intensidade das m/z $[H]^+$ 369, 371, 375, 385 e 401.

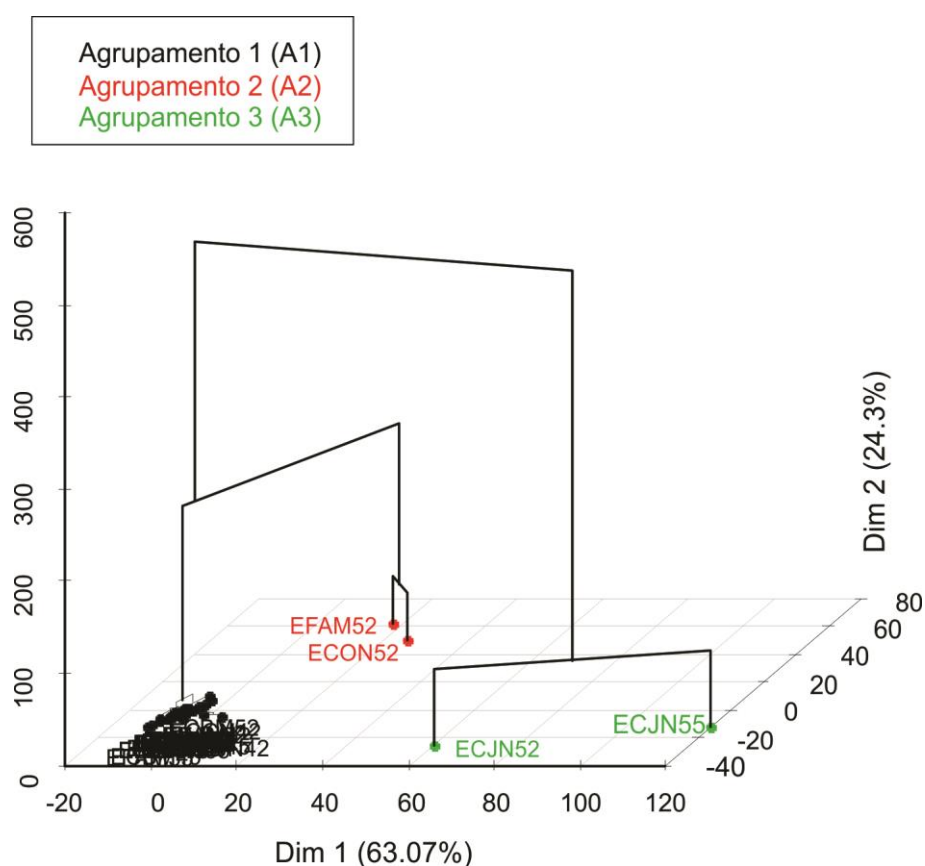


Figura 43: Dendrograma sobre o Mapa de Fatores representando a dissimilaridade entre as dezoito espécies.

Os íons $[H]^+$ 541 e 543, que formam o agrupamento A1, mas que também são detectadas nos outros agrupamentos, são íons moleculares que podem ser sugeridos como biflavonóides, pois no estudo realizado por Bahia *et al.*, (2005) isolaram e identificaram do extrato em clorofórmio, o biflavanóide denominado caesalflavona (Figura 44) que possui este mesmo peso molecular, em Burseraceae, outro biflavonoide foi identificado, neste caso, a podocarpusflavona A, isolada das folhas da espécie *Trattinnickia glaziovii* (SIANI *et al.*, 1995) que também é uma das espécies em estudo neste trabalho.

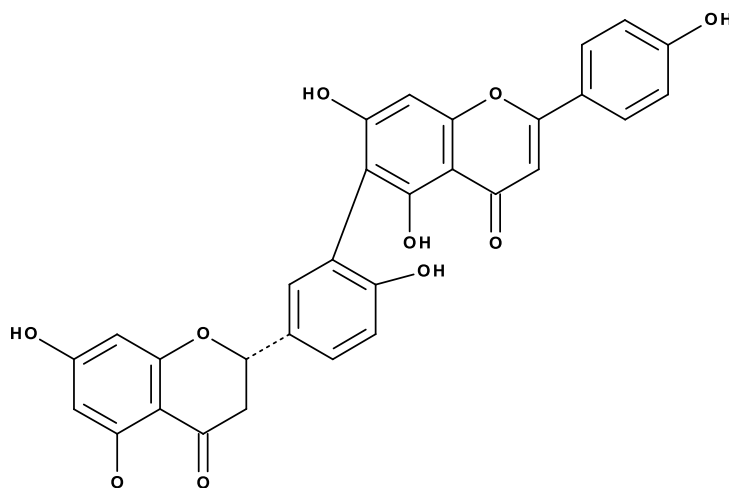


Figura 44: Possível biflavonóide caesalflavona de $m/z [H+H]^+$ 541.

Os agrupamentos A2 apresentaram íons que variam entre $[H]^+$ 407 e 495. Estes íons podem ser de lignóides, pois há relatos de lignanas em Burseraceae que apresentam m/z aproximadas (SIANI *et al.*, 1998; DEKEBO *et al.*, 2002; ABBASI *et al.*, 2005). E os íons que variam entre $[H]^+$ 479 e 495 podem ser de triterpenos, esteróis acetilados e glicosilados, substâncias com esqueletos já identificadas nos trabalhos de Guimarães & Siani (2007) e Lima *et al.*, (2001).

O agrupamento A3, caracterizado pelas altas intensidades das massas m/z $[H]^+$ 369, 371, 375, 385 e 401, compreendendo apenas a espécie *P. klugii*, obtidos dos extratos em éter e AcOEt das cascas, foi a que apresentou íons de possíveis lignóides já descritos na literatura.

Nesse caso, pode-se sugerir que o íon m/z $[H]^+$ 369 seja da lignana (-)-*para*-benzolactona ou do seu derivado oxidado *oxo-para*-benzolactona (Figuras 45 e 46), que foram isoladas e identificadas do extrato etéreo da madeira da espécie *P. tenuifolium* e coletada na região Amazônica, sendo um forte indicativo (SIQUEIRA *et al.*, 1995), ou ainda a lignana 5'-desmetoxideoxipodofilotoxina isolada por Jolad *et al.*, (1977), da espécie *Bursera morelensis*, mas sendo pouco provável, pelo fato de ter sido identificada do extrato etanólico e coletada no México.

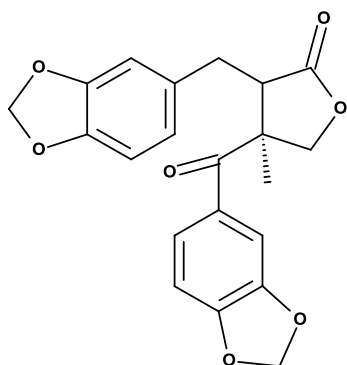


Figura 45: (-)-*para*-benzolactona

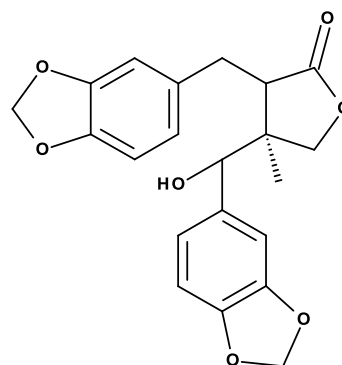


Figura 46: *oxo-para*-benzolactona

O íon $[H]^+$ 371, detectado no extrato em AcOEt, já foi descrito por McDoniel & Cole (1972), no estudo de isolamento e determinação estrutural de duas lignanas da espécie *Bursera schlechtendalii*, no qual o lignóide (-)-*trans*-2-(3'',4''-dimetoxibenzil)-3-(3',4'-metilenodioxibenzil)butirolactona (Figura 47) apresenta o mesmo peso molecular, e é pertencente à classe dibenzilbutirolactona, e esta classe é relatada nas

espécies de Burseraceae da região amazônica (SIQUEIRA *et al.*, 1995; LIMA *et al.*, 2001).

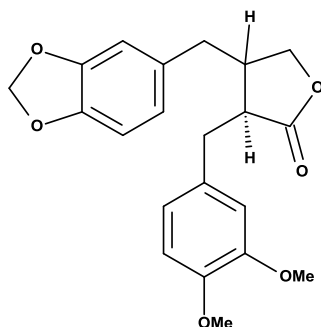


Figura 47: Lignana (-)-trans-2-(3'',4''-dimetoxibenzil)-3-(3',4'-metilendioxi-benzil)butirolactona isolada da espécie *Bursera shlechtendalii*

Outro íon molecular detectado e em alta intensidade no extrato ECJN55 é o de m/z 375, até o presente momento não há relatos na literatura de Burseraceae em relação à lignoides com este peso molecular, mas MacLean & Murakami (1966) estudando a espécie *Thuja plicata donn*, isolaram a lignana thujaplicatina (Figura 48), que é pertencente à classe dibenzilbutirolactona, como foi citado anteriormente, esta classe é descrita em Burseraceae da região amazônica.

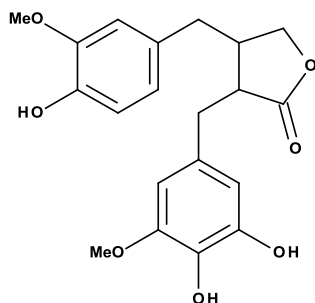


Figura 48: Lignana thujaplicatina isolada da espécie *Thuja plicata donn*

O íon m/z $[H]^+$ 385 também já foi relatado na família Burseraceae, podendo ser a lignana 5'-demetoxiepiexcelsina (Figura 49), isolada da espécie *Commiphora mukul* (ABBASI *et al.*, 2005), mas sendo pouco provável que seja o mesmo constituinte, pelo fato de que esta lignana ser pertencente à classe furofurano, e no gênero *Protium* não há relatos de lignanas pertencentes à esta classe.

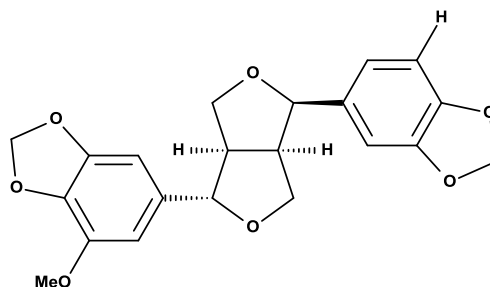


Figura 49: Liganana 5'-demetoxiepiexcelsina isolada da espécie *Commiphora mukul*

Em relação massa m/z $[H]^+$ 401, há um relato de uma neolignana coumarinolignóide 5-metoxipropacina (Figura 50), isolada do extrato etéreo da madeira da espécie *P. unifoliolatum*, que foi coletada na região Amazônica, assim como neste trabalho (MAGALHÃES *et al.*, 2006).

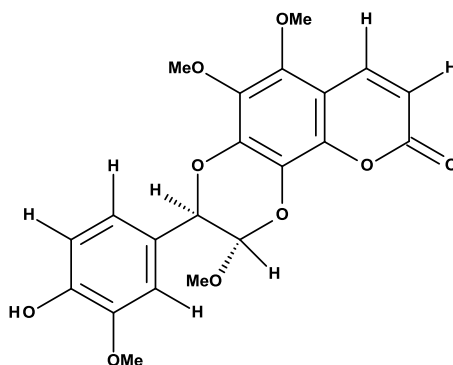


Figura 50: Neolignana 5-metóxiopropacina, isolada da espécie *P. unifoliolatum*.

Em *Bursera schlechtendalii*, foi descrita a lignana (-)-trans-2-(3'',4'',5''-trimetoxibenzil)-3-(3',4'-metilenodioxibenzil)butiralactona (Figura 51) pertencente à classe dibenzilbutirolactona, e massa m/z 400 (MCDONIEL *et al.*, 1972). É possível que estes dois lignóides possam ser o constituinte detectado no extrato em estudo, pois tanto a neolignana e esta classe de lignana são comumente relatadas no gênero *Protium*.

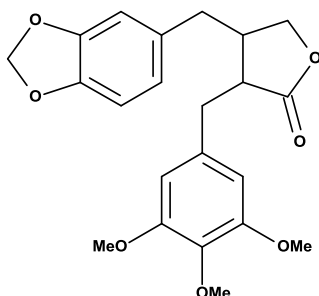


Figura 51: Lignana (-)-trans-2-(3'',4'',5''-trimetoxibenzil)-3-(3',4'-metilenodioxibenzil)butiralactona, isolada da espécie *Bursera schlechtendalii*

As análises de EM-ISE com o auxílio das técnicas multivariadas demonstraram ser bastante eficientes para caracterizar um conjunto de amostras complexas, porém sendo muito importante conhecer a natureza das amostras e de seus constituintes.

7. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos pela RMN de ^1H demonstraram que esta técnica é de grande importância para análise de extratos brutos, pois foi possível relacionar espécies através dos deslocamentos químicos (δ) de determinadas funções e grupos orgânicos, como aromáticos, dioxi-metilenos e metoxilas. Podendo sugerir estruturas de lignóides descritos na literatura.

Com as análises de CG-EM observa-se que em todas as espécies estudadas, foram detectados íons e fragmentos característicos de lignanas. Foram identificadas as lignanas hinoquinina e gadaina apenas no extrato da espécie *Protium klugii* em concentrações elevadas.

Através da utilização da EM-ISE por infusão direta, foi possível detectar, nos extratos brutos de diferentes polaridades, íons moleculares de lignóides já descritos na literatura de Burseraceae, de maneira rápida, sensível, com o mínimo de preparo de amostras e de consumo de solventes. E com o auxílio das técnicas multivariadas, foi possível caracterizar a espécie *Protium klugii* que apresenta as maiores intensidades de íons moleculares de lignóides descritos na literatura da família Burseraceae.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBASI, M. A.; AHMAD, V. U.; ZUBAIR, M.; KHAN, S. N.; LODHI, M. A.; CHOUDHARY, M. I. α -glucosidase and chymotrypsin inhibiting lignans from *commiphora mukul*. Proceedings of Pakistan Academy Sciences. vol. 42, pag. 23-26. 2005.

ABBASI, M. A.; LODHI, M. A.; CHOUDHARY, M. I. Kinetics studies on the lignan class of natural compounds that inhibits α -chymotrypsin. Journal of Asian Natural Products Research. Vol. 11, pag. 933–939, 2009.

AGRAWAL, P. K.; THAKUR, R. S. ¹³C NMR spectroscopy of lignan and neolignan derivatives. Magnetic Resonance in Chemistry, v. 23, p. 389-418, 1985.

ALMEIDA, E. X.; CONSERVA L. M.; LEMOS R. P. L. Coumarins, coumarinolignoids and terpenes from *Protium heptaphyllum*. Biochemical Systematics and Ecology. vol. 30, pag. 685–687, 2002.

AYRES, D. C., AND LOIKE, J. D. Lignans: Chemical, Biological and Clinical Properties. Cambridge University Press, 1990, Cambridge.

BAHIA, M. V.; SANTOS, J. B.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M. Biflavonoids and other phenolics from *Caesalpinia pyramidalis* (Fabaceae). Journal Brazilian Chemistry Society, vol. 15, pag. 1402-1405, 2005.

BANERJI, J.; DAS, B.; CHATTERJEE, A.; SHOOLER, J. N. Gadain, a lignin from *Jatropha gossypifolia*. Phytochemistry, vol. 23, pag. 2323-2327, 1984.

BARBOSA, P. C. S. Padronização de óleos de *Copaifera multijuga* Hayne por meio de técnicas cromatográficas. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Amazonas - UFAM, 2012.

BIANCHI, E; CALDWELL, M E; COLE, J R. Antitumor agents from *Bursera microphylla* (Burseraceae) I. Isolation and characterization of deoxypodophyllotoxin. Journal of Pharmaceutical Sciences, vol. 57, pag. 696-697, 1968.

CABRAL, ELAINE CRISTINA. Utilização da técnica de *fingerprinting* por espectrometria de massas para análise de extratos de produtos naturais. Tese (doutorado) – Instituto de Química da Universidade de São Paulo – USP, 2010.

CANEL, C.; MORAES, R. M.; DAYAN, F. E., FERREIRA, D. Podophyllotoxin. Phytochemistry, vol. 54, pag. 115—120, 2000.

COLE, J R.; BIANCHI, E.; TRUMBULL, E R. Antitumor agents from *Bursera microphylla* (Burseraceae). II. Isolation of a new lignan-burseran. Journal of Pharmaceutical Sciences; vol. 58, pag. 175-176, 1969.

CORDELL, G. A.; SHIN, Y. G. Finding the needle in the haystack. The dereplication of natural product extracts. Pure Appl. Chem., vol. 71, pag. 1089-1094, 1999.

CORREIA, M. P. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional (eds.), v. 1, 3 e 5, 1926.

COSTA, A. F. Farmacognosia, V. 1. Lisboa: Fundação Calouste Gulbeukian, 1975.

COSTA, M. C.; TAKAHATA Y. Conformational analysis of synthetic neolignans active against leishmaniasis, Using the Molecular Mechanics Method (MM2). Journal of computational chemistry. Vol. 18, no. 5, 1997.

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 Amazônica, vol. 42, pag. 557-560, 2012.

CORREIA, P.R.M.; FERREIRA, M.M.C. Reconhecimento de padrões por métodos não supervisionados: explorando procedimentos quimiométricos para tratamento de dados analíticos. *Química Nova*, v.30, n.2, p.481-487, 2007.

DEKEBO, A.; LANG, M. POLBORN, K.; DAGNE, E.; STEGLICH. Four lignans *Commiphora erlangeriana*. *Journal Natural Products*. Vol. 1252-1257, 2002.

DUKE, J. A.; VASQUEZ, R. *Amazonian Ethnobotanical Dictionary*. Florida, United States: CRC Press, pag. 215. 1994.

GOTTLIEB, O. R.; YOSHIDA, M.; Com atenção especial à química das neolignanas. *Química Nova*, vol.7, pag. 250-273, 1984.

GOTTLIEB, O. R.; Lignoides de plantas amazônicas: investigações biológicas e químicas. *Acta Amazônica*, vol. 18, pag. 333-344, 1988.

GUIMARÃES, A.C.; SIANI, A.C. Triterpenos das folhas de *Protium strumosum*. *Revista Fitos*, vol.3, n.1, pag.67-76, 2007.

HABTEMARIAM S. Cytotoxic and cytostatic activity of erlangerins from *Commiphora erlangeriana*. *Toxicon*, vol. 41, pag. 723-727, 2003.

HERNÁNDEZ, J. D.; ROMÁN, L. U.; ESPÍÑEIRA, J.; JOSEPH-NATHAN, P. Ariensin, a New Lignan from *Bursera ariensis*, *Planta Medica*, vol. 47, pag. 215-217, 1983.

HOSTETTMANN, K.; WOLFENDER, J-L.; TERREAUX, C. Modern screening techniques for plant extracts. *Pharmaceutical Biology*, vol. 39, pag. 18-32, 2001.

JOLAD, S.D.; WIEDHOPF, R.M.; AND COLE, J.R. Cytotoxic agents from *Bursera morelensis* (Burseraceae), Deoxypodophyllotoxin and a new lignin, 5`-

desmethoxydeoxypodophyllotoxin. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 66, pag. 889-890, 1977.

JUTIVIBOONSUK A.; ZHANG H.; TAN G. T.; CUIYING MA, HUNG N. V.; CUONG N. M., BUNYAPRAPHATSARA N.; D. SOEJARTO D.; FONG H. H.S.; Bioactive constituents from roots of *Bursera tonkinensis*; *Phytochemistry*. Vol. 66 pag. 2745–2751, 2005.

KAPLAN, I.W. *New Orleans Med. Surg. J.* 1942, 94, 388.

KATJA DETTMER, K.; ARONOV, P. A.; HAMMOCK, B. D. Mass spectrometry-base metabolomics. *Mass Spectrometry Reviews*, vol. 26, pag. 51-78, 2007.

LIMA, M.P.; CASTRO, F. B. G.; SILVA, M. F. G. F.; FERREIRA, A. G.; FO, E. R.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C. Phytochemistry of *Crepidospermum rhoifolium*, *Tetragastris altissima*, *Protium icicariba* and *P. apiculatum*: Chemosystematic implications. *Revista Latino Americana de Química*. Vol. 29, pag. 135-144, 2001.

LIMA, M.P.; BRAGA, P A. C; Macedo, M. L.; SILVA, M. F. G. F.; Ferreira, A. G.; Fernandes, J. B.; Vieira, Paulo C. Phytochemistry of *Trattinnickia burserifolia*, *T. rhoifolia*, and *Dacryodes hopkinsii*: Chemosystematic Implications. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, vol. 15, pag. 385-394, 2004.

LOPES DA SILVA, THALIA SAMPAIO, GESTINARI, LÍSIA MÔNICA, SOARES, ANGÉLICA RIBEIRO. Determinação do perfil químico dos produtos naturais de macroalgas marinhas da família Udoteaceae (Chlorophyta) por RMN. 34^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2011.

LOPES, L. M. X.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. R. Dibenzylbutyrolactone lignans from *Virola sebifera*. *Phytochemistry*, vol. 22, pag. 1516-1518, 1983.

KHALID, S. A. Chemistry of the Burseraceae. *In*: WATERMAN, P. G.; GRUNDON, M. F. (eds). Chemistry and chemical taxonomy of the Rutales. London, Academic Press. Pag. 281-297, 1983.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JR, V. F.; GRYNBERG N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova*, vol. 25, pag. 429-438, 2002.

MAGALHÃES, A.; ZOGHBI, M. G. B; SIANI, A. C. 5-Methoxypropacin, a novel coumarinolignoid from *Protium unifoliolatum*; *Natural Product Research*; vol. 20, pag: 43-46, 2006.

MAIA, R.M.; BARBOSA, P.R.; CRUZ, F.G.; ROQUE, N.F.; FASCIO, M. Triterpenos da resina de *Protium heptaphyllum March* (BURSERACEAE): caracterização em misturas binárias. *Química Nova*, vol .23, pag. 623-626, 2000.

MALDINI, M.; MONTORO, P.; PIACENTE, S.; PIZZA, C. Phenolic compounds from *Bursera simaruba* Sarg. bark: Phytochemical investigation and quantitative analysis by tandem mass spectrometry. *Phytochemistry*. Vol. 70, pag. 641-649, 2009.

MARQUES, M.F.S.; RIBEIRO M.S. Estudo dos constituintes químico das cascas da madeira de *Trattinnickia peruviana*, *Acta Amazônica*, vol. 24, pag. 49-52, 1994.

MARQUES, O. M.; YOSHIDA. Estrutura de propacina. *Química Nova*. Vol. 13, 1990.

McDONIEL, P.B.; COLE, J.R. Antitumor activity of *Bursera schlechtendalii* (Burseraceae): isolation and structures determination of two new lignans. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 61, pag. 1992-1994, 1972.

MacLEAN, H.; MURAKAMI, K. Lignans of western red cedar (THUJA PLICATA DONN). *Canadian Journal of Chemistry*, vol. 44, 1966.

MEDOLA, J. F.; CINTRA, V. P.; SILVA, E. P. P.; ROYO, V. A. R.; DA SILVA, R.; SARAIVA, J.; ALBUQUERQUE, S.; BASTOS, J. K.; SILVA, M. L. A.; TAVARES, D. C. (-)Hinokinin causes antigenotoxicity but not genotoxicity in peripheral blood of Wistar rats. *Food and chemical toxicology*, vol. 45, pag. 638-642, 2007.

MOSS, G. P. Nomenclature of lignans and neolignans. *Pure and Applied Chemistry*, Vol. 72, pp. 1493–1523, 2000.

NAKANISHI, T.; INATOMI, Y.; MURATA, H.; SHIGETA, K.; IIDA, NAOKI A.; INADA, JIN MURATA; FARRERA, M.L A.L P.; IINUMA, M.; TANAKA, T.; TAJIMA, S. AND OKU N.; A New and Known Cytotoxic Aryltetralin-Type Lignans from Stems of *Bursera graveolens*. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*. Vol. 53, pag. 229—231, 2005.

NIELSEN, K. F.; SMEDSGAARD, J. Fungal metabolite screening: database of 474 mycotoxins and fungal metabolites for dereplication by standardized liquid chromatography-UV-mass spectrometry methodology. *Journal Chromatography A*, vol. 1002, pag. 111-136, 2003.

NOGUERA, B.; DÍAZ, E.; GARCÍA, M.V.; FELICIANO, A. S.; LÓPEZ-PEREZ, J.L.; ISRAEL, A.; Anti-inflammatory activity of leaf extract and fractions of *Bursera simaruba* (L.) Sarg (Burseraceae). *Journal of Ethnopharmacology*. vol. 92, pag. 129–133, 2004.

O'SULLIVAN, J. In *Chemistry and Chemical Taxonomy of the Rutales*; Waterman, P. G., Grundon, M. F., Eds.; Academic Press: New York. Chapter 9, pag 267-280, 1983.

PERAZA-SÁNCHEZ, S. R.; PEÑA-RODRÍGUEZ L. M.; Isolation of picropolygamain from the resin of *Bursera simaruba*; *journal of natural products*; vol. 55, pag. 1768-1771, 1992.

PERNET, R. Phytochimie des Burseraceae. *Journal of Natural Products*, v.35, p.280-287, 1972.

PIO CORREA, M. Dicionários de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas, vol. 1. Brasília: Ministério da Agricultura, 1984.

QUIGNARD, E.L.J.; NUNOMURA, S.M.; POHLIT, A.M.; ALECRIM, A.M.; PINTO, A.C.S.; PORTELA, C.N.; OLIVEIRA, L.C.P.; DON, L.C.; SILVA, L.F.R.; HENRIQUE, M.C.; SANTOS, M.; PINTO, P.S.; SILVA, S.G. Median lethal concentrations of amazonian plant extracts in the brime shrimp assay. *Pharmaceutical Biology*, vol. 42, pag. 253-257, 2004.

RODRIGUES, M. V. N.; REHDER, V. L. G.; SARTORATTO, A.; JÚNIOR, S. B.; SANTOS, A. S. O emprego de técnicas hifenadas no estudo de plantas medicinais. *Multiciência*. vol. 7, 2006.

ROJAS-SEPULVEDA, A.; ANTÚNEZ, M.; PÉREZ, A. M. P.; MARQUINA, S.; ALVAREZ, L. Aryltetralin lignans from the stem bark of *Bursera fagaroides* var *fagaroides* (Burseraceae). *Resumo Southeastern Regional Meeting of the American Chemical Society*, 104-A, 2009.

RÜDIGER, A. L.; SIANI, A. C.; VEIGA JUNIOR, V. F.; The Chemistry and Pharmacology of the South America genus *Protium* *Burm. f.* (Burseraceae); *Pharmacognosy Reviews*. vol. 1, 2007;

RÜDIGER, A. L. Estudo fitoquímico e citotóxico de oleorresinas de Burseraceae. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Amazonas - UFAM, 2012.

RÜDIGER, A. L.; VEIGA JUNIOR, V. F. Chemodiversity of Ursane- and Oleanane-Type Triterpenes in Amazonian Burseraceae Oleoresins. vol. 10, Issue 6 Pag: 1142-1153, 2012.

SIANI A. C.; ZOGHBI M. G. B.; WOLTER E. L. A.; VENCATO I.; 5-Methoxyjusticidin A, a New Arylnaphthalene Lignan from *Protium unifoliolatum*; Journal of Natural Products, vol. 61, pag. 796-797, 1998.

SCHMIDT, T. J.; HEMMATI, S.; FUSS, E.; ALFERMANN, A. W. A Combined HPLC-UV and HPLC-MS Method for the Identification of Lignans and its Application to the Lignans of *Linum usitatissimum* L. and *L. bienne* Mill. Phytochemical Analysis, v. 17, pag. 299-311, 2006.

SCHMIDT, T. J.; ALFERMANN, A. W.; FUSS, E. High-performance liquid chromatography/mass spectrometric identification of dibenzylbutyrolactone-type lignans: insights into electrospray ionization tandem mass spectrometric fragmentation of lign-7-eno-9,9'-lactones and application to the lignans of *Linum usitatissimum* L. (Common Flax). Rapid communications in mass spectrometry, v. 22, pag. 3642-3650, 2008.

SIANI, A.C., RAMOS, M.F.S.; LIMA JR, O.M.; SANTOS, R.R.; FERREIRA, E.F.; SOARES, R.O.A.; ROSAS, E.C.; SUSUNAGA, G.S.; GUIMARÃES, G.S.; ZOGHBI, M.G.B.; HENRIQUES, M.G.M.O. Evaluation of anti-inflammatory-related of essential oil from the leaves and resin of species of *Protium*. Journal of Ethnopharmacology, v.66, n.1, p.57-69, 1999.

SIANI A. C.; RIBEIRO, M. N. S. Podocarpusflavone A from the Leaves of *Trattinnickia glaziovii*. Biochemical Systematics and Ecology, vol. 23, pag. 879, 1995.

SILVA, J.R.A. Óleo-resinas de dez espécies de *Protium*. Manaus, 131p. Dissertação (Mestrado) – Química de Produtos Naturais, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Universidade Federal da Amazônia, 1995.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ,

L.A.; PETROVICK, P.R., Farmacognosia da Planta ao Medicamento, 5ª ed., Editora da UFRGS/UFSC, 2004.

SIQUEIRA, J. B. G.; ZOGHBI, M. G. B.; CABRAL, J. A.; WOLTER, F. W.J.; Lignans from *Protium tenuifolium*. Journal of Natural Products, vol: 58, pag: 730-732, 1995.

SHIOJIMA, K.; ARAI, Y.; MATSUDA, K.; TAKASE, Y.; AGETA, T.; AGETA, H. Mass spectra of pentacyclic triterpenoids. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, v.40, n.7, p.1683-1690, 1992.

SOUZA FILHO A. P. S.; VASCONCELOS M. A. M.; ZOGHBI M. G. B.; CUNHA R. L.; Efeitos potencialmente alelopáticos dos óleos essenciais de *Piper hispidinervium* C. DC. e *Pogostemon heyneanus* Benth sobre plantas daninhas; Acta Amazônica vol. 39, pag. 389- 396, 2009;

SOUZA, M.P., MACHADIO, M.I.L. AND BRAZ-FILHO. 6 Flavonoids from *Bursera leptophloeos*. Phytochemistry, vol. 28, pag. 2467-2470, 1989.

TESSIER, A. M.; DELAVEAU, P.; PIFFAUT, N. Oleiresin of *Aucoumea klaineana*. I. Neutral and acidic triterpenes. Planta Medica, vol. 44, pag. 215-217, 1982.

Song Y.; Deng, Y.; Huang, D.; Wen, J.; Liu Z.; Li, F. LC–MS/MS determination and pharmacokinetic study of four lignan components in rat plasma after oral

administration of *Acanthopanax sessiliflorus* extract. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 141, pag. 957– 963, 2012.

THULIN, M., BEIER, BJÖRN-AXEL, SYLVAIN G. RAZAFIMANDIMBISON, HANNAH I. BANKS; *Ambilobea*, a new genus from Madagascar, the position of *Aucoumea*, and comments on the tribal classification of the frankincense and myrrh family (Burseraceae); *Nordic Journal of Botany* vol. 26, pag. 218-229, 2008.

UMEZAWA T.; Diversity in lignan biosynthesis. *Phytochemistry Reviews* 2: 371–390, 2003.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas Mediciniais: Cura Segura? *Quimica Nova*, vol. 28, pag. 519-528, 2005;

VELÁZQUEZ-JIMÉNEZ, R.; TORRES-VALENCIA, J. M.; CERDA-GARCÍA-ROJAS, C. M.; HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, J. D.; ROMÁN-MARTÍN, L. U.; MANRÍQUEZ-TORRES, J. J.; GÓMEZ-HURTADO, M. A.; VALDEZ-CALDERÓN, A.; MOTILVA, V.; GARCÍA-MAUTIÑO, S.; TALERO, E.; ÁVILA, J.; JOSEPH-NATHAN. P. Absolute configuration of podophyllotoxin related lignans from *Bursera fagaroides* using vibrational circular dichroism. *Phytochemistry*. Vol. 72, pag. 2237-2243, 2011.

VIDAL, A. M. T.; DELAVEAU, P. Oleoresin of *Canarium schweinfurthii* Ehgl. *Annales Pharmaceutiques*, vol. 43, pag. 89-96, 1985.

VIEIRA JUNIOR, G.M.; SOUZA, C.M.L.; CHAVES, M.H. Resina de *Protium heptaphyllum*: isolamento, caracterização e avaliação das propriedades térmicas. *Química Nova*, vol. 28, pag. 183-187, 2005.

VILLAS-BÔAS, S. G.; MAS, S.; AKESSON, M.; NIELSEN, J. Mass spectrometry in metabolome analysis. *Mass Spectrom*, vol. 24, pag. 613-646, 2005.

VON KROGH, G. *Acta Derm. Venereol. (Stockh.) Suppl.* 1981, 98, 1.

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

WICKRAMARATNE, D.B.M., MAR, W., CHAI, H., CASTILLO, J.J., FARNSWORTH, N.R., SOEJARTO, D.D., CORDELL, G.A., PEZZUTO, J.M., KINGHORN, A.D. Cytotoxic constituents of *Bursera permollis*. *Planta Medica* vol. 61, pag. 80–81,1995.

XAASAN, C. F.; MINALE, L.; BASHIR, M.; HUSSEIN, M.; FINAMORE, E. Terpenoids os *Bosqellia carterii*. *Rendiconto Accademia Scienze Fisiche e Matematiche*, vol. 51, pag. 1-5, 1984.

YAMAMOTO, S.; OTTO, A.; SIMONEIT, B. R. Lignans in resin of *Auracaria angustifolia* by gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, vol. 39, pag. 1337-1347, 2004.

ZHANG, G.; SHIMOKAWA, S.; MOCHIZUKI, M.; KUMAMOTO, T.; NAKANISHI, W.; WATANABE, T.; ISHIKAWA, T.; MATSUMOTO.; TASHIMA, K.; HORIE, S.; DOMINGUEZ, O. P. Chemical Constituents of *Aristolochia constricta*: Antispasmodic Effects of Its Constituents inGuinea-Pig Ileum and Isolation of a Diterpeno Lignan Hybrid. *Journal Natural Products*, vol. 71, pag. 1167-1172, 2008.

ZOGHBI, M. G. B.; ROQUE, N. F.; GOTTLIEB, O. R.; Propacin, A coumarinolignoid from *Protium opacum*; *Phytochemistry*, vol. 20, pag. 180, 1981.

ZOGHBI, M. G.; SIQUEIRA, J. B. G.; WOLTER, E. L. A; JÚNIOR, O. L. P. Constituintes químicos de *Protium paniculatum* (Burseraceae); *Acta Amazônica*, vol, 23, pag. 187-189, 1993.