

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

INVESTIGAÇÃO QUÍMICA E BUSCA DE ATIVIDADE
ANTIFÚNGICA EM RESÍDUOS MADEIREIROS DE *Protium*
puncticulatum Macbr.

HENRIQUE CATIVO DOS SANTOS

MANAUS
2018

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

HENRIQUE CATIVO DOS SANTOS

INVESTIGAÇÃO QUÍMICA E BUSCA DE ATIVIDADE
ANTIFÚNGICA EM RESÍDUOS MADEIREIROS DE *Protium*
puncticulatum Macbr.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para a obtenção do título de MESTRE EM QUÍMICA, área de concentração Química Orgânica.

Orientadora: Dra. Maria da Paz Lima
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA)

MANAUS
2018

Ficha Catalográfica

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

S237i Santos, Henrique Cativos dos
Investigação química e busca de atividade antifúngica em resíduos
madeireiros de *Protium puncticulatum* macbr. / Henrique Cativos dos
Santos. 2018
100 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Maria da Paz Lima
Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do
Amazonas.

1. Burseraceae. 2. Fitoquímica. 3. Triterpenos. 4. Lignanas. 5.
Antifúngico. I. Lima, Maria da Paz II. Universidade Federal do
Amazonas III. Título

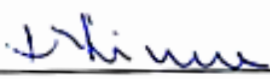
**INVESTIGAÇÃO QUÍMICA E BUSCA DE ATIVIDADE ANTIFÚNGICA EM
RESÍDUOS MADEIREIROS DE *Protium puncticulatum* Macbr.**

HENRIQUE CATIVO DOS SANTOS

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química,
do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal do Amazonas como
requisito parcial para a obtenção do Grau de mestre em Química.

Aprovada em 30 de abril de 2018

COMISSÃO EXAMINADORA



Prof.ª Dr.ª Maria da Paz Lima
Universidade Federal do Amazonas
Orientador



Prof. Dr. Joel Aparecido Passo
Membro UFAM



Prof. Dr. Sérgio Massayoshi Nunomura
Membro Externo/INPA

Universidade Federal do Amazonas
Manaus, 30 de abril de 2018

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho à memória de dois grandes guerreiros que
marcaram a minha vida:*

*A meu pai **Leônidas Santos** (in Memoriam), o mais generoso de
todos os pais, que sempre lutou com todas as forças para educar
seus filhos.*

*A meu filho **Nícolas Miguel** (in Memoriam), pela luz que trouxe à
minha vida.*

Amo muito vocês!

“Os que semeiam entre lágrimas, recolherão com alegria.”

(Salmo 125:5)

AGRADECIMENTOS

Começo meus agradecimentos por DEUS, por ter me concedido forças para seguir em frente e à honra de chegar até aqui. Além disso, agradeço também por todas as bênçãos que recebi neste trabalho e pelas pessoas que colocou ao meu lado nessa caminhada, pessoas sem as quais certamente eu não teria dado conta dessa conquista!

A MINHA FAMÍLIA, especialmente a minha mãe Ivaneide e meus irmãos, que mesmo estando tão distante, se mantiveram tão perto com suas manifestações de apoio e carinho. A meu pai, Leônidas (*in Memoriam*), exemplo de homem humilde e trabalhador a qual procuro me espelhar sempre. A vocês o meu amor e gratidão eterna!

A minha querida e futura NOIVA, Jucilene pelo incondicional companheirismo. Sempre ao meu lado e me fazendo acreditar que posso chegar muito além do que venho idealizando. Um agradecimento muito carinhoso por ter feito do meu sonho o nosso sonho!

A meu FILHO Nicolas Miguel (*in Memoriam*), meu anjinho de luz que veio nessa vida para trazer amor e um novo significado para minha vida. Do alto da nuvem de onde você me observa, saiba que te amo muito meu saruêzinho. Você me faz muita falta!

À minha ORIENTADORA, Dr^a. Maria Da Paz Lima, agradeço, inicialmente, por ter aceitado meu pedido de orientação, sem, ao menos, me conhecer, ou dar importância se eu carregava ou não conhecimento na área de fitoquímica. Agradeço também pela valiosa orientação, paciência, amizade, apoio e tempo dedicado a mim durante essa trajetória. Muito obrigado por tudo Doutora da Paz!

Aos AMIGOS do LQPN/INPA: Jeniffer, Welem e Paulo Alan que me receberam de forma carinhosa e desde o início das minhas atividades me fizeram com que eu me sentisse a vontade no grupo de pesquisa. A todos os outros colegas

Priscila, Ayrton, Daniela e muitos outros que no decorrer dessa jornada foram entrando para o grupo e que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho. Obrigado a todos!

Ao amigo doutorando RENAN FEITOSA que sempre foi bastante disponível a responder as minhas dúvidas sobre cromatografia e RMN!

A todos os AMIGOS da pós-graduação que de alguma forma compartilharam comigo algum conhecimento para a realização desse trabalho, especialmente o Paulo e Moacir, por todos os almoços, puxões de orelha, discussões nas intermináveis listas de exercícios, as festas e as conquistas alcançados juntos... Um grande obrigado!

À Ana Cortez e Marielle Macêdo, pelos ensaios antifúngicos.

Aos TÉCNICOS da Central Analítica do Laboratório Temático de Química de Produtos Naturais (CA-LTQPN) do INPA, Sabrina, Magno e Zelina pelo suporte na obtenção dos espectros de RMN e EM!

Ao INPA pelo uso de suas instalações!

Ao programa de PÓS-GRADUAÇÃO da UFAM e a todos os PROFESSORES que fizeram parte dessa jornada, com as orientações, ensinamentos, amizade e paciência!

Por fim, agradeço a CAPES pelo auxílio financeiro.

Ninguém vence sozinho... OBRIGADO

A TODOS

RESUMO

As atividades madeireiras tradicionais no Brasil são geradoras de resíduos e grande parte é subutilizada por falta de conhecimento sobre seu aproveitamento. Em trabalho de parceria, o grupo de pesquisa “Plantas da Amazônia: Química, Quimiosistemática e Atividade Biológica” utiliza as sobras de madeira do Laboratório de Tecnologia da Madeira (LTM) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) como fonte de pesquisa, para fornecer a comunidade científica conhecimentos químicos e biológicos sobre a madeira de diferentes espécies. Nesse trabalho as sobras da madeira de *Protium punctulatum* (Burseraceae) foram estudadas na investigação química e avaliação da atividade antifúngica. Após os fracionamentos cromatográficos e análise por espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear (RMN), o trabalho com o extrato hexânico resultou na obtenção em mistura dos triterpenos lupeol, de α e β -amirin e dos esteroides β -sitosterol e estigmasterol. O fracionamento com extrato metanólico conduziu ao isolamento das lignanas 7-oxo-parabenzolactona e 7'-hidroxi-9 α -metilcubebina. Considerando o alto potencial biológico das substâncias pertencente à classe das lignanas, foi realizado o ensaio antifúngico com as lignanas isoladas dos resíduos madeireiros frente às cepas de *Cryptococcus neoformans* (ATCC90112), *Cryptococcus gattii* (ATCC32269) e *Cândida albicans* (ATCC60193). A lignana 7'-hidroxi-9 α -metilcubebina apresentou maior atividade contra as cepas de *C. neoformans* e *C. gattii* (CIM 160 μ g/ml) pela técnica de microdiluição em caldo.

Palavras-chave: Burseraceae; Fitoquímica; Triterpenos, Lignanas, Antifúngico.

ABSTRACT

Traditional logging activities in Brazil are waste generators and much of it is underutilized due to lack of knowledge about their use. In partnership work, the research group "Plants of the Amazon: Chemistry, Chemosystematics and Biological Activity", use as wood lefovers from the Wood Technology Laboratory (LTM) of the National Institute of Amazonian Research (INPA) as a research source, to provide the scientific community with chemical and biological knowledge about the wood of different species. In this study the remains of the wood of *Protium puncticulatum* (Burseraceae) were available and used to chemical research and evaluation of antifungal activity. After the chromatographic fractionations and the analysis by Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy, the work with the hexane extract resulted in the mixture of triterpenes α and β -amirina, in addition to lupeol; of steroids β -sitosterol and stigmasterol. The fractionation with methanolic extract led to the isolation of the lignans 7-oxo-parabenzolactone and 7'-hydroxy-9 α -methylcubebin. Considering the high biological potential of the compounds belonging to the class of lignans, the antifungal test was carried out with the lignans isolated from the wood residues against the strains of *Cryptococcus neoformans* (ATCC90112), *Cryptococcus gattii* (ATCC32269) and *Candida albicans* (ATCC60193). The lignan 7'-hydroxy-9 α -methylcubebin showed higher activity against the strains of *C. neoformans* and *C. gattii* (MIC 160 μ g/ml) by broth microdilution technique.

Keywords: Burseraceae; Phytochemistry; Triterpenes, Lignans, Antifungal.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Seção transversal ilustrativa do tronco de uma árvore	18
Figura 2. Distribuição mundial da família Burseraceae	20
Figura 3. Resíduos de <i>Protium puncticulatum</i> fornecidos pelo LTM	36
Figura 4. Placa de CCD dos extratos brutos de PPH e PPM com padrões de substâncias conhecidas	38
Figura 5. Placa de CCD da fração de PPH-23 com padrões de lupeol, α e β -amirina	50
Figura 6. Mistura dos triterpenos 1 , 2 e 3 identificados na fração PPH-23	52
Figura 7. Espectro de RMN ^1H de PPH-23 (300 MHz, CDCl_3)	54
Figura 8. Expansão dos sinais de hidrogênios olefínicos de α e β -amirina nas regiões de 5,19 a 4,57 ppm	55
Figura 9. Expansão dos sinais de H-olefínicos do Lupeol nas regiões de 5,19 a 4,57 ppm	55
Figura 10. Expansão dos sinais de Hidrogênios carbinólicos nas regiões de 3,25 a 3,16 ppm	55
Figura 11. Espectro de RMN ^{13}C de PPH-23 (75 MHz, CDCl_3)	56
Figura 12. Espectro de Dept-135° de PPH-23 (75 MHz, CDCl_3)	57
Figura 13. Mapa de contorno de HSQC de PPH-23 (75 MHz, CDCl_3)	58
Figura 14. Placa cromatográfica de PPH-38 com padrões de β -sitosterol, lupeol, α e β -amirina	59
Figura 15. Esteroides 4 e 5 identificados em mistura na fração PPH-38	60
Figura 16. Espectro de RMN ^1H de PPH-38 (300 MHz, CDCl_3)	61
Figura 17. Placa cromatográfica da fração PPM-4.8	62
Figura 18. Estrutura 6 da lignana 7-oxo-parabenzolactona	64

Figura 19. Espectro de RMN ^1H de PPM-4.8 (300 MHz, CDCl_3)	66
Figura 20. Expansão dos sinais de RMN de ^1H de PPM-4.8 nas regiões de 7,28 a 6,54 ppm	67
Figura 21. Expansão dos sinais de RMN de ^1H de PPM-4.8 nas regiões de 6,06 a 5,89 ppm	67
Figura 22. Expansão dos sinais de RMN de ^1H de PPM-4.8 nas regiões de 4,42 a 3,49 ppm	68
Figura 23. Espectro de RMN ^{13}C de PPM-4.8 (75 MHz, CDCl_3)	69
Figura 24. Espectro de Dept-135 $^\circ$ de PPM-4.8 (75 MHz, CDCl_3)	70
Figura 25. Mapa de contorno de HSQC de PPM-4.8 (75 MHz, CDCl_3)	71
Figura 26. Mapa de contorno de HMBC de PPM-4.8 (75 MHz, CDCl_3)	72
Figura 27. Placa cromatográfica de PPM-4.10.5.7.6	73
Figura 28. Estrutura 7 da lignana 7'-hidroxi-9 α -metilcubebina	76
Figura 29. Espectro de RMN ^1H de PPM-4.10.5.7.6 (300 MHz, CDCl_3)	78
Figura 30. Expansão dos sinais de RMN de ^1H de PPM-4.10.5.7.6 nas regiões de 6,64 a 6,36 ppm	79
Figura 31. Expansão dos sinais de RMN de ^1H de PPM-4.10.5.7.6 nas regiões de 5,95 a 5,90 ppm	79
Figura 32. Expansão dos sinais de RMN de ^1H de PPM-4.10.5.7.6 nas regiões de 4,70 a 2,26 ppm	80
Figura 33. Espectro de RMN ^{13}C de PPM-4.10.5.7.6 (75 MHz, CDCl_3)	81
Figura 34. Espectro de Dept-135 $^\circ$ de PPM-4.10.5.7.6 (75 MHz, CDCl_3)	82
Figura 35. Mapa de contorno de HSQC de PPM-4.10.5.7.6 (75 MHz, CDCl_3)	83
Figura 36. Mapa de contorno de HMBC de PPM-4.10.5.7.6 (75 MHz, CDCl_3)	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Triterpenos identificados no gênero <i>Protium</i>	22
Tabela 2. Constituintes químicos majoritários dos óleos essenciais em resina de <i>Protium</i> da Região Amazônica	27
Tabela 3. Massa obtida dos extratos em hexano e metanol	38
Tabela 4. Reunião das frações obtidas de PPH	39
Tabela 5. Reunião das frações obtidas de PPM	40
Tabela 6. Reunião das frações obtidas de PPM-4	42
Tabela 7. Reunião das frações obtidas de PPM-4.10	44
Tabela 8. Reunião das frações obtidas de PPM-4.10.5	44
Tabela 9. Reunião das frações obtidas de PPM-4.10.5.7	46
Tabela 10. Cepas de fungos utilizadas nos testes	47
Tabela 11. Dados dos hidrogênios olefínicos e carbinólicos dos constituintes 1, 2 e 3 da fração PPH-23	53
Tabela 12. Dados dos carbonos olefínicos e carbinólicos dos constituintes 1, 2 e 3 da fração PPH-23	53
Tabela 13. Dados dos hidrogênios olefínicos e carbinólicos dos constituintes da fração PPH-38	60
Tabela 14. Dados de RMN da fração 4.8 em CDCl_3	65
Tabela 15. Dados de RMN da orientação do grupo metoxi em C-9 da substância 7 em comparação com literatura.	76
Tabela 16. Dados de RMN da fração PPM-4.10.5.7.6 em CDCl_3	77
Tabela 17. Resultados da CIM das substâncias sobre as cepas de fungos	86

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Esqueletos dos triterpenos de <i>Protium</i>	24
Quadro 2. Derivado do escaleno	24
Quadro 3. Estruturas dos esteroides	25
Quadro 4. Estruturas das cumarinas	25
Quadro 5. Estruturas das lignanas	26
Quadro 6. Estruturas dos flavonoides	27
Quadro 7. Estruturas das lignanas utilizadas no ensaio antifúngico	85

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Classificação dos Tipos de Resíduos de Madeira	17
Esquema 2. Preparação dos extratos brutos dos resíduos	37
Esquema 3. Fracionamento cromatográfico de PPH	39
Esquema 4. Fracionamento cromatográfico de PPM	40
Esquema 5. Fracionamento cromatográfico de PPM-4	41
Esquema 6. Fracionamento cromatográfico de PPM-4.10 e PPM-4.10.5	43
Esquema 7. Fracionamento cromatográfico de PPM-4.10.5.7	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcOEt – Acetato de etila

APG – Grupo de Filogenia das Angiospérmicas

CC – Cromatografia em Coluna

CCD – Cromatografia em Camada Delgada

CDCl₃ – Clorofórmio deuterado

COSY – Correlated Spectroscopy

d – dubleto

dd – duplo dubleto

DCM – Diclorometano

Dept -135° – *Distortionless Enhancement by Polarization Transfer* – ângulo 135°

DMSO– Dimetilsulfóxido

EM – Espectrometria de Massas

h – altura

Hz – Hertz

Hex – Hexano

HMBC – Heteronuclear Multiple-Bond Correlation

HPLC – High performance liquid chromatography

HSQC – Heteronuclear Single-Quantum Correlation

J – Constante de acoplamento

LMCSAS– Laboratório de Micologia da Coordenação de Sociedade, Ambiente e Saúde

LTM – Laboratório de Tecnologia da Madeira

LQPN – Laboratório de Química de Produtos Naturais

MMA – Ministério do Meio Ambiente

MOBOT – Missouri Botanical Garden

m – multiplete

MeOH – Metanol

MeOD – Metanol deuterado

m/z – Relação massa/carga

NP-PEG – Natural product – polietilen glycol

PPM – *Protium puncticulatum* Hexânico

PPM – *Protium puncticulatum* Metanólico

RMN de ¹H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

RMN de ^{13}C – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono

s – singleto

s/- singleto largo

t – tripleto

UV – Ultravioleta

$\mu\text{g/ml}$ – micrograma por mililitros

δ – Deslocamento químico em parte por milhão

Φ – Diâmetro

1D – unidimensional

2D – bidimensional

Sumário

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1. Resíduos madeireiros e estudos fitoquímicos	17
2.2. Aspectos botânicos e químicos de Burseraceae	20
2.2.1. O Gênero <i>Protium</i> Burmann	21
2.3. Atividade Antifúngica	29
3. OBJETIVOS	31
3.1. Objetivo Geral	32
3.2. Objetivos Específicos	32
4. EXPERIMENTAL	33
4.1. Material utilizado	34
4.2. Equipamentos e acessórios	35
4.3. Obtenção do material vegetal	36
4.4. Processamento dos resíduos, preparação dos extratos e análises preliminares	37
4.5. Extratos de <i>Protium puncticulatum</i> (Burseraceae)	38
4.5.1. Fracionamento cromatográfico do extrato hexânico de <i>Protium puncticulatum</i> (PPH)	39
4.5.2. Fracionamento cromatográfico do extrato metanólico de <i>Protium puncticulatum</i> (PPM)	40
4.6. Ensaio antifúngico	47

4.6.1. Cepas testadas e preparação dos inóculos fúngicos	47
4.6.2. Realização do teste de microdiluição em caldo	48
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5.1. Determinação estrutural em mistura das substâncias isoladas do extrato hexânico em <i>P. puncticulatum</i>	50
5.1.1. Identificação dos constituintes químicos da fração PPH-23	50
5.1.2. Identificação dos constituintes químicos da fração PPH-38.....	59
5.2. Determinação estrutural das substâncias isoladas do extrato metanólico em <i>P. puncticulatum</i>	62
5.2.1. Identificação da substância 6 (PPM-4.8).....	62
5.2.2. Determinação da substância 7 (PPM-4.10.5.7.6).....	73
5.3. Atividade antifúngica sobre as cepas de <i>Cândida</i> e <i>Cryptococcus</i>	85
6. CONCLUSÃO	87
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89

1. INTRODUÇÃO

1. Introdução

O Brasil é detentor da maior biodiversidade de fauna e flora do planeta, segundo avaliação feita pelo Ministério do Meio Ambiente (MMA, 2016), esta se traduz em mais de 20% do número total de espécies da Terra. A grande extensão florestal, além de satisfazer uma importante função no equilíbrio ambiental do planeta, também desempenha um papel essencial para economia do país, pois é fonte de madeira de alto valor comercial, frutos, borracha, resinas, óleos essenciais, entre outros produtos de importância industrial.

Para os pesquisadores é vista como um grande campo de estudo, promissor na busca de atividade biológica e de novas substâncias de origem vegetal. Estudos têm revelado um diversificado grupo de metabólitos secundários de grande interesse devido às suas aplicações na indústria de cosméticos, alimentos, agroquímica e principalmente na indústria farmacêutica, que visam usar produtos de origem natural presente em óleos essenciais e extratos brutos que apresentem algum potencial biológico como ponto de partida para o desenvolvimento de novos fármacos.

Os estudos fitoquímicos de diversas partes das plantas são frequentemente referenciados na literatura utilizando-se folhas, sementes, frutos, raízes e casca, mas há poucos relatos de estudos sobre a madeira (cerne ou alburno), devido à carência de material vegetal disponível.

As atividades industriais madeireiras tradicionais no Brasil são altamente geradoras de resíduos de madeira, principalmente nas indústrias de processamento mecânico como serrarias, movelarias, fábricas de lâminas e compensado (WIECHETECK, 2009). A subutilização desses resíduos madeireiros por falta de

conhecimento voltado ao aproveitamento tem levado aos pesquisadores à observação desses rejeitos, que poderão torna-se um recurso viável para a obtenção de material vegetal que muitas vezes são de espécies ameaçadas de extinção.

Essa grande quantidade de resíduo madeireiro pode ser melhor explorado, a exemplo de Nascimento (2007) que vem apresentando uma alternativa viável para o aproveitamento desses recursos na produção de instrumentos musicais, brinquedos e diversas peças artesanais cujas atividades são realizadas no Laboratório de Tecnologia da Madeira (LTM) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). Em trabalho de parceria, o grupo de pesquisa “Plantas da Amazônia: Química, Quimiosistemática e Atividade Biológica” utilizam as sobras de madeira do LTM como fonte de pesquisa, para fornecer a comunidade científica conhecimentos químicos e biológicos da madeira.

Portanto, diante da importância do reaproveitamento, um dos focos dessa dissertação foi a investigação fitoquímica e biológica dos resíduos gerados na produção de artefatos, realizando estudos com resíduos madeireiros do breu-vermelho (*Protium puncticulatum* Macbr.; Burseraceae), considerada madeira de boa qualidade, no entanto carente de estudos científicos.

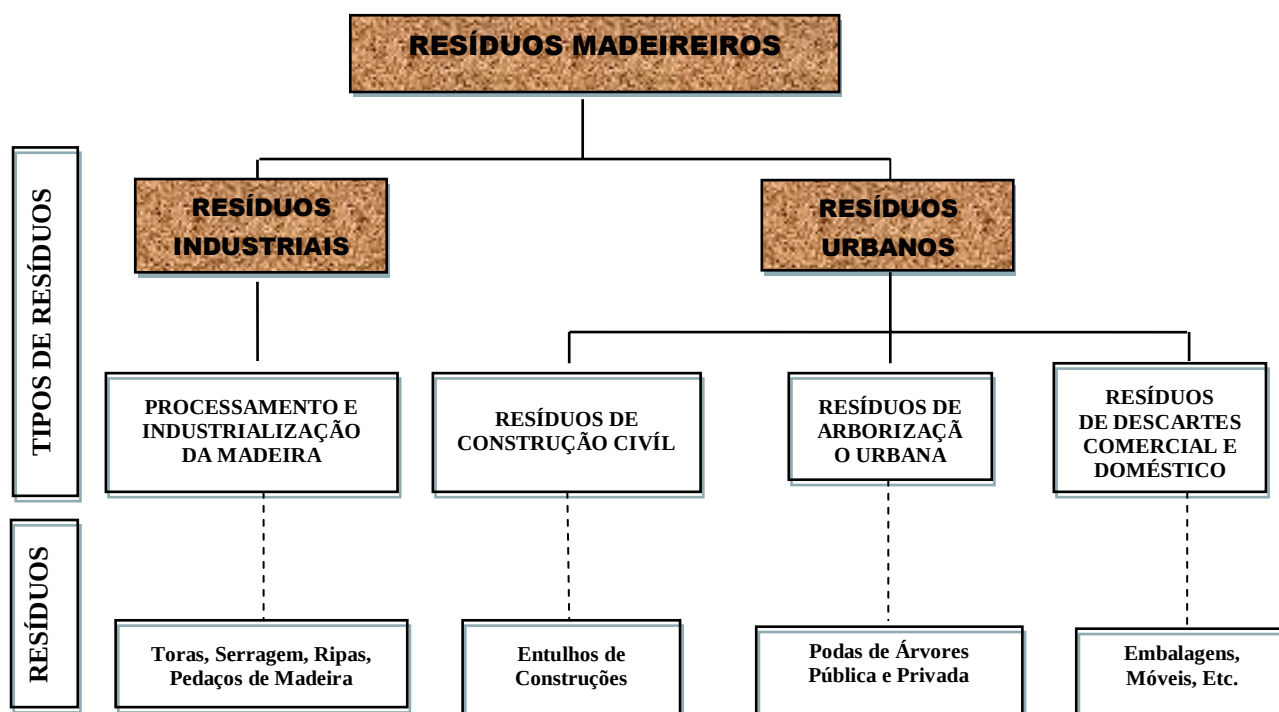
A proposta de aliar os estudos fitoquímicos de *P. puncticulatum* com busca de atividade antifúngica é devido ao gênero *Protium* bem como vários outros de Burseraceae conterem em sua composição química as lignanas. Essa classe de substâncias é relatada na literatura pelo alto potencial biológico, entre elas o antimicrobiano (CÉSPEDES et al. 2006; HWANG et al. 2010; HWANG et al. 2011).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Resíduos madeireiros e estudos fitoquímicos

Regiões que tradicionalmente apresentam intensa exploração de madeira, como é o caso da Amazônia, enfrentam sérios problemas em relação ao aproveitamento de resíduos florestais e madeireiros (BARBOSA et al. 2001), uma vez que, no ato do processamento das atividades de desdobro, laminação das toras e beneficiamento da madeira serrada nas indústrias, conjuntamente, acumulam perdas significativas de matéria-prima (VIEIRA, 2006).

De acordo com o Ministério do Meio Ambiente em 2009, o Brasil apresentava uma estimativa de aproximadamente 30 milhões de toneladas de resíduos de madeira gerados anualmente. Em meio a essa geração de resíduos, as principais fontes foram provenientes do processamento industrial, seguido do meio urbano, como demonstrado no Esquema 1.



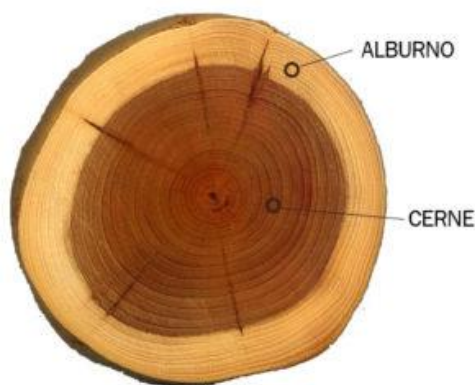
Esquema 1 – Classificação dos Tipos de Resíduos de Madeira

Fonte: Adaptada de WIECHETECK, 2009

O enorme volume de resíduos de madeira gerado, aliada as questões de desmatamento e ao uso concentrado de algumas espécies são um dos principais problemas encontrados pelo setor madeireiro, e quando esses resíduos são dispersos no meio ambiente podem trazer sérios problemas de poluição, especialmente quando incinerados sem um prévio controle ambiental (DUTRA e NASCIMENTO, 2005).

Como alternativa de aproveitamento citados na literatura para minimizar esta problemática ambiental, encontra-se a fabricação de carvão ativado (COUTO, 2009), produção de adubos orgânicos (CAMPOS e ANDRADE, 2011), geração de energia (SALES et al. 2000) e produção de pequenos objetos (NASCIMENTO, 2007).

Por outro lado, na busca de agregar valor ao material descartado, através de conhecimentos científicos, o laboratório de Química dos Produtos Naturais (LQPN) realizou os primeiros estudos com resíduos madeireiros utilizando as partes do cerne e alburno da madeira (Figura 1).



<https://www.cobrirer.com.br/estrutura-da-madeira-medula-e-cerne>

Figura 1. Seção ilustrativa do tronco de uma árvore (cerne e alburno)

Hayasida et al. (2008) mostraram excelentes rendimentos de metabólitos secundários através de estudos fitoquímicos usando resíduos da espécie *Brosimum rubescens* Taubert (pau-rainha) do qual obtiveram alto teor de xantiletina (2,35%),

uma cumarina reportada por apresentar potencial biológico como atividades antiplaquetária (TENG et al. 1992), antifúngica (GODOY et al. 2005) e herbicida (ANAYA et al. 2005). Nesse estudo ficou evidenciado que o alburno não produziu xantiletina e foram identificados o triterpeno 3 β -acetoxi-olean-12-eno-28-al e o esteroide β -sitosterol (HAYASIDA et al. 2011).

No estudo fitoquímico de Gomes (2015) com resíduos madeireiros de *Inga alba* Willd. e *Inga paraensis* Ducke, constatou-se no extrato metanólico de *I. paraensis*, à presença dos esteroides espinasterol e espinasterona, relatados pela primeira vez no gênero *Inga*. No extrato metanólico de *I. Alba* foram obtidos os flavonóides taxifolina (flavanonol), butina (flavanona), 3-O-metilquercetina (flavonol) e uma substância inédita glicosilada derivada do ácido mentiafólico, nomeada de dapaznídeo.

Melo (2016) ao realizar estudos com resíduos madeireiros de *Tabebuia serratifolia* (Vahl) G. Nicholson (piúva-amarela), *Acacia mangium* Willd. (acácia) e *Dipteryx polyphylla* Huber (cumarú) obteve resultados promissores. No extrato metanólico de *T. serratifolia* foram isoladas e identificadas as naftoquinonas (desidro- α -lapachona, desidro-iso- α -lapachona e α -lapachona), além de lignanas (paulownina e cicloolivil). Na espécie *A. mangium* identificou-se os esteroides (sitosterol, estigmasterol e um derivado esterificado do espinasterol), um flavonoide (3,4',7,8-tetrahidroxiflavona) e outras substâncias fenólicas como ácido 3-metoxi-4-hidroxi-cinâmico, metilparabeno e 4-hidroxibenzaldeído. No extrato metanólico de *D. polyphylla* foi possível o isolamento de quatro isoflavanas (2',7-dihidroxi-4'-metoxi-isoflavana, 2',8-dihidroxi-4',7-dimetoxi-isoflavana, 3',7-dihidroxi-4'-metoxi-isoflavana e 3',8-dihidroxi-4',7-dimetoxi-isoflavana) as duas últimas são inéditas na literatura.

naturais (CRAVO, 1996). No Novo Testamento, a mirra costuma estar associada ao ato de embalsamar e ao sepultamento, devido a suas propriedades de conservação.

Os metabólitos secundários relatados na família são principalmente triterpenos, mas também são relatados esteróides, lignanas, cumarinas e flavonoides (KHALID, 1983). Os triterpenos de Burseraceae apresentam esqueletos normalmente do tipo ursano e oleanano, além de outros esqueletos como damarano, eufano, tirucalano, lanostano e cicloartano, hopano, lupano, friedelano, taraxarano, taraxastano (PERNET, 1972; KHALID, 1983, LIMA et al, 2001 e 2004) e mais recentemente foi relatado triterpenos com esqueleto polipodano (SHEN e LOU, 2008; KIMURA et al. 2001).

2.2.1. O Gênero *Protium* Burmann f.

O gênero *Protium* é o mais diversificado da família Burseraceae contendo cerca de 146 espécies, sendo o mais representativo na flora Amazônica com 73 espécies na região, sendo 42 endêmicas (FINE et al. 2005; DALY, 1992). As espécies deste gênero semelhantes a muitas outras Burseraceae possuem ductos resiníferos na parte interna da casca, e exsudam grandes quantidades de óleo-resina, conhecidas na região amazônica como breu ou breu branco e são bastante utilizados para dor de cabeça, descongestionante nasal, como cicatrizantes e principalmente como incenso ou repelente de insetos (CORRÊA, 1984; PERNET, 1972; LORENZI e MATOS, 2002).

No gênero *Protium* os triterpenos foram encontrados em folhas e resinas e têm esqueletos dos tipos ursano [URS], oleanano [OLE], lupano [LUP], tirucalano [TIL], friedelano [FRI] e taraxastano [TAX], sendo mais abundantes os dois tipos oleanano e ursano (Tabela 1 e Quadro 1).

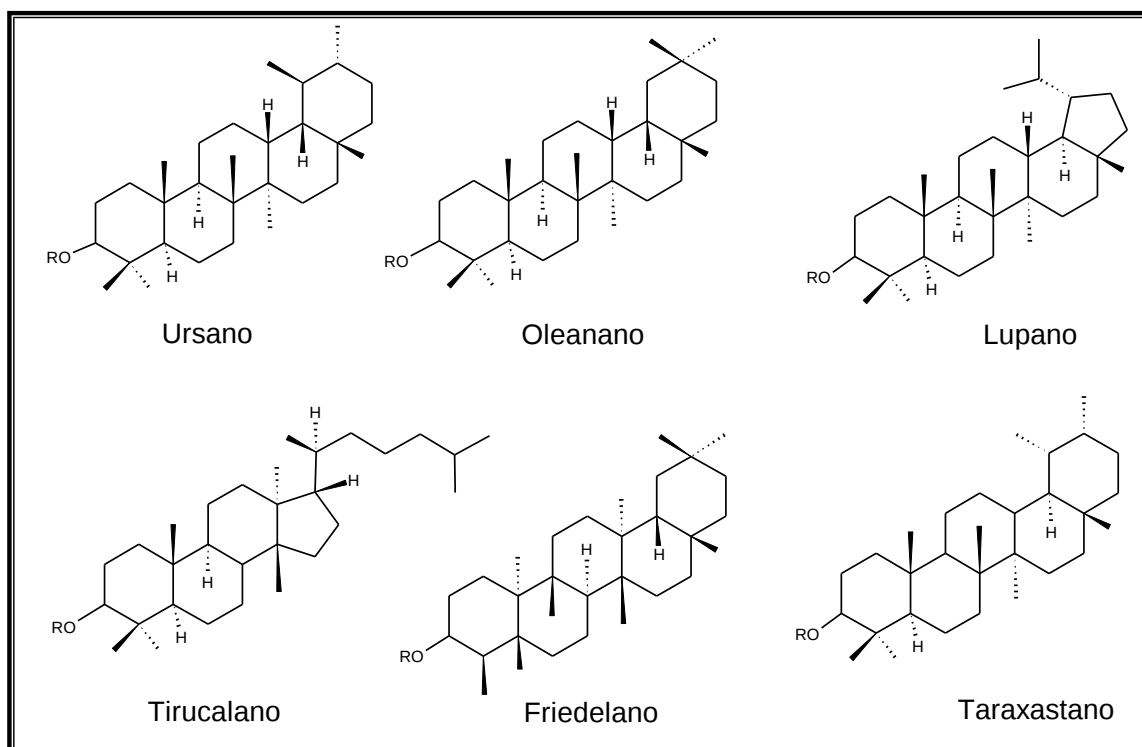
Tabela 1. Triterpenos identificados no gênero *Protium*

TRITERPENOS [esqueleto]	ESPÉCIES DE PROTIUM							
	<i>P. apiculatum</i>	<i>P. crenatum</i>	<i>P. hebetatum</i>	<i>P. heptaphyllum</i>	<i>P. icicariba</i>	<i>P. kleinii</i>	<i>P. paniculatum</i>	<i>P. strumosum</i>
ácido-3-oxotirucala-8,24-dien-21-oico [TIR]			R [12]					
ácido-3- α -acetoxitirucala-8,24-dien-21-oico [TIR]			R [12]					
ácido-3- α -hidroxitirucala-7,24-dien-21-oico [TIR]			R [12]					
ácido-3 α -hidroxitirucala-7,24-dien-21-óico [TIR]		R [10]		R [9]				
ácido-3 α -hidroxitirucala-8,24-dien-21-oico [TIR]				R [9]				
ácido-3- α -hidroxitirucala-8,24-dien-21-oico [TIR]			R [12]					
breina [URS]			R [12]	R [4, 9, 11]		R [3, 8]	R [1]	
cabraleadiol [DAM]	F [7]							
epi-friedelanol [FRI]								F [6]
friedelina [FRI]								F [6]
lupeol [LUP]	F [7]				F [7]			F [6]
lupenona [LUP]				R [4]				F [6]
maniladiol [OLE]			R [12]	R [4, 9, 11]			R [1]	

α -amirina [URS]	R [12]	R [2, 4, 5, 9,11]	F [7]	R [8]	R [1]	F [6]
α -amirinona [URS]	R [12]	R [4]				
β -amirina [OLE]	R [12]	R [2, 4, 5, 9, 11]	F [7]	R [8]	R [1]	F [6]
β -amirinona [OLE]	R [12]	R [4]				
3 β -hidroxi-urs-9,12-dienol [URS]		R [9]				
3 β -hidroxi-olea-9,12-dienol [OLE]		R [9]				
3-oxo-11 β ,16 β -didroxi-urs-12-eno [URS]				R [8]		
3-oxo-11 β -hidroxi-oleano-12-eno [OLE]				R [8]		
3-oxo-11 β -hidroxi-urs-12-eno [URS]				R [8]		
3-oxo-20S-hidroxitaxastano [TAX]		R [11]				
3- β ,20S-dihidroxitaxastano [TAX]		R [11]				
3- β ,24-dihidroxi-urs-12-eno [URS]		R [11]				

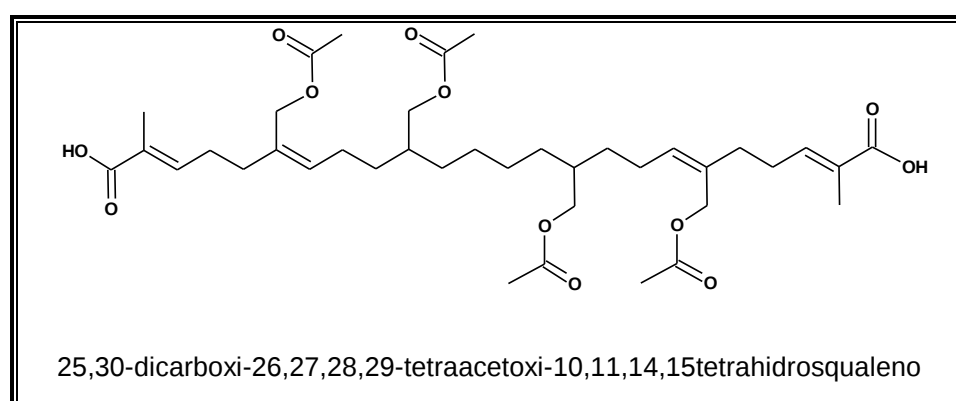
F= Folhas R= Resina;

[1]=Almeida et al. 2015; [2]=Bandeira et al. 2007; [3]=Calixto et al. 2001; [4]=Chaves et al. 2005; [5]=Endrigger et al. 2014; [6]=Guimarães e Siane 2007; [7]=Lima et al. 2001; [8]=Lima et al. 2005; [9]=Maia et al. 2000; [10]= Mora et al. 2001; [11]=Susunaga et al. 2001; [12]= Marques et al. 2010



Quadro 1. Esqueletos dos triterpenos de *Protium*

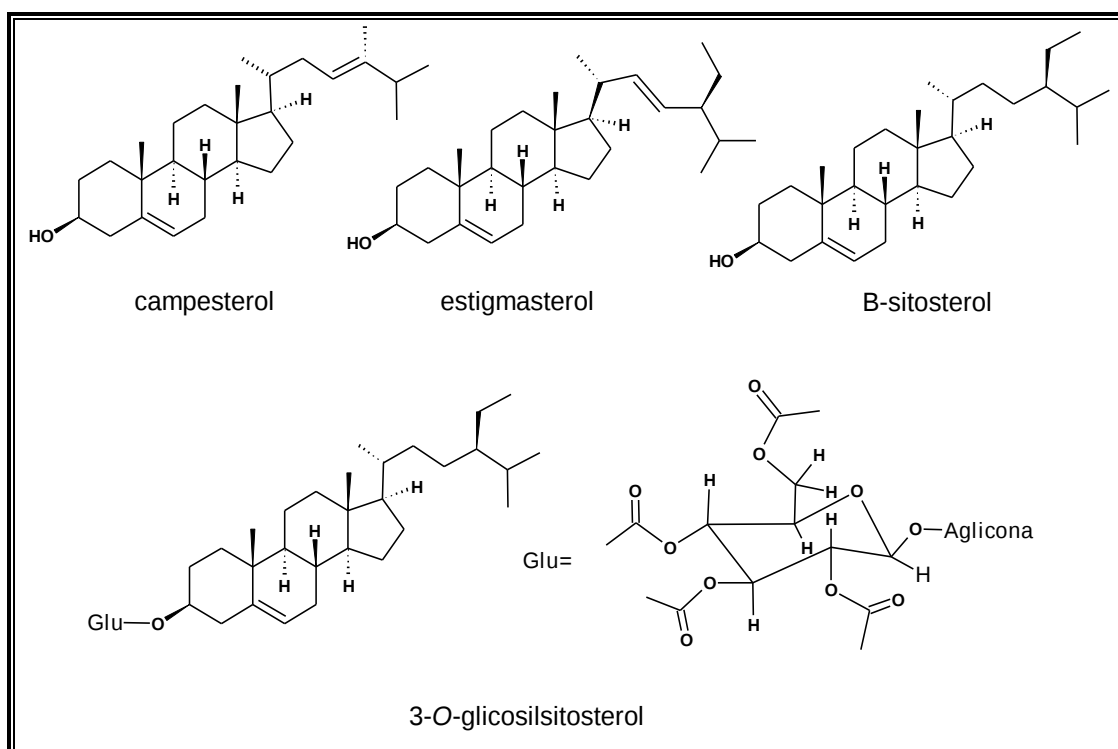
Mais recentemente, Lokvam e Fine (2012) isolaram do tecido das folhas jovens de *P. suberratum* um derivado do esqualeno chamado de 25,30-dicarboxi-26,27,28,29-tetraacetoxi-10,11,14,15-tetrahidrosqualeno (Quadro 2).



Quadro 2. Derivado do esqualeno

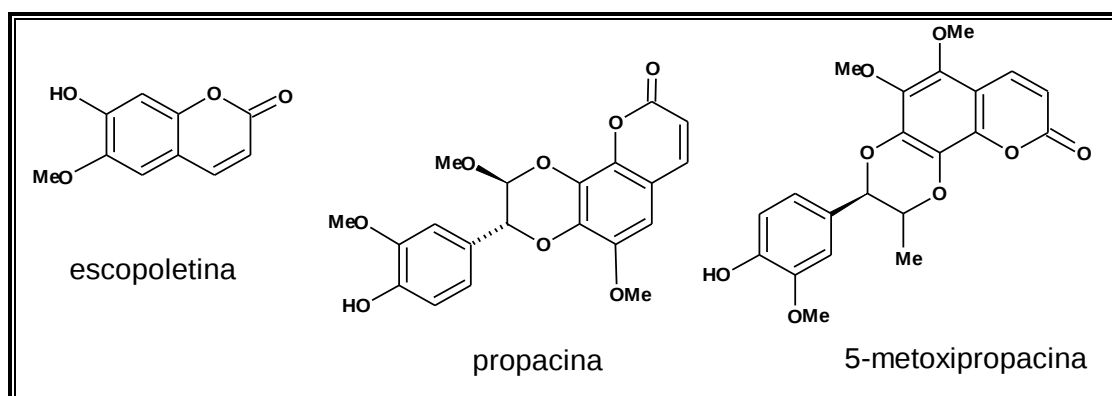
Os esteróides também têm sido relatado em *Protium*: 3-O-glicosilsterol em *P. strumosum* (GUIMARÃES e SIANI, 2007), campesterol, estigmasterol em *P.*

hebetatum (COSTA et al. 2015), β -sitosterol em *P. unifoliolatum* (MAGALHÃES et al. 2004) e estigmasterol em *P. javanicum* (ADFA et al. 2010) (Quadro 3).



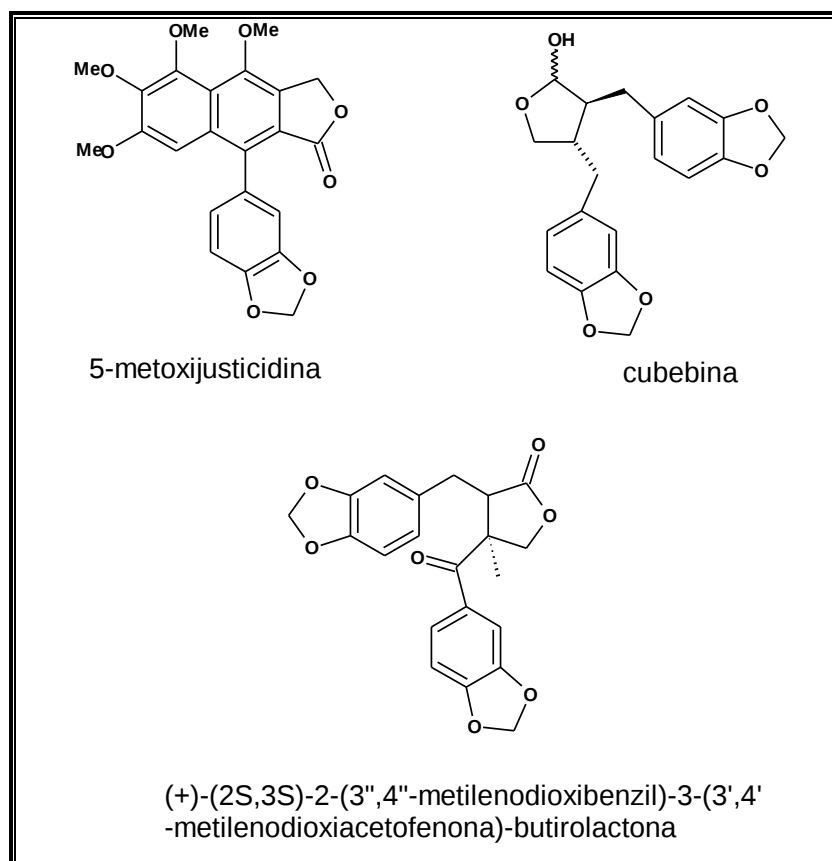
Quadro 3. Estruturas dos esteroides

Três cumarinas foram identificadas no gênero, escopoletina em *P. javanicum* (ADFA et al. 2010), *P. hebetatum* (COSTA et al. 2015), e *P. heptaphyllum* (BANDEIRA et al. 2002), *P. unifoliolatum* (MAGALHÃES et al. 2004), propacina em *P. opacum* (MARQUES e YOSHIDA 1990) e 5-metoxipropacina em *P. unifoliolatum* (MAGALHÃES et al. 2004) (Quadro 4).



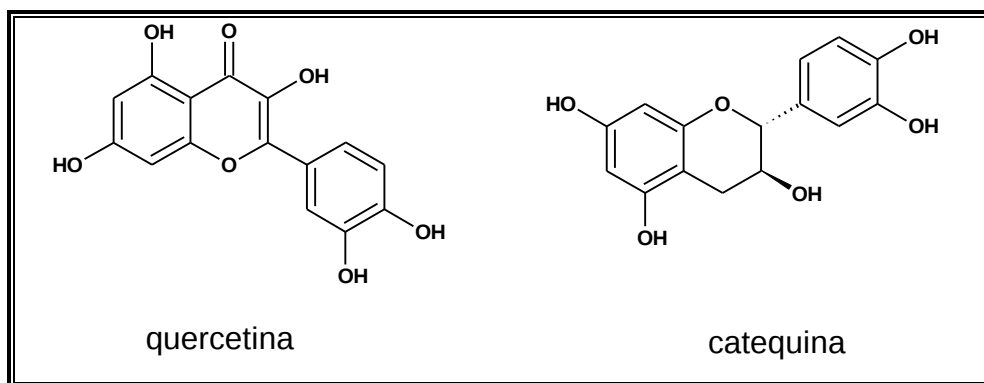
Quadro 4. Estruturas das cumarinas

As lignanas identificadas em *Protium* foram 5-metoxijusticidina de *Protium unifoliolatum* (SIANI et al. 1998), cubebina e (+)-(2S,3S)-2-(3'',4''-metilenodioxibenzil)-3-(3',4'-metilenodioxiacetofenona)-butirolactona na espécie de *Protium tenuifolium* (SIQUEIRA et al. 1995) (Quadro 5).



Quadro 5. Estruturas das lignanas

Na classe dos flavonoides foram identificados em *P. heptaphyllum* a quercetina, catequina, e quercetina-3-O-ramnosil (BANDEIRA et al. 2002). A quercetina também foi identificada em *P. javanicum* (ADFA et al. 2010) (Quadro 6).



Quadro 6. Estruturas dos flavonoides

As espécies de *Protium* da região Amazônica também são ricas em constituintes químicos voláteis especialmente aqueles obtidos das resinas que produzem altos teores desses óleos essenciais, predominando os monoterpenos seguidos dos sesquiterpenos. A Tabela 2 mostra os constituintes majoritários da composição dos voláteis em resina de *Protium* da região amazônica.

Tabela 2. Constituintes químicos majoritários dos óleos essenciais em resina de *Protium* da região amazônica

ESPÉCIES [referências]	SUBSTÂNCIAS MAJORITÁRIAS
<i>P. altsonii</i> [1]	<i>p</i> -cimeno (32,5%), α -felandreno (22,6%), β -felandreno (11%), α -pineno (12,4%) e 1,8-cineol (10,5%)
<i>P. decandrum</i> [2]	<i>trans</i> - α -bergamoteno (47,7%)
<i>P. hebetatum</i> [3]	<i>p</i> -cimeno (35,8%- 38,9 %), <i>cis</i> - β -dihidroterpineol (10,0 %) limoneno (11,7 %), α -pineno (20,3 %)
<i>P. hebetatum</i> [4]	α -pineno (28,9-23,7%), <i>o</i> -cimeno (18,03-31,16%), limoneno (31,89-14,95%)
<i>P. heptaphyllum</i> [5]	<i>p</i> -cimeno (11,0%), terpinoleno (21,8%), <i>p</i> -cimen-8-ol (11,3%), dilapiol (16,1%)
<i>P. nitidifolium</i> [1]	<i>p</i> -cimeno (34,6%), α -pineno (30,5%), <i>p</i> -ment-3-eno (10,3%)
<i>P. paniculatum</i> var. <i>riedelianum</i> [1]	<i>p</i> -cimeno (33,8%), <i>p</i> -ment-3-eno (31,4%), β -felandreno (12,1%)
<i>P. paniculatum</i> var. <i>nova</i> [1]	α -terpinene (11,4%), <i>p</i> -cimeno (69,3%)
<i>P. spruceanum</i> [1]	β -felandreno (38,5%), <i>p</i> -cimeno (17,1%), α -pineno (13,7%), α -felandreno (13,1%)
<i>P. sprucenum</i> [6]	camphor (14,5%), <i>epi</i> - α -cadinol (20,4%)
<i>P. spruceanum</i> [7]	sabineno (61,3%, 33,5%, 34,8%, 41,5%, 23,3%,

	48,7%), <i>p</i> -cimeno (12,0%), <i>cis</i> -sabineno (27,5%, 56,1%, 34,4%), camphor (16,2%), terpinen-4-ol (11,8%)
<i>P. spruceanum</i> [8]	limoneno (90,93%)
<i>P. strumosum</i> [1]	<i>p</i> -cimeno (27,4%), terpinoleno (22,4%), β -felandreno (17,4%), α -terpineol (12,3%), <i>p</i> -cimeno-8-ol (11,4%)

[1]= RAMOS et al. 2000; [2]= CARVALHO et al. 2010; [3]= PINTO et al. 2010; [4]= LIMA et al. 2016; [5]= SIANI et al. 1999; [6]= (ZOGHBI et al. 2002); [7]= MACHADO et al. 2003; [8]= LIMA et al. 2014

Embora tenha vários estudos com o gênero *Protium*, a literatura não registra investigações fitoquímicas e biológicas com a espécie *Protium puncticulatum*, sendo, portanto o primeiro estudo de investigação com a referente espécie.

2.3. Atividade antifúngica

Atualmente as infecções fúngicas nos seres humanos, tem se tornado um importante problema de saúde pública, devido ao crescente aumento na ocorrência de casos de mortalidade e de complicações resultantes dos tratamentos convencionais, como as múltiplas resistências aos medicamentos antifúngicos e a reincidência das infecções (HAMDAN e HAHN, 2006; DAWSON et al. 2012).

Os indivíduos com sistema imunológico comprometido, na maioria das vezes pacientes imunodeprimidos ou que estejam em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) com doenças variadas, são os principais alvos dessas infecções debilitantes e potencialmente fatais que são chamadas de infecções oportunistas (HAY, 2006; BROWN et al. 2012). Entre as infecções fúngicas oportunista, a candidíase é a mais comum e tem como principal agente causador a infecção por *Candida albicans*, mas outras espécies de leveduras do gênero *Candida* também são responsáveis por ocasionar candidíase (TORTORA et al. 2005). As leveduras *Cryptococcus gattii* e *Cryptococcus neoformans* são os agentes causadores da criptococose, uma infecção fúngica sistêmica que agride o sistema nervoso central, causando a meningite (SUN et al. 2014; CHANG et al. 2015).

O interesse por novas substâncias químicas com atividades antimicrobianas vem crescendo consideravelmente por consequência dos problemas atuais relacionados ao uso irracional de antibióticos e a resistência dos microrganismos às drogas disponíveis. No meio de diversas classes químicas relatadas na literatura, as lignanas estão entre as substâncias que apresentam uma variedade de atividades biológicas, a exemplo o potencial antifúngico, como demonstrado nos estudos realizados por Gertsch et al. (2003), que testou as lignanas justicidina B e piscatorina, obtendo inibição no crescimento dos microrganismos de *Candida*

albicans, *Aspergillus fumigatus* e *A. flavus*. A levedura de *Cryptococcus neoformans* foi resistente para justicidina.

A atividade antifúngica das lignanas: (+)-pinoresinol e lariciresinol também foram comprovadas, contra *Candida albicans*, *Trichosporon beigellii* e *Malassezia furfur* (HWANG et al. 2010; HWANG et al. 2011). Em estudos realizados por Panagouleas et al. (2003), observou-se atividades antifúngicas para lignana (-)-matairesinol, contra leveduras do gêneros de *Aspergillus*, *Penicillium* e *Cladosporium*.

A atividade inibidora de magnolol (neolignanas) também é reportada na literatura contra *Candida albicans* e outras espécies de *Candida*, além das leveduras de *Cryptococcus neoformans* e *Aspergillus niger* (BANG et al. 2000; SUN et al. 2015; ZHOU et. al 2017).

Considerando o potencial biológico das lignanas e o crescente interesse por substâncias naturais com princípios ativos mais eficazes, motivado pelo surgimento da resistência dos microrganismos aos fármacos atuais, é que um dos focos do trabalho foi investigar a atividade antifúngica das substâncias pertencente à classe das lignanas provenientes dos resíduos madeireiros frente às cepas de *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* e *gattii*.

3. OBJETIVOS

3. Objetivos

3.1 Geral

- ✓ Realizar estudos químicos com resíduos madeiros de *Protium puncticulatum* Macbr. (Burseraceae) avaliando as atividades antifúngicas frente às substâncias isoladas.

3.2 Específicos

- ✓ Extrair e isolar fitoquimicamente as substâncias químicas de *P. puncticulatum*, através de métodos de extração e cromatografia clássica;
- ✓ Identificar e/ou elucidar as estruturas químicas dos constituintes desta espécie, através de técnicas espectroscópicas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN);
- ✓ Realizar ensaio antifúngico com substâncias oriundas dos resíduos madeiros de *P. puncticulatum*;
- ✓ Agregar importância aos resíduos madeiros descartados, através de conhecimentos científicos.

4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

4.1. Materiais utilizados

4.1.1 – Solventes

✓ **Comerciais:** Nas análises cromatográficas foram utilizados solventes comerciais (hexano, diclorometano, acetato de etila, acetona e metanol) destilados no LQPN-INPA.

✓ **Deuterados:** Para a obtenção dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear utilizou-se solventes deuterados (Metanol, clorofórmio, acetona e piridina) da marca Sigma Aldrich.

✓ **Grau HPLC:** Para a análise da Espectrometria de Massas foi utilizado os solventes com grau de pureza HPLC (Acetonitrila, metanol e isopropanol).

4.1.2 – Na Cromatografia Clássica

✓ **Cromatografia em Coluna (CC)** – Para os fracionamentos dos extratos e frações foram utilizadas colunas de vidro com dimensões que variavam entre $\varnothing = 0,5-3,5$ cm e altura = 40-100 cm, a escolha dependia da quantidade da amostra à ser fracionada.

✓ **Suportes para Cromatografia em Coluna** – Sílica gel 60 (70-230 mesh, 230-400 mesh) - Merck; Sephadex LH-20 - Sigma-Aldrich e celulose microcristalina - Merck.

✓ **Cromatografia em Camada Delgada (CCD)** – Foram utilizadas cromatofolhas de alumínio com sílica gel 60, indicador de fluorescência F_{254} e 0,2 mm de espessura da Merck.

4.1.3 – Reveladores empregados em CCD

- ✓ **Físicos:** Câmara de luz ultravioleta com irradiação de luz no comprimento de onda de 254 e 365 nm.
- ✓ **Químicos:** Vanilina sulfúrica, anisaldeído sulfúrico, vapores de iodo e cloreto férrico.

4.2. Equipamentos e acessórios

- ✓ **Balança Analítica** – Tecnal, modelo B TEC, com capacidade até 210g.
- ✓ **Chapa de aquecimento** – Fisatom, modelo 753A.
- ✓ **Moinho** – Marconi, macro moinho tipo Wiley modelo MA-340.
- ✓ **Evaporador rotativo** – Buchi, modelo Rotavapor R-3 acoplado a um banho ultratermostatizado Marconi, modelo MA-184.
- ✓ **Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear** – Os espectros de RMN foram obtidos em espectrômetros da Bruker, Fourier-300 (300 MHz - ^1H e 75 MHz - ^{13}C) da CA-LTQPN do INPA.

4.3. Obtenção do material vegetal

Os resíduos madeiros (Figura 3) foram fornecidos pelo Laboratório de Tecnologia da Madeira - LTM do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA, no âmbito do projeto Madeiras da Amazônia. A identificação dos resíduos foi realizada por comparações das características macroscópica com padrões das espécies disponíveis na Xiloteca do Laboratório de Tecnologia da Madeira (COTI-INPA). Os resíduos de *Protium puncticulatum* (breu-vermelho) foram obtidos da sobra da manufatura de pequenos objetos de madeira.

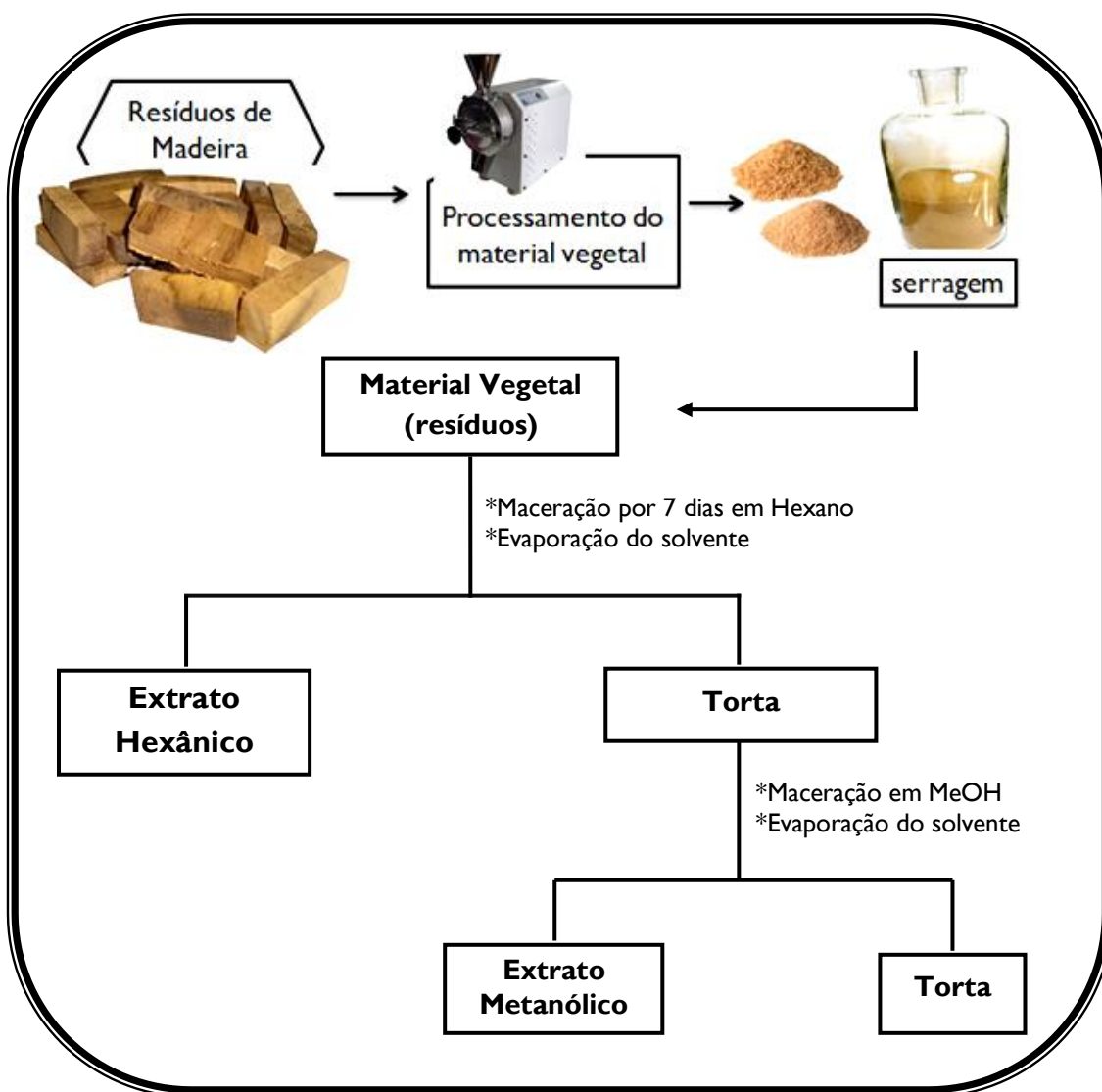


Fonte: arquivo pessoal

Figura 3. Resíduos de *Protium puncticulatum* fornecidos pelo LTM

4.4. Processamento dos resíduos, preparação dos extratos e análises preliminares.

Os resíduos gráudos foram cortados em pedaços menores e posteriormente pulverizados em moinho de faca. Após este procedimento, o material moído foi pesado e submetido à maceração a frio, com extrações em hexano seguido por metanol, cada solvente permaneceu durante 7 dias, conforme demonstra o Esquema 2. Os extratos brutos foram obtidos por meio de evaporação dos solventes em evaporador rotativo, posteriormente tiveram suas massas determinadas e rendimentos calculados (Tabela 3).



Esquema 2. Preparação dos extratos brutos dos resíduos

Tabela 3. Massa obtida dos extratos em hexano e metanol

Espécie	Massa do Resíduo (g)	Extratos		Rendimentos (%)
		Código	Massa (g)	
<i>Protium puncticulatum</i>	612,23	PPH	0,22	0,03
		PPM	7,35	1,20

Códigos finalizados com H → extratos hexânicos; Códigos finalizados com M → extratos metanólicos

4.5. Análise dos Extratos de *Protium puncticulatum*

Os extratos brutos foram submetidos à análises preliminares de comparações por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) com padrões de substâncias que são muito frequentes em plantas como: amirina, lupeol e β -sitosterol, utilizando-se Hex/AcOEt (9:1) como sistema de eluição (Figura 4).

Vanilina-Hex:AcOEt (9:1)

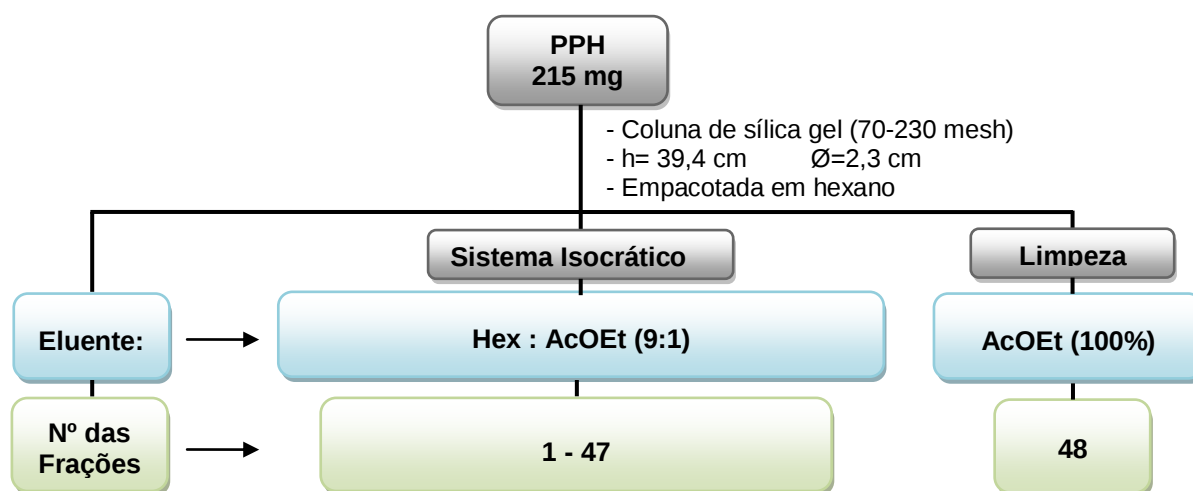


Figura 4. Placa de CCD dos extratos brutos de PPH e PPM com padrões de substâncias conhecidas

Após as avaliações em cromatografia de camada delgada - CCD (Figura 4), o extrato hexânico (PPH) foi inicialmente considerado o mais promissor para começar os fracionamentos cromatográficos por apresentar menor quantidade de pigmento e por exibir grande similaridade com os padrões utilizados.

4.5.1 Fracionamento cromatográfico do extrato hexânico de *P. puncticulatum* (PPH)

O extrato hexânico PPH (215 mg) foi submetido a fracionamento por cromatografia em coluna com gel de sílica 60 (70-230 mesh), eluída em sistema isocrático com Hexano:Acetato de Etila na proporção de (9:1) (Esquema 3). Originou-se 48 frações que foram reunidas por similaridade através de cromatografia em camada delgada (CCD) em 13 novas frações (Tabela 4). As frações mais promissoras, PPH-23 e PPH-38 foram submetidas à análise por RMN permitindo a identificação de mistura de substâncias **1-3** (PPH-23) e **4-5** (PPH-38).



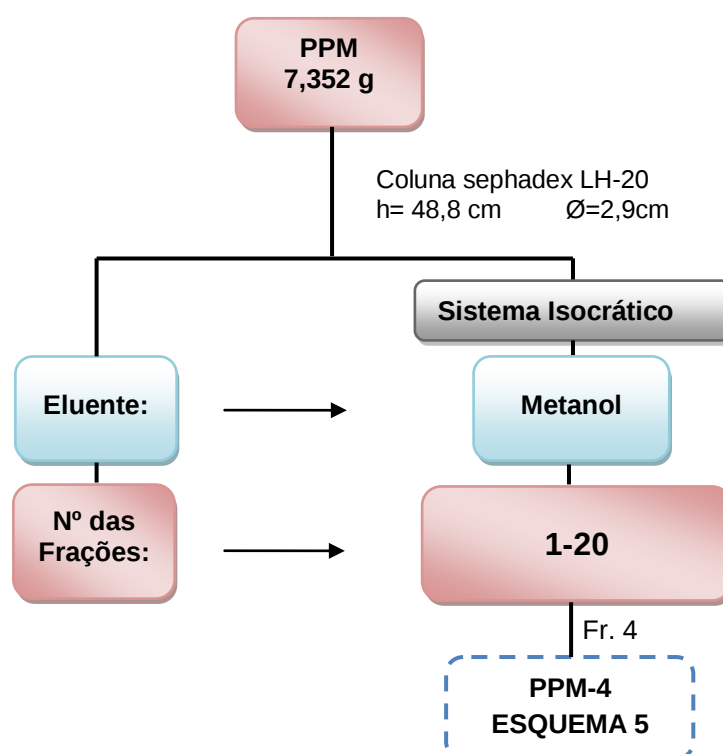
Esquema 3. Fracionamento cromatográfico de PPH

Tabela 4. Reunião das frações obtidas de PPH

Frações Reunidas	Código	Massa (mg)	
1-3	PPH-1	0,8	
4-5	PPH-4	1,1	
6-9	PPH-6	10,7	
10-14	PPH-10	26,5	
15-17	PPH-15	11,8	
18	PPH-18	0,5	
19-22	PPH-19	13,6	
23-37	PPH-23	9,1	Substâncias 1,2 e 3
38-39	PPH-38	22,1	
40-44	PPH-40	15,6	
45-47	PPH-46	8,8	
48	PPH-48	41,1	

4.5.2 Fracionamento cromatográfico do extrato metanólico de *P. puncticulatum* (PPM)

O extrato metanólico PPM (7,352 g) foi inicialmente submetido a fracionamento por cromatografia de exclusão em coluna com Sephadex LH-20 para remoção dos pigmentos e taninos, foi eluída em sistema isocrático com metanol da qual se obteve 20 frações (Esquema 4). Os dados estão mostrados na Tabela 5.



Esquema 4. Fracionamento cromatográfico de PPM

Tabela 5. Reunião das frações obtidas de PPM

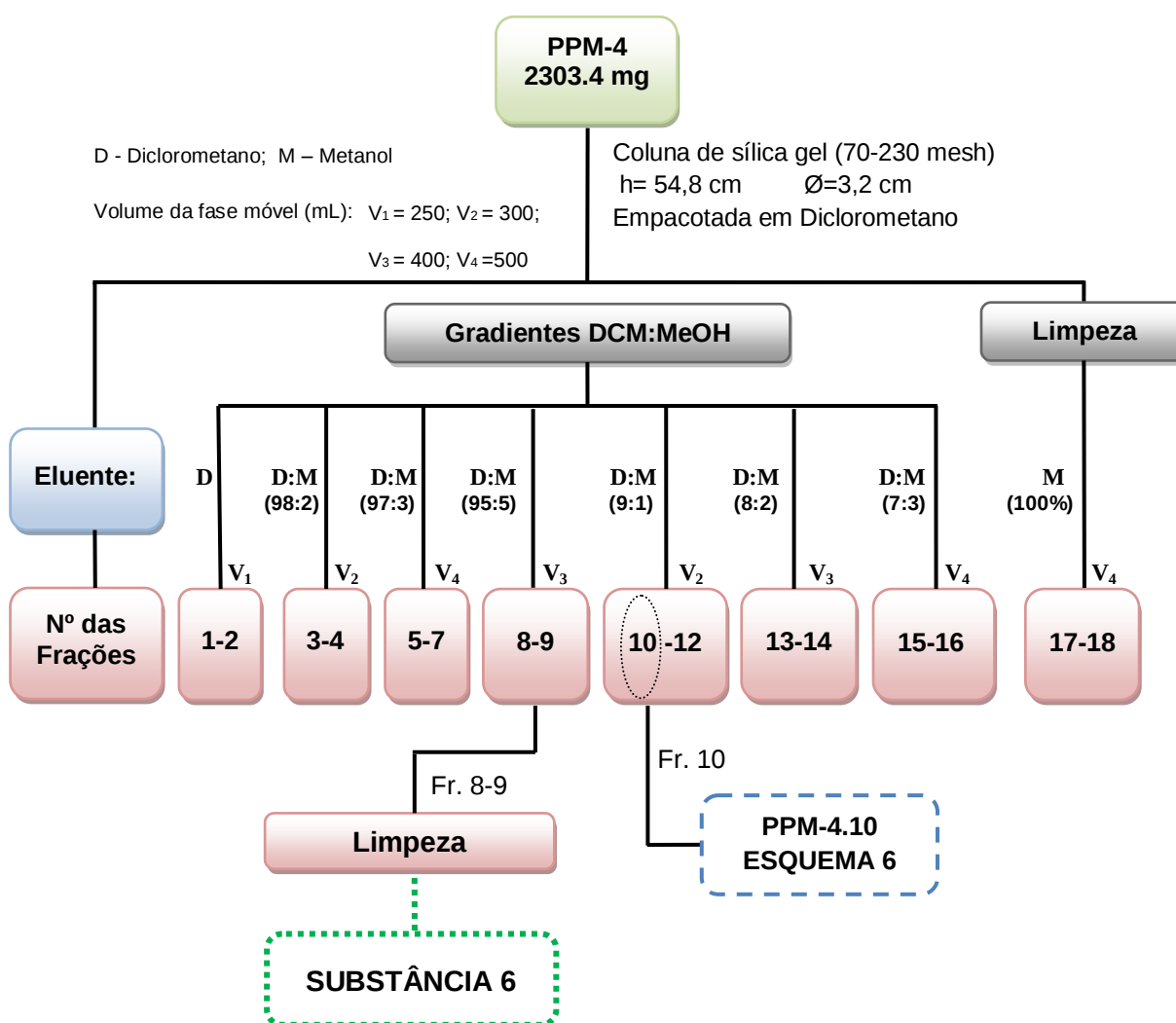
Frações Reunidas	Códigos	Massa (mg)
1-2	PPM-1	270
3	PPM-3	1109,0
4	PPM-4	2303,4
5	PPM-5	671,2
6	PPM-6	176,5
*7-20		

Sílica gel
(70-230 mesh)

ESQUEMA 5

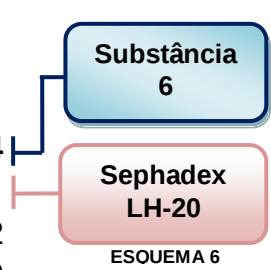
*Não observadas em CCD por motivo de solubilidade

A fração **PPM-4** de massa marrom-avermelhado passou por outro fracionamento cromatográfico (Esquema 5), pois em CCD mostrou-se a mais promissora, devido a absorção intensa no UV 365 nm e quando revelada em vanilina sulfúrica apresentou mistura de cores rosa, cinza e laranja. Esta fração com 2,303 mg foi submetida a fracionamento em coluna de sílica gel (70-230 mesh) ($\varnothing_{\text{int}} = 3,2$ cm e $h_{\text{sílica}} = 54,8$ cm), empacotada em DCM e inicialmente foi eluída com DCM, seguido por gradientes de DCM:MeOH e finalizado em MeOH. O fracionamento resultou em 18 frações e a frações 8-9 reunidas, contendo material sólido foi codificada como **PPM-4.8** que após limpeza com metanol (sonicador) forneceu a substância **6** (124,4 mg). Os dados do fracionamento estão mostrados na Tabela 6.

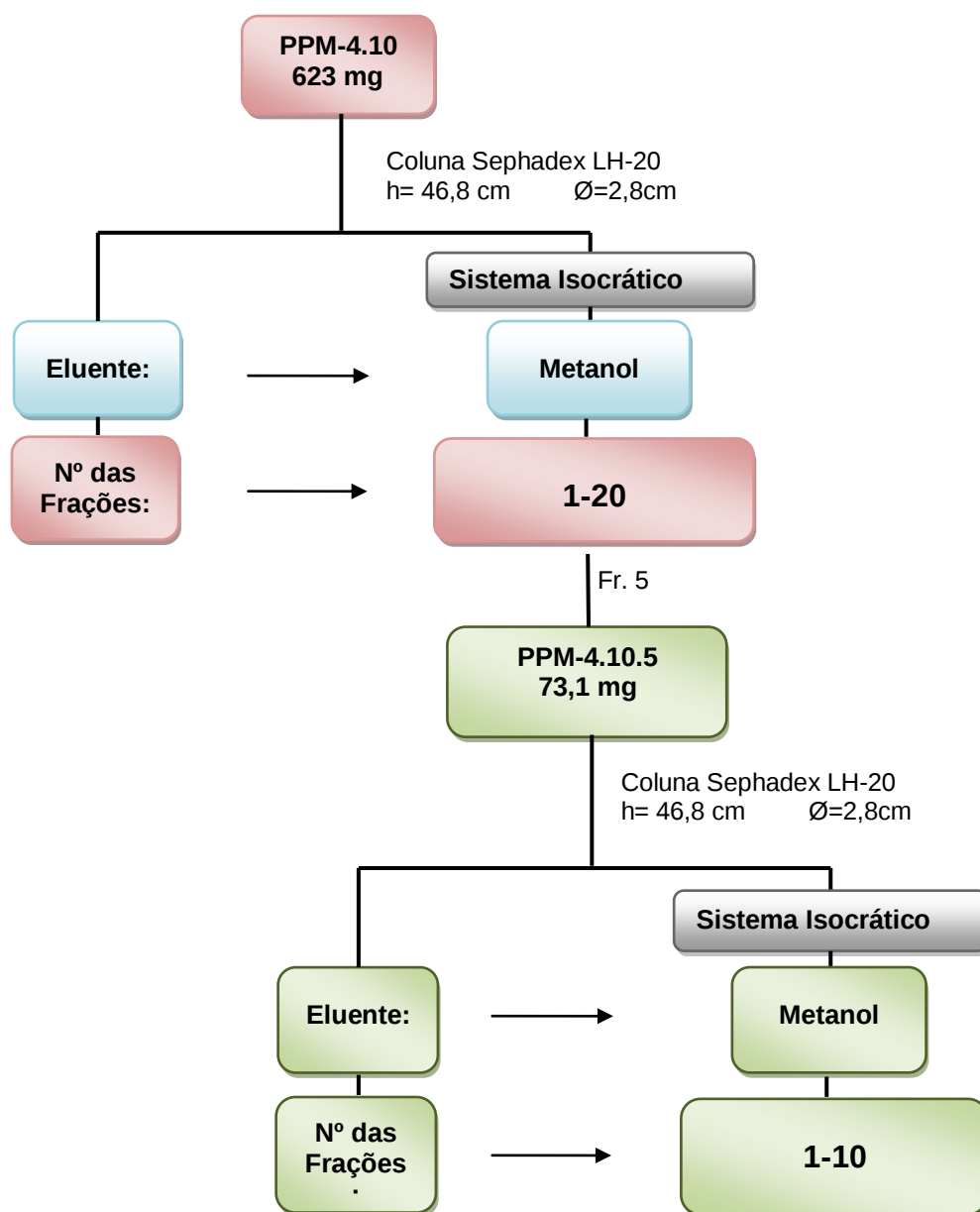


Esquema 5. Fracionamento cromatográfico de PPM-4

Tabela 6. Reunião das frações obtidas de PPM-4

Frações Reunidas	Códigos	Massa (mg)	
1-3	PPM-4.1	13,1	
4	PPM-4.4	29	
5-6	PPM-4.5	71,4	
7	PPM-4.7	73,8	
8-9	PPM-4.8	124,4	
10	PPM-4.10	623	
11	PPM-4.11	349,2	
12	PPM-4.12	107,2	
13	PPM-4.13	96,8	
14-15	PPM-4.14	74,3	
16	PPM-4.16	43	
17	PPM-4.17	68,6	
18	PPM-4.18	161,7	

A fração **PPM-4.10** (623 mg) foi submetida a um novo fracionamento (Esquema 6) por apresentar maior quantidade de massa e por exibir intensa absorção na luz UV (254 e 365 nm) e também por expor uma mistura complexa de cores rosa, roxo, laranja e amarelo com diferentes Rf's, quando revelada em vanilina sulfúrica. Esse material foi submetido a fracionamento em coluna de Sephadex LH-20, eluída com metanol, dando origem a 8 frações (Tabela 7) sendo a fração 5, (**PPM-4.10.5**; 73,1 mg), submetida a novo fracionamento (Esquema 6) em coluna de Sephadex LH-20 nas mesmas condições do fracionamento anterior, originando 10 novas frações que foram reunidas por similaridade (Tabela 8). Desta as frações 7-9 (PPM 4.10.5.7; 60 mg) fracionadas em coluna de sílica gel 60 (esquema x), eluída com DCM, DCM:AcOEt (98:2 → 8:2) e DCM:AcOEt (97:3 → 7:3, finalizado em metanol, fornecendo na fração 6, a substância **7** (**PPM-4.10.5.7.6**; 10 mg) após tratamento em metanol.



Esquema 6. Fracionamento cromatográfico de PPM-4.10 e PPM-4.10.5

Tabela 7. Reunião das frações obtidas de PPM-4.10

Frações Reunidas	Códigos	Massa (mg)	
1-2	PPM-4.10.1	9,9	
3	PPM-4.10.3	4,5	
4	PPM-4.10.4	4	
5	PPM-4.10.5	73,1	Sephadex LH-20 ESQUEMA 6
6	PPM-4.10.6	156,4	
7-8	PPM-4.10.7	369,4	

Tabela 8. Reunião das frações obtidas de PPM-4.10.5

Frações Reunidas	Códigos	Massa (mg)	
1	PPM-4.10.5.1	0,5	
2	PPM-4.10.5.2	1,0	
3	PPM-4.10.5.3	1,7	
4-5	PPM-4.10.5.5	3,3	
6	PPM-4.10.5.6	3,4	
7-9	PPM-4.10.5.7	60,0	Sílica gel (230-400 mesh) ESQUEMA 7
10	PPM-4.10.5.10	3,2	

Esquema 7. Fracionamento cromatográfico de PPM-4.10.5.7

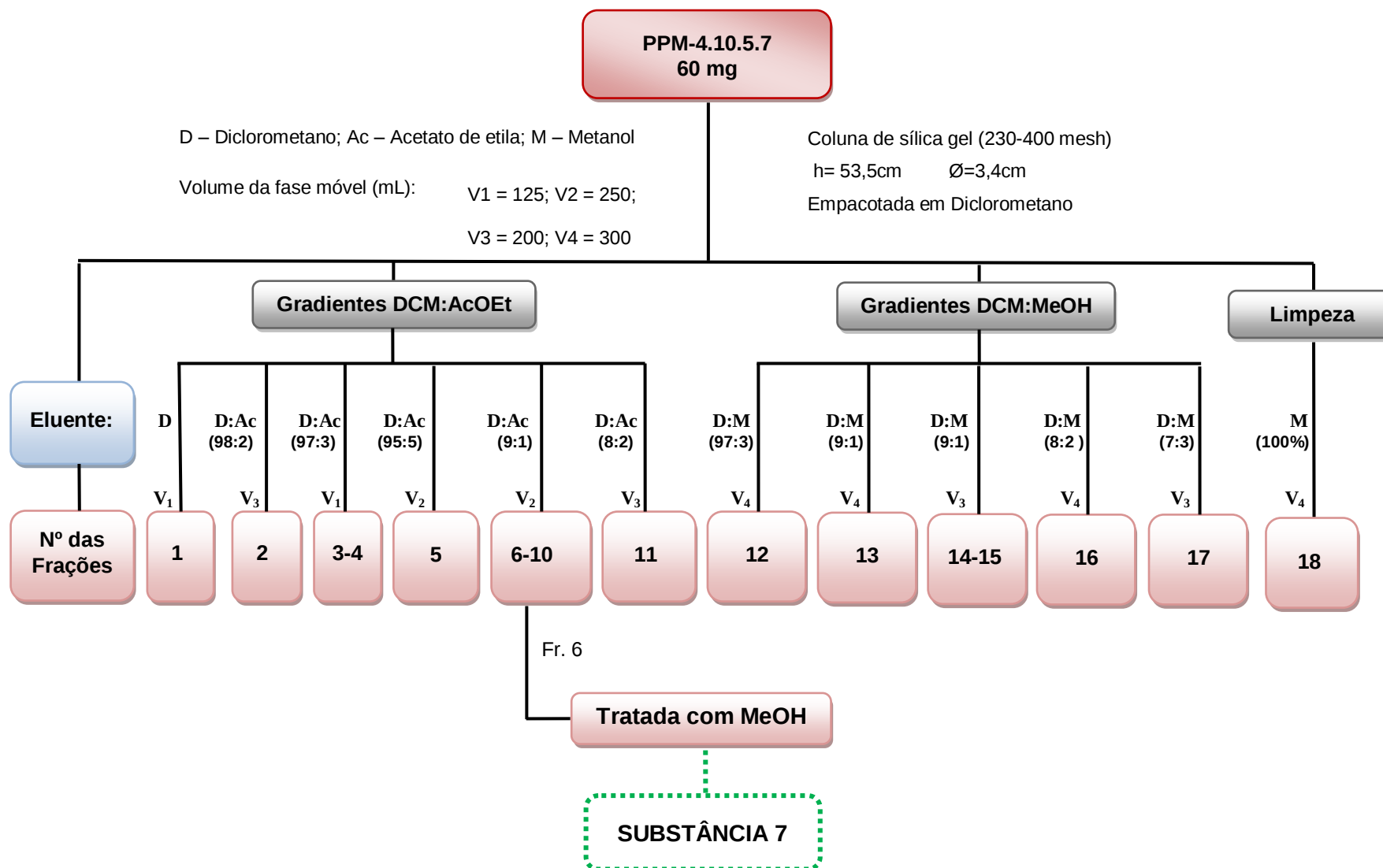


Tabela 9. Reunião das frações obtidas de PPM-4.10.5.7

Frações Reunidas	Códigos	Massa (mg)
1-2	PPM-4.10.5.7.1	2,6
3	PPM-4.10.5.7.3	0,2
4	PPM-4.10.5.7.4	3,0
5	PPM-4.10.5.7.5	2,7
6	PPM-4.10.5.7.6	10
7	PPM-4.10.5.7.7	2,6
8-10	PPM-4.10.5.7.8	8,7
11	PPM-4.10.5.7.11	1,9
12	PPM-4.10.5.7.12	4,5
13-14	PPM-4.10.5.7.13	4,7
15	PPM-4.10.5.7.15	1,8
16-17	PPM-4.10.5.7.16	10,1
18	PPM-4.10.5.7.18	6,5

Substância
7

4.6. Ensaio antifúngico

4.6.1 Cepas testadas e preparação dos inóculos fúngicos

Para os testes de atividade antifúngica, foram utilizadas cepas padrão da *American Type Culture Collection* (ATCC), mantidas na Coleção de Microrganismos de interesse médico do INPA. Na Tabela 10 encontramos as cepas fúngicas utilizadas nos testes.

Tabela 10. Cepas de fungos utilizadas nos testes

Tipo de fungo	Espécie	Cepas
Levedura	<i>Cryptococcus neoformans</i>	ATCC 90112
	<i>Cryptococcus gattii</i>	ATCC 32269
	<i>Candida albicans</i>	ATCC 60193

O cultivo das culturas de fungos foi feito em meio ágar Sabouraud Dextrose e as cepas selecionadas (Tabela 10) passaram por repiques para posteriormente serem utilizadas na preparação dos inóculos fúngicos, as quais seguiram as recomendações do protocolo M27-A3 da *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (2008). As células foram submetidas ao processo de suspensão em 5 mL de solução salina esterilizada à 0,85%. Posteriormente, foram quantificadas em câmara de Neubauer através da leitura no microscópio óptico e, por fim, foram realizadas diluições da suspensão-padrão da levedura com meio líquido RPMI 1640 para obter uma concentração final de $2,5 \times 10^3$ células/mL.

4.6.2. Realização do teste de microdiluição em caldo

O ensaio de sensibilidade antifúngica foi realizado no Laboratório de Micologia do INPA, com base na técnica de microdiluição em caldo - protocolo M27-A3, determinada pela CLSI (2008).

Inicialmente foram preparados os inóculos de *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* numa concentração final de aproximadamente $2,5 \times 10^3$ células/mL como descrito no item anterior. As substâncias testadas como agente antifúngico (7-oxo-parabenzolactona e 7'-hidroxi-9 α -metilcubebina) isoladas dos resíduos de madeira de *P. puncticulatum* passaram por diluições seriadas, partindo-se de uma concentração de 320 μ g/mL em microplaca de 96 poços, com posterior incubação a 35 °C durante 24h para *C.albicans* e 72h para *C. neofarmans* e *C. gattii*. Após esse período, realizou-se a leitura macroscópica da placa para avaliar a concentração inibitória mínima (CIM) das substâncias, considerando o score à 100% de inibição. A leitura foi realizada comparando os poços do controle positivo (Inóculo fúngico + meio de cultivo RPMI) e os poços contendo as substâncias testadas. A anfotericina B foi utilizada como droga controle de sensibilidade para os três tipos de fungos e os testes foram realizados em duplicata (CLSI, 2008).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Determinação estrutural em mistura das substâncias isoladas do extrato hexânico em *P. puncticulatum*

5.1.1. Identificação dos constituintes químicos da fração PPH-23

A fração PPH-23 (9 mg) apresentou-se como sólido branco, mostrando em CCD similaridade de $R_f=0,4$ com os constituintes das amostras usadas como padrão (lupeol e mistura de α e β -amirina), utilizando-se Hex/AcOEt (9:1) como sistema de eluição (Figura 5).

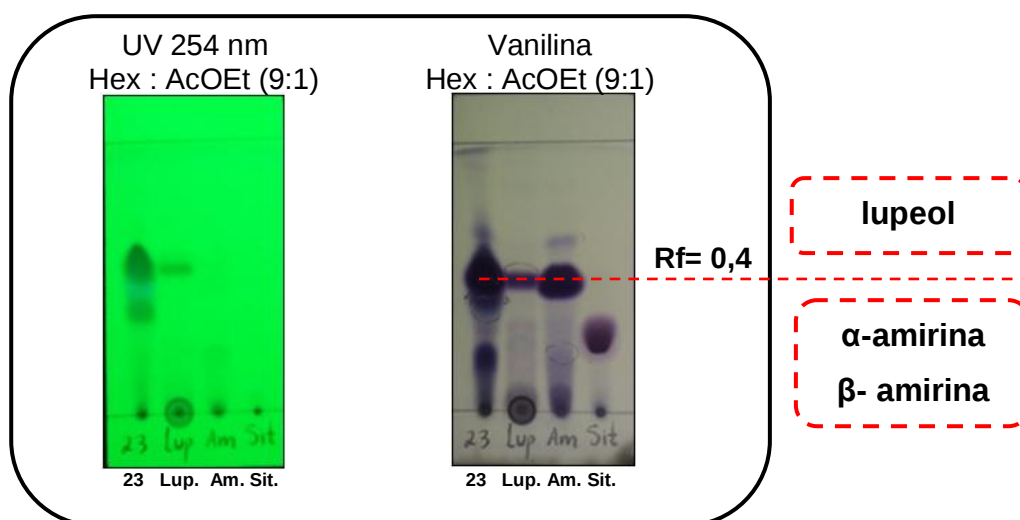


Figura 5. Placa de CCD da fração de PPH-23 com padrões de lupeol, α e β -amirina

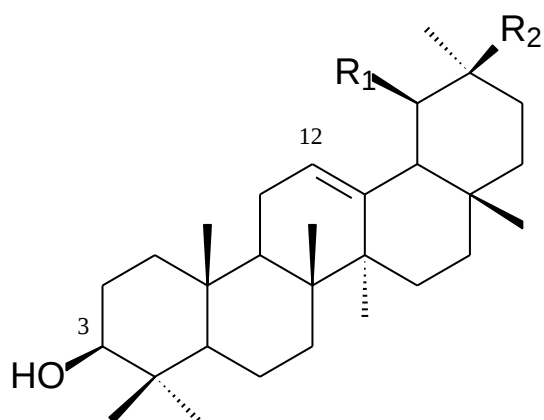
O sólido da fração PPH-23 (9 mg) foi submetido à experimentos de Ressonância Magnética Nuclear: RMN ^1H , ^{13}C , Dept -135° e HSQC. O espectro de RMN ^1H (Tabela 11, Figura 7-10), mostrou os sinais característicos dos triterpenos sugeridos em CCD devido à presença de vários sinais dos hidrogênios metílicos na região entre δ 0,79 - 1,61, hidrogênios olefínicos em δ 5,13 (t , $J = 3,66$ Hz) e δ 5,19 (t , $J = 3,57$ Hz) de H-12 da mistura de α - e β -amirina (substâncias **1** e **2**, Figura 6), além dos hidrogênios vinílicos de dupla terminal (H-29) em δ 4,57 e 4,69 do lupeol (substância **3**, Figura 6). O deslocamento químico correspondente aos hidrogênios

carbinólicos da posição H-3, comum aos três triterpenos foram observados em δ 3,22 (*dd*, $J=10,77$ e $5,00$ Hz) para α - e β -amirina, enquanto que no lupeol o sinal foi detectado em δ 3,18 com área de difícil interpretação de multiplicidade. No experimento HSQC (Figura 13) os sinais dos hidrogênios carbinólicos correlacionaram com os carbonos em δ 79,05, 79,04 e 78,84, respectivamente.

A análise do espectro de RMN ^{13}C (Tabela 12, Figura 11) e Dept -135° (Figura 12) confirma a ocorrência dos três triterpenos devido à presença de sinais característicos dessas substâncias. Para os carbonos olefínicos de α -amirina (**1**) foram evidenciados os sinais típicos em δ 124,40 (C-12) e 139,55 (C-13), para β -amirina (**2**) foram observados sinais em δ 121,71 (C-12) e 145,19 (C-13) enquanto que para o lupeol (**3**) os sinais foram encontrados em δ 150,95 (C-20) e 109,32 (C-29).

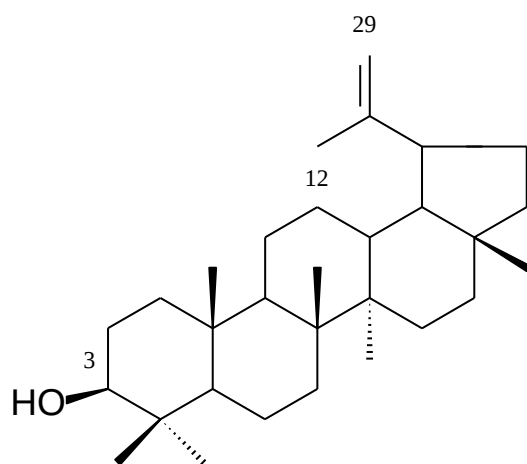
Com base nas intensidades dos sinais de RMN de ^1H e ^{13}C , infere-se que a ordem de predominância na mistura triterpênica é de que a substância α -amirina (**1**) está em maior abundância, seguida por β -amirina (**2**) e lupeol (**3**).

A mistura dos triterpenos α -amirina (esqueleto ursano) e β -amirina (esqueleto oleanano) (Figura 6) tem sido muito relatada em espécies de *Protium* da região amazônica, principalmente nas resinas (MAIA et al. 2000; SUSUNAGA et al. 2001; BANDEIRA et al. 2002; OLIVEIRA et al. 2004; CHAVES et al. 2005; LIMA et al. 2005; SILVA et al. 2009; HAMERSKI et al. 2011; ALMEIDA et al. 2015;), mas também ocorre em folhas (LIMA et al. 2004; GUIMARÃES e SIANI 2007) e galhos (LIMA et al. 2004). Esse é o primeiro registro dos triterpenos em madeira do gênero.



(1) α -amirina ($R_1=CH_3$; $R_2=H$)

(2) β -amirina ($R_1=H$; $R_2=CH_3$)



(3) Lupeol

Figura 6. Mistura dos triterpenos **1**, **2** e **3** identificados na fração PPH-23 de *P. puncticulatum*

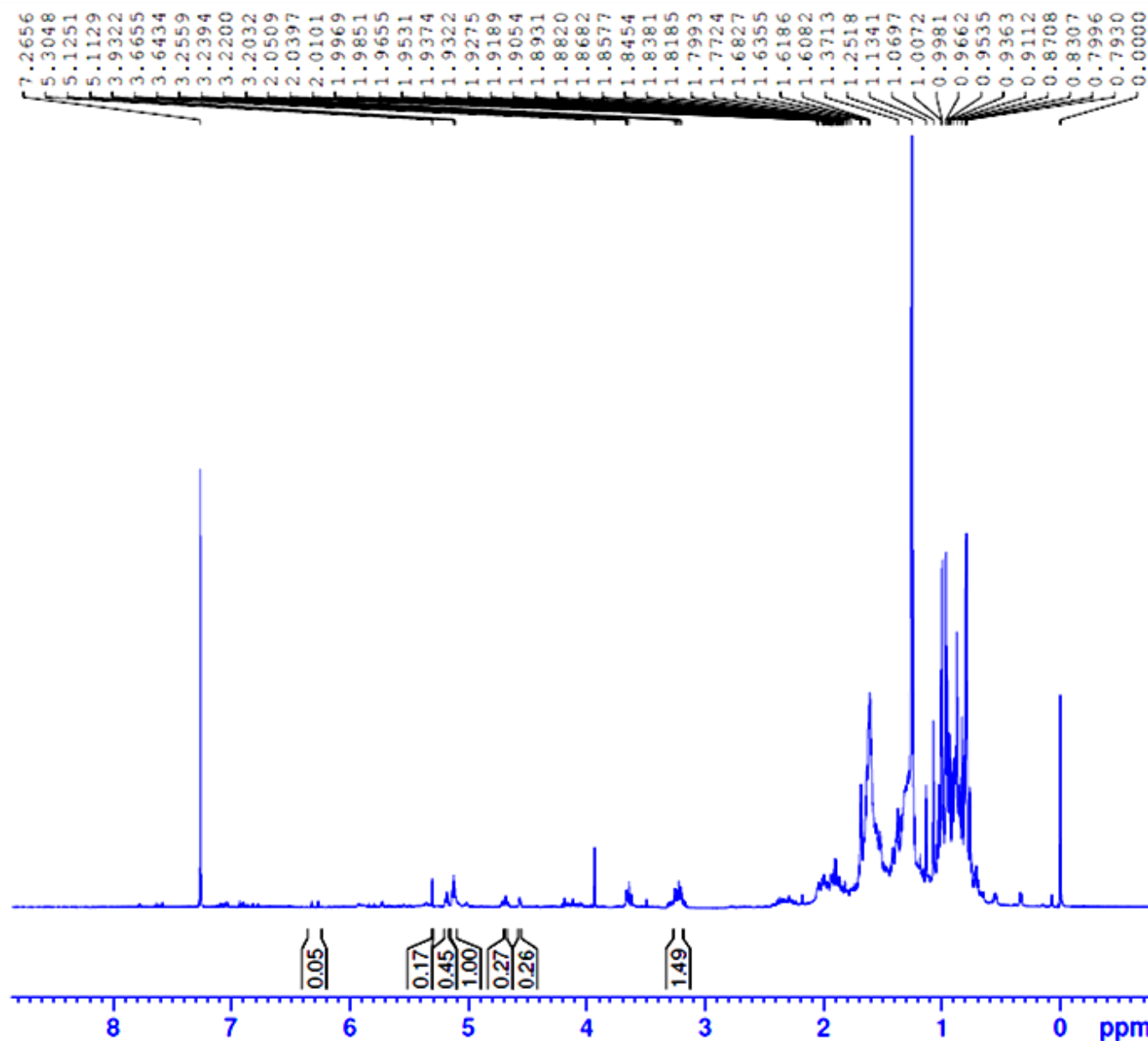
Tabela 11. Dados dos hidrogênios olefínicos e carbinólicos dos constituintes **1**, **2** e **3** da fração PPH-23

H	α -amirina (1)	β -amirina (2)	lupeol (3)
3	3,22 <i>dd</i> (J=10,77 e 5,00 Hz)	3,22 <i>dd</i> (J=10,77 e 5,00 Hz)	3,18*
12	5,13 <i>t</i> (J = 3,66 Hz)	5,19 <i>t</i> (J = 3,57 Hz)	
29			4,69 <i>d</i> (J=2,3 Hz; H-29a) 4,57 <i>dd</i> (J=2,3 e 1,2 Hz; H-29b)

*sobreposição

Tabela 12. Dados dos carbonos olefínicos e carbinólicos dos constituintes **1**, **2** e **3** da fração PPH-23

C	α -amirina (1)	β -amirina (2)	lupeol (3)
3	79,05	79,04	78,84
12	124,40	121,71	
13	139,55	145,19	
20			150,95
29			109,32



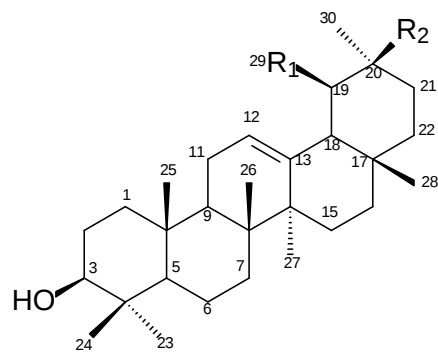
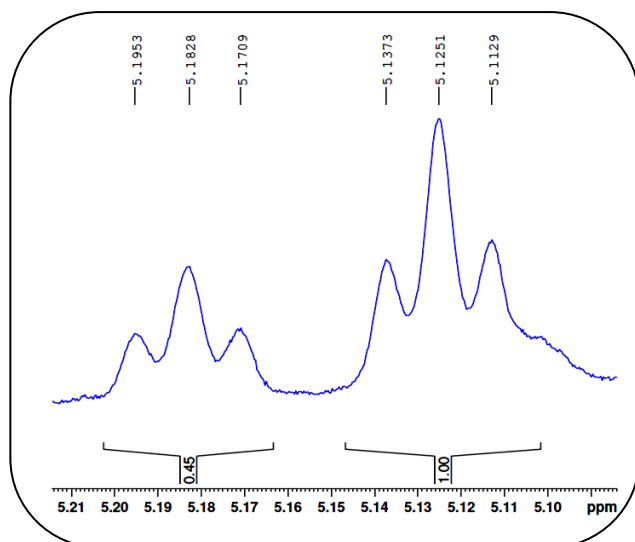
Current Data Parameters
 NAME Henrique_17_PPH-23
 EXPNO 1
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20170518
 Time 12.02
 INSTRUM FOURIER300
 PROBHD 5 mm DUL 13C-1
 PULPROG zg
 TD 65536
 SOLVENT CDCl3
 NS 64
 DS 0
 SWH 6103.516 Hz
 FIDRES 0.093132 Hz
 AQ 5.3687091 sec
 RG 10.3434
 DW 81.920 usec
 DE 10.00 usec
 TE 1015.1 K
 D1 1.00000000 sec
 TD0 1

===== CHANNEL f1 =====
 SFO1 300.2019513 MHz
 NUC1 1H
 P1 7.64 usec
 PLW1 20.00000000 W

F2 - Processing parameters
 SI 65536
 SF 300.2000012 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 0 Hz
 GB 0
 PC 1.00

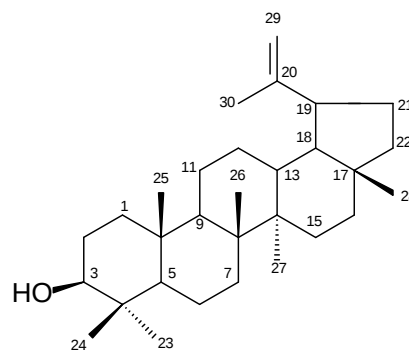
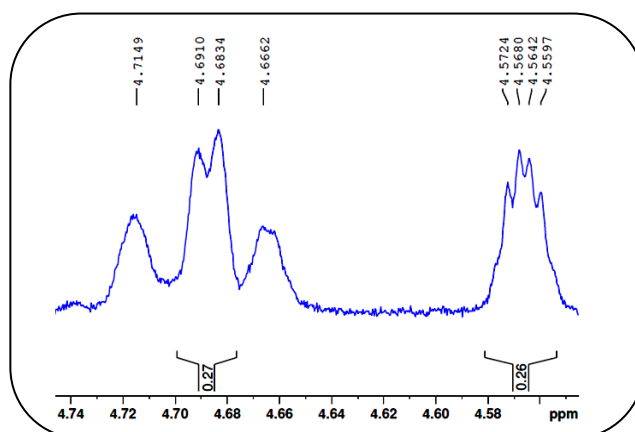
Figura 7. Espectro de RMN ^1H de PPH-23 (300 MHz, CDCl_3)



(1) α -amirina ($R_1 = \text{CH}_3$; $R_2 = \text{H}$)

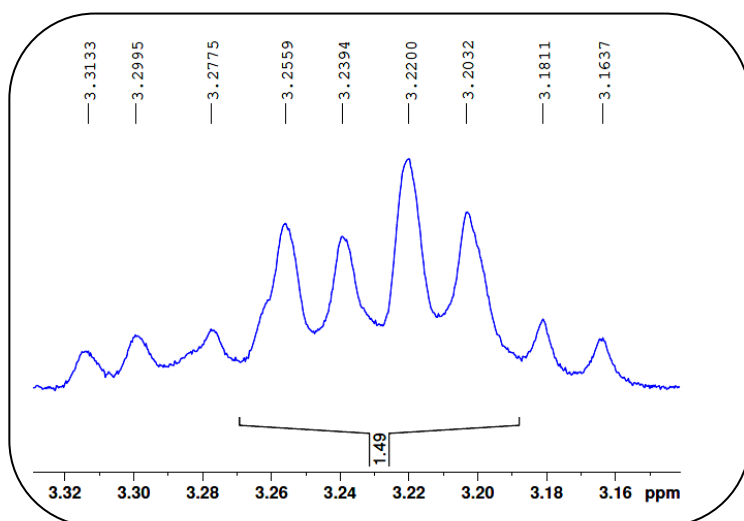
(2) β -amirina ($R_1 = \text{H}$; $R_2 = \text{CH}_3$)

Figura 8. Expansão dos sinais de H-olefínicos nas regiões de 5,19 a 4,57 ppm



(3) Lupeol

Figura 9. Expansão dos sinais de H-olefínicos nas regiões de 5,19 a 4,57 ppm



(1) α -amirina

(2) β -amirina

(3) Lupeol

Figura 10. Expansão dos sinais de H-carbinólicos nas regiões de 3,25 a 3,16 ppm



Current Data Parameters
 NAME Henrique_17_PPH-23
 EXPNO 2
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20170525
 Time 11:59
 INSTRUM FOURIER300
 PROBRD 5 mm DUL 13C-1
 PULPROG zgpg30
 TD 32768
 SOLVENT CDCl3
 NS 60880
 DS 0
 SWH 24414.063 Hz
 FIDRES 0.745058 Hz
 AQ 0.6710886 sec
 RG 501.187
 DW 20.480 usec
 DE 10.00 usec
 TE 976.7 K
 D1 0.50000000 sec
 D11 0.03000000 sec
 D31 0.00000875 sec
 D40 0.01589210 sec
 L4 20
 L5 14
 P32 90.00 usec
 TD0 1

===== CHANNEL f1 =====
 SFO1 75.4928982 MHz
 NUC1 13C
 P1 8.75 usec
 P1W1 50.00299835 W

===== CHANNEL f2 =====
 SFO2 300.2012008 MHz
 NUC2 1H
 CPDPRG2 waltz16
 PCPD2 90.00 usec
 P1W2 20.00000000 W
 P1W12 0.16806000 W
 P1W13 0.13613001 W

F2 - Processing parameters
 S1 32768
 SF 75.4853500 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 1.00 Hz
 GB 0
 PC 1.40

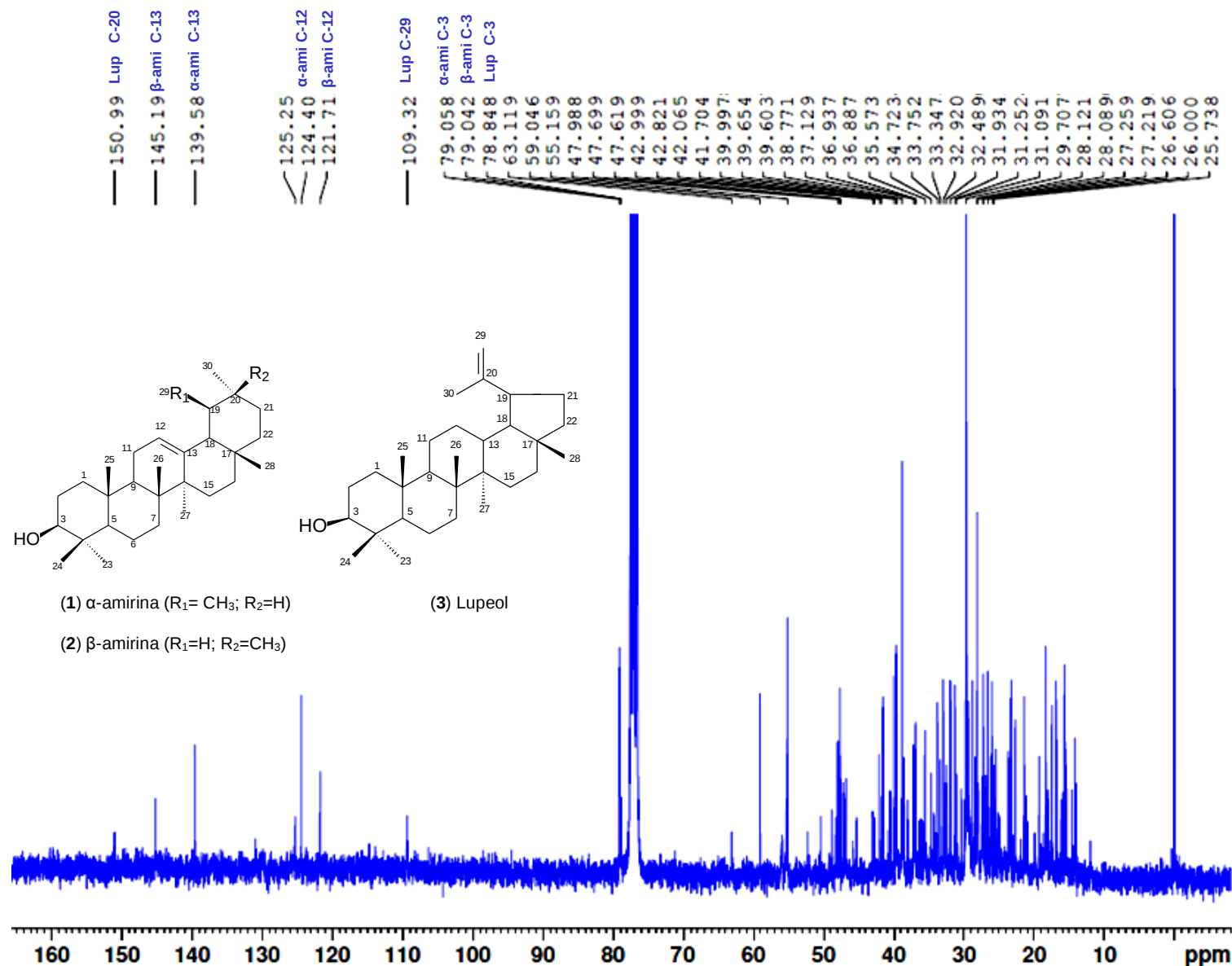
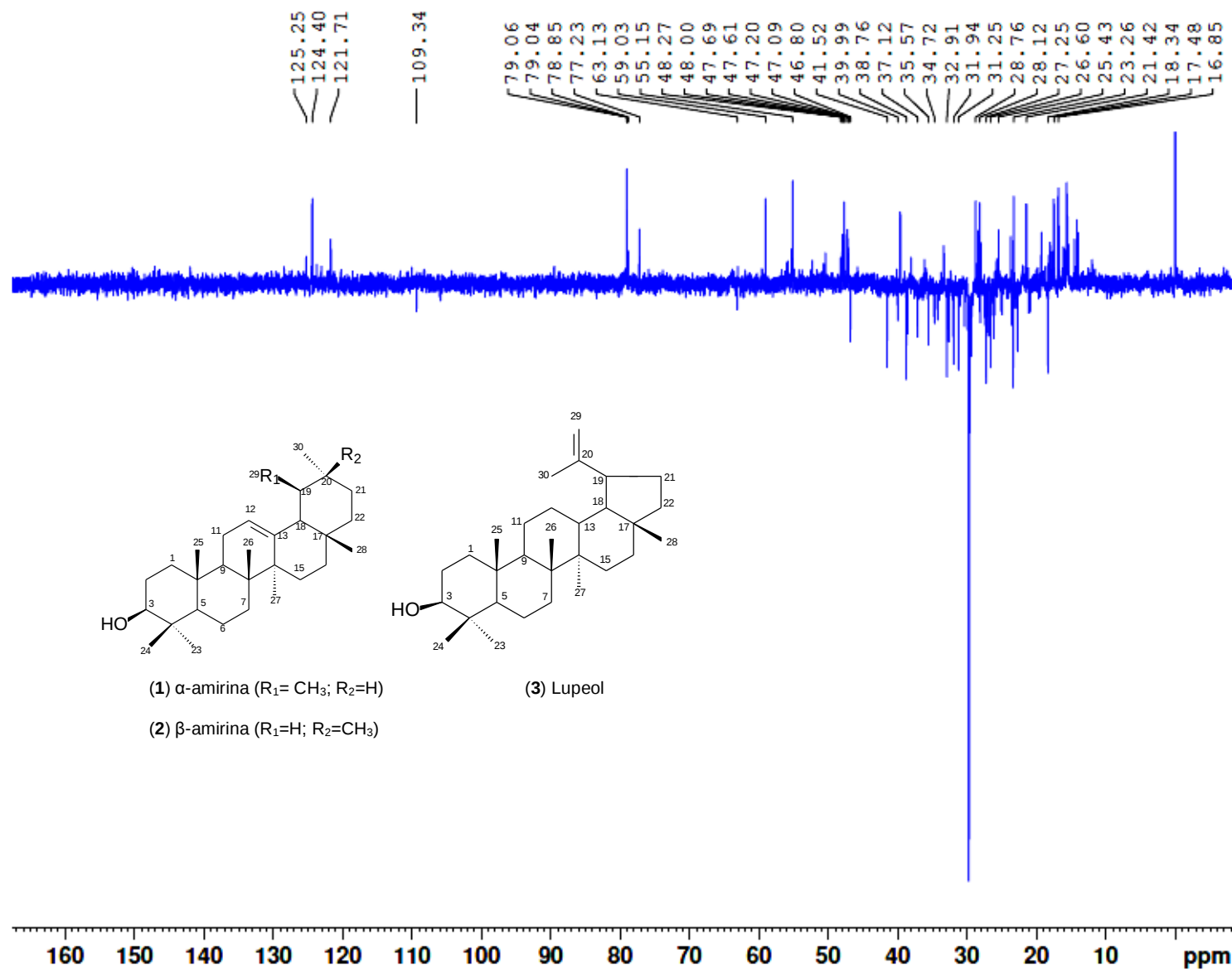


Figura 11. Espectro de RMN ^{13}C de PPH-23 (75 MHz, CDCl_3)

Figura 12. Espectro de Dept -135° de PPH-23 (75 MHz, CDCl₃)



Current Data Parameters
NAME Henrique_17_PPH-23
EXPNO 4
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20170601
Time 13.36
INSTRUM FOURIER300
PROBHD 5 mm DUL 13C-1
PULPROG dept135
TD 65536
SOLVENT CDCl3
NS 4329
DS 8
SWH 24414.063 Hz
FIDRES 0.372529 Hz
AQ 1.3421773 sec
RG 501.187
DW 20.480 usec
DE 10.00 usec
TE 430.2 K
CNST2 145.0000000
D1 2.00000000 sec
D2 0.00344828 sec
D14 0.00001114 sec
D33 0.00000825 sec
D34 0.00344053 sec
D35 0.00345340 sec
L4 40
P32 90.00 usec
TD0 1

===== CHANNEL f1 =====
SFO1 75.4913881 MHz
NUC1 13C
P1 8.75 usec
P2 17.50 usec
PLW1 50.00299835 W

===== CHANNEL f2 =====
SFO2 300.2009601 MHz
NUC2 1H
CPDPRG[2] waltz16
P3 8.25 usec
P4 16.50 usec
PCPD2 90.00 usec
PLW2 20.00000000 W
PLW12 0.16806000 W

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 75.4853500 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.00 Hz
GB 0
PC 1.40

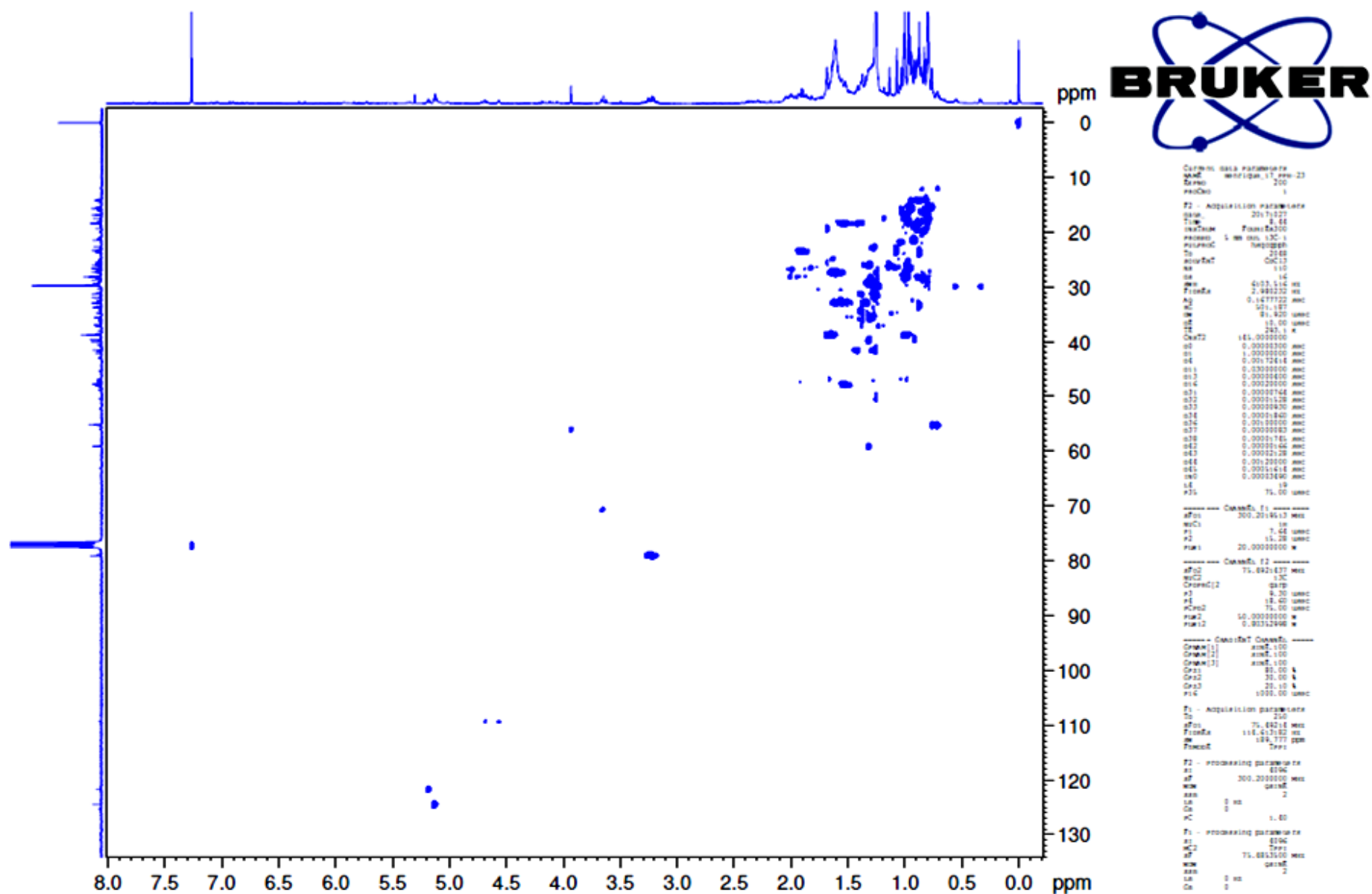


Figura 13. Mapa de contorno de HSQC de PPH-23 (75 MHz, CDCl_3)

5.1.2. Identificação dos constituintes químicos da fração PPH-38

A fração PPH-38 (22,1 mg) apresentou-se como sólido branco, e em placa de CCD, mostrou o mesmo ($R_f=0,2$) da amostra padrão de β -sitosterol, utilizando-se Hex/AcOEt (9:1) como sistema de eluição (Figura 11).

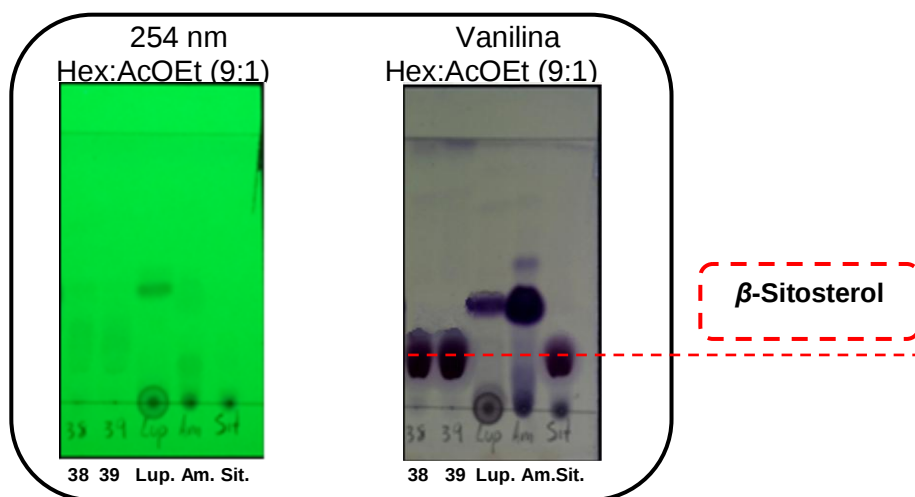


Figura 14. Placa cromatográfica de PPH-38 com padrões de β -sitosterol, lupeol, α e β -amirina

Esta amostra foi submetida à análise por RMN ^1H , para confirmação da substância e/ou investigação da presença de outros esteroides. Os dados do espectro de RMN ^1H (Tabela 13; Figura 15) mostram informações de um perfil característico da mistura dos esteroides β -sitosterol (**4**) e estigmasterol (**5**). A presença de sinais em δ 5,36 é característica de hidrogênio olefínico (H-6), e em δ 3,52 é referente aos hidrogênios carbinólicos (H-3) dos dois esteroides. Os deslocamentos químicos em δ 5,16 e 5,04 são característicos dos hidrogênios olefínicos da cadeia lateral (H-22 e H-23) do estigmasterol.

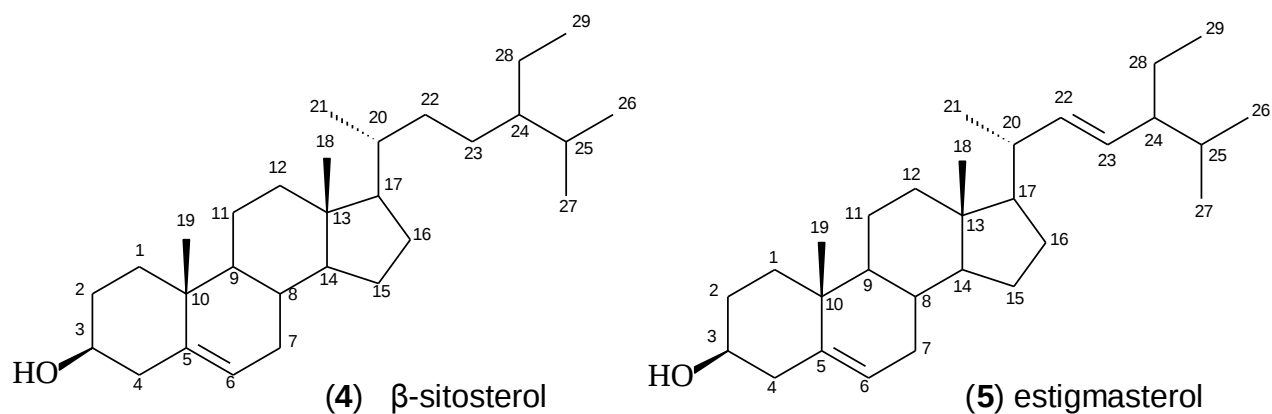
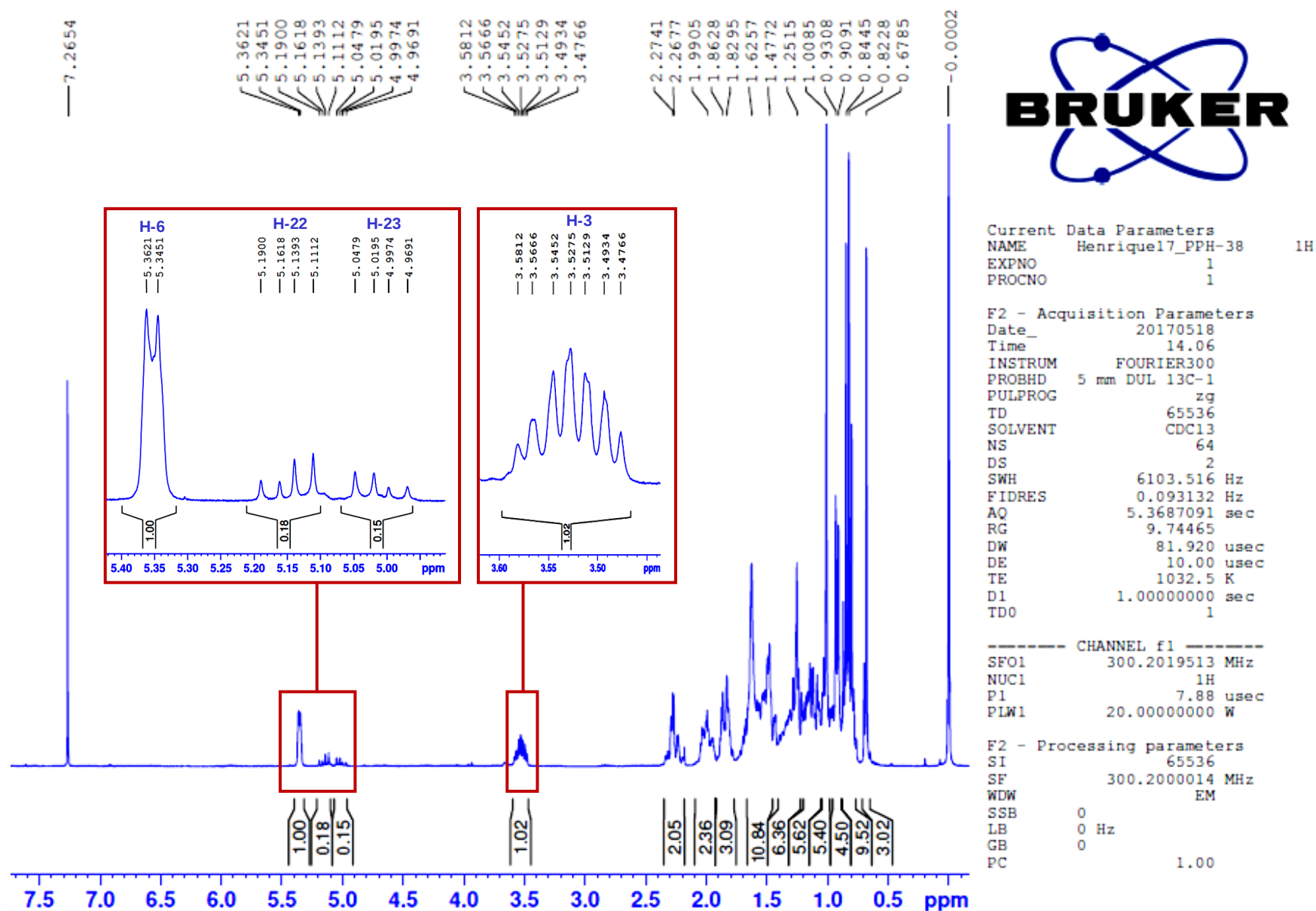


Figura 15. Esteroides **4** e **5** identificados em mistura na fração PPH-38 da espécie *P. puncticulatum*

Tabela 13. Dados dos hidrogênios olefínicos e carbinólicos dos constituintes da fração PPH-38

H	β -sitosterol	Estigmasterol
3	3,52 <i>m</i>	3,52 <i>m</i>
6	5,36 <i>d</i> (J=5,13 Hz)	5,36 <i>d</i> (J=5,13 Hz)
22		5,16 <i>dd</i> (J=15,21 e 8,42 Hz)
23		5,04 <i>dd</i> (J=15,28 e 8,42 Hz)

Figura 16. Espectro de RMN ^1H de PPH-38 (300 MHz, CDCl_3)



5.2. Determinação estrutural das substâncias isoladas do extrato metanólico em *P. puncticulatum*

5.2.1. Identificação da substância 6 (PPM-4.8)

A substância **6**, codificada na fração PPM-4.8 (124,4 mg) foi isolada na forma de um sólido branco, conforme os procedimentos cromatográficos descrito no Esquema 5. Em placa de CCD mostrou absorção intensa no UV 254 e 365 nm, depois de revelada em vanilina sulfúrica exibiu mancha rosa claro, apresentou $R_f=0,8$ utilizando-se DCM/AcOEt (98:2) como sistema de eluição (Figura 14).

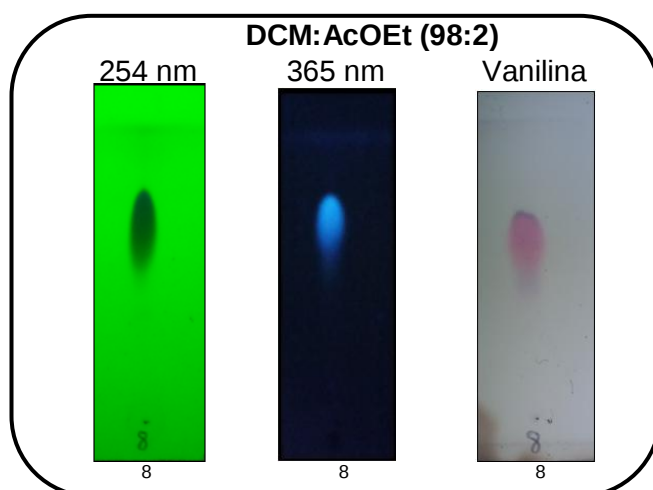


Figura 17. Placa cromatográfica da fração PPM-4.8

Para a determinação estrutural, essa amostra foi submetida a experimentos de RMN 1D (^1H , ^{13}C e Dept-135°), 2D (HSQC e HMBC e comparação com dados existente na literatura.

No espectro de RMN ^1H (Tabela 14; Figura 19) foi observado a presença de 6 sinais de hidrogênios característicos de sistema aromático na região entre 7,28-6,54 com padrão de substituição do tipo *orto*, *orto/meta* e *meta*, sugerindo a presença de dois grupos arila tri-substituídos. No anel A do sistema aromático foram

detectados pela presença de três sinais em δ 7,19 (*d*, $J=1,6$ Hz; H-2), 7,28 (*dd*, $J=7,8$ e $1,7$ Hz; H-6) e 6,81 (*d*, $J=8,16$ Hz; H-5). O mesmo padrão de acoplamento foi verificado para o anel B, com sinais em δ 6,62 (H-2' e H-5') e 6,54 (H-6'), conforme mostra a tabela 14. Os sinais em δ 6,06 e 5,89 integrando para dois hidrogênios cada, são indicativos de substituição do grupo metilenodióxi dos anéis aromáticos.

A presença de um sistema butirolactônica foi evidenciada através dos sinais de hidrogênios metínicos em δ 4,05 (H-8) e 3,49 (H-8') e pelos hidrogênios metilênicos δ 4,42 (H-9a) e 4,16 (H-9b).

A análise do espectro de RMN ^{13}C (Tabela 14, Figura 23) mostra sinais correspondentes a 20 átomos de carbono, que associado com o experimento de Dept-135° (Figura 24) foi possível confirmar a presença dos 6 carbonos hidrogenados e 6 não hidrogenados pertencente ao sistema aromático, além de 4 metilênicos, 2 metínicos e 2 carbonílicos. Os sinais do sistema oxobenzilbutirolactona foram evidenciados pelos deslocamentos dos carbonos metilênicos em δ 34,63 (C-7'), 68,18 (C-9), metínicos em δ 46,69 (C-8) e 44,82 (C-8') além dos grupos carbonílicos de cetona em δ 194,54 (C-7) e de lactona em δ 177,05 (C-9').

No experimento HSQC (Figura 25), observou-se as seguintes correlações dos hidrogênios aromáticos: δ 7,28 $\rightarrow$ 124,84 (C-6), 7,19 $\rightarrow$ 108,29 (C-2), 6,81 $\rightarrow$ 107,99 (C-5), 6,62 $\rightarrow$ 109,66 (C-5'), 6,62 $\rightarrow$ 107,92 (C-2') e 6,54 $\rightarrow$ 122,50 (C-6'). Para os grupos metilenodioxí, os hidrogênios em δ 6,06 mostraram correlação com o carbono em δ 102,18 (3,4-OCH₂O) e o hidrogênio em δ 5,89 com o carbono em δ 101,03 (3',4'-OCH₂O).

No espectro de correlação à longa distância HMBC (Figura 26) o hidrogênio em δ 7,19 (H-2) mostra correlação com carbono carbonílico em δ 194,54 (C-7) e

com sinais de carbonos aromáticos em δ 124,84 (C-6), δ 148,52 (C-4) e δ 152,65 (C-3). O hidrogênio δ 6,62 (H-2') mostra correlação com o sinal de carbono metilênico em δ 34,63 (C-7') e ainda com carbonos aromáticos em δ 122,50 (C-6'), δ 130,68 (C-1') e δ 147,90 (C-3'). A substituição pelo grupo metilenodioxi na posição 3/4, no anel "A" foi confirmada pela correlação dos hidrogênios metilênicos em δ 6,06 com os carbonos aromáticos em δ 148,52 (C-4) e 152,65 (C-3) e os hidrogênios em δ 5,89 com os carbonos em δ 146,58 (C-4') e 147,90 (C-3') para a posição 3'/4' no anel B. Outras correlações do HMBC essenciais para a identificação da 7-oxo-parabenzolactona são mostradas na Tabela 14.

Na família Burseraceae, essa lignana foi previamente isolada na madeira de *Protium tenuifolium* (SIQUEIRA et al. 1995). Outras lignanas com esqueleto dibenzilbutirolactona também isoladas na família são registradas na literatura como hinoquinina (MALDINI et al. 2009; ZHANG et al. 2008), gadaina (LIMA et al. 2001; ZOGHBI et al. 1981; SIQUEIRA et al. 1995), parabenzolactona acetato (LIMA, 2004).

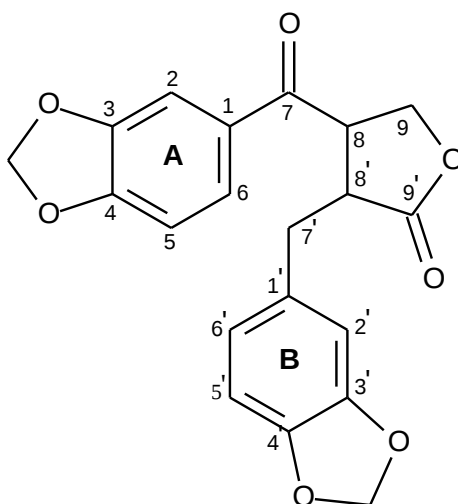


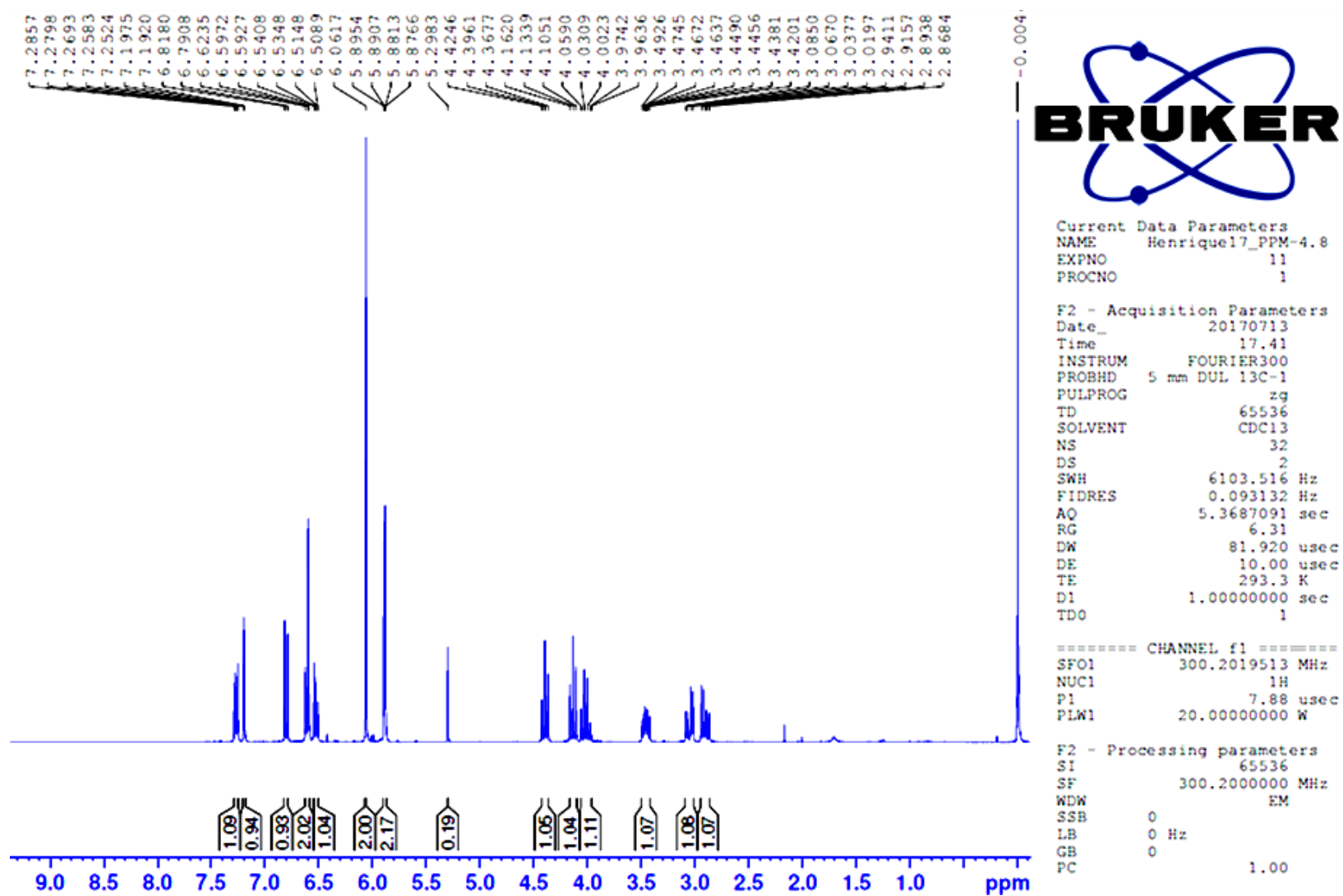
Figura 18. Estrutura da 7-oxo-parabenzolactona

Tabela 14. Dados de RMN da fração 4.8 em CDCl₃

Posição	RMN ¹ H	RMN ¹³ C	HMBC
	δ (ppm), multiplicidade, J (Hz)*	δ (ppm)	
1		130,30	
2	7,19 <i>d</i> (J= 1,6 Hz)	108,29	C-6, C-4, C-3, C-7
3		152,65	
4		148,52	
5	6,81 <i>d</i> (J=8,0 Hz)	107,99	C-1, C-4, C-3
6	7,28 <i>dd</i> (J=8,0 e 1,7 Hz)	124,84	C-2, C-7, C-5
7		194,54	
8	4,05 <i>m</i>	46,69	C-7', C-8', C-9, C-9', C-7
9	4,42 <i>t</i> (J=8,5 Hz; H-9a)	68,18	C-8', C-9'
	4,16 <i>t</i> (J=8,4 Hz; H-9b)		C-7, C-8
1'		130,68	
2'	6,62 <i>sl</i>	107,92	C-7', C-6', C-1, C-3
3'		147,90	
4'		146,58	
5'	6,62 <i>d</i> (J= 8,0 Hz)	109,66	C-7', C-6', C-1', C-4'
6'	6,54 <i>dd</i> (J=8,0 e 1,7 Hz)	122,50	C-7', C-2', C-5', C-4'
7'	3,08 <i>dd</i> (J=14,1 e 6,5 Hz; H-7a)	34,63	C-8', C-8, C-5', C-6', C-1', C-9'
	2,94 <i>dd</i> (J=14,1 e 6,5 Hz; H-7b)		C-8', C-8, C-5', C-6', C-1', C-9
8'	3,49 <i>m</i>	44,82	C-7', C-8, C-1', C-9', C-7
9'		177,05	
(3,4)-OCH₂O-	6,06 <i>s</i>	102,18	C-4, C-3
(3',4')-OCH₂O-	5,89 <i>d</i> (J= 1,4 Hz; Ha')	101,03	C-4', C-3'
	5,88 <i>d</i> (J= 1,4 Hz; Hb')		

*300 MHz, CDCl₃

Figura 19. Espectro de RMN ^1H de PPM-4.8 (300 MHz, CDCl_3)



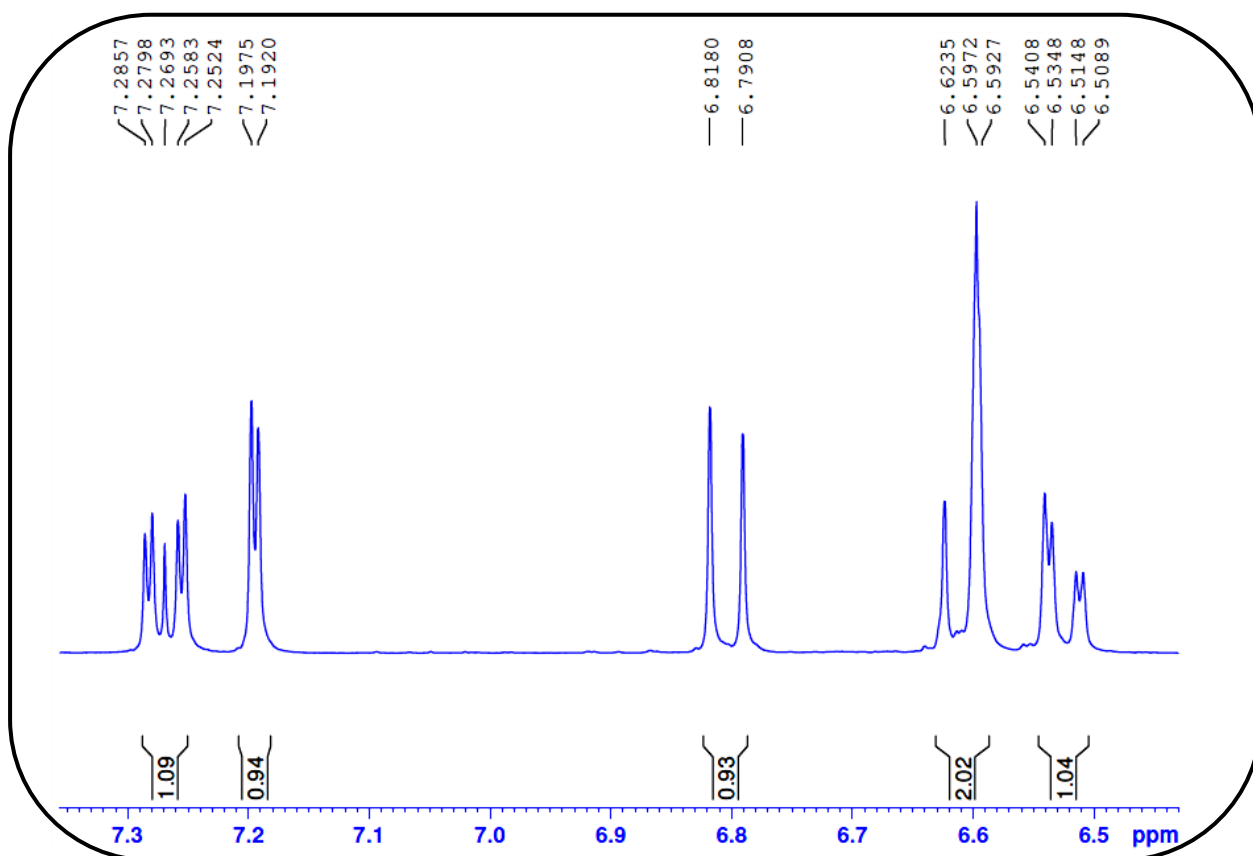


Figura 20. Expansão dos sinais de RMN de ^1H de **PPM-4.8** nas regiões de 7,28 a 6,54 ppm

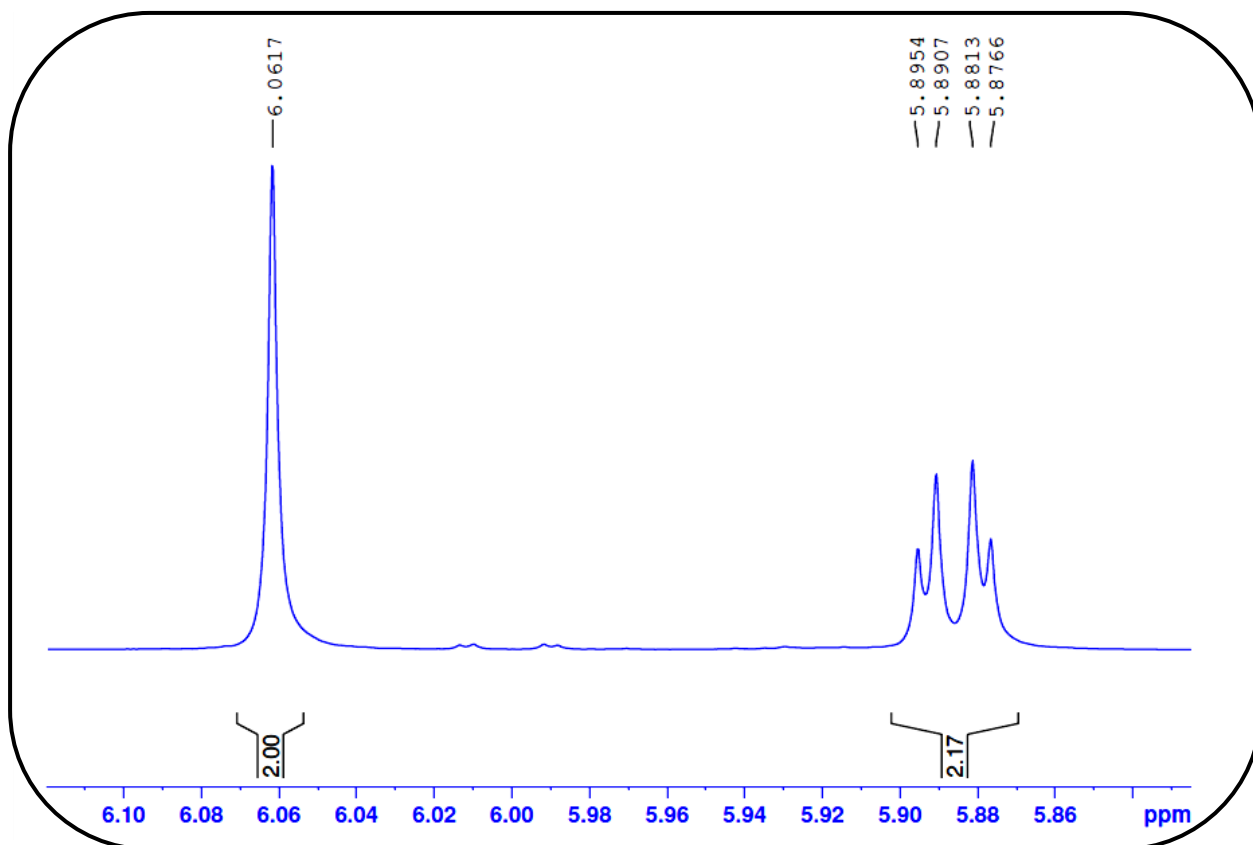


Figura 21. Expansão dos sinais de RMN de ^1H de **PPM-4.8** nas regiões de 6,06 a 5,89 ppm

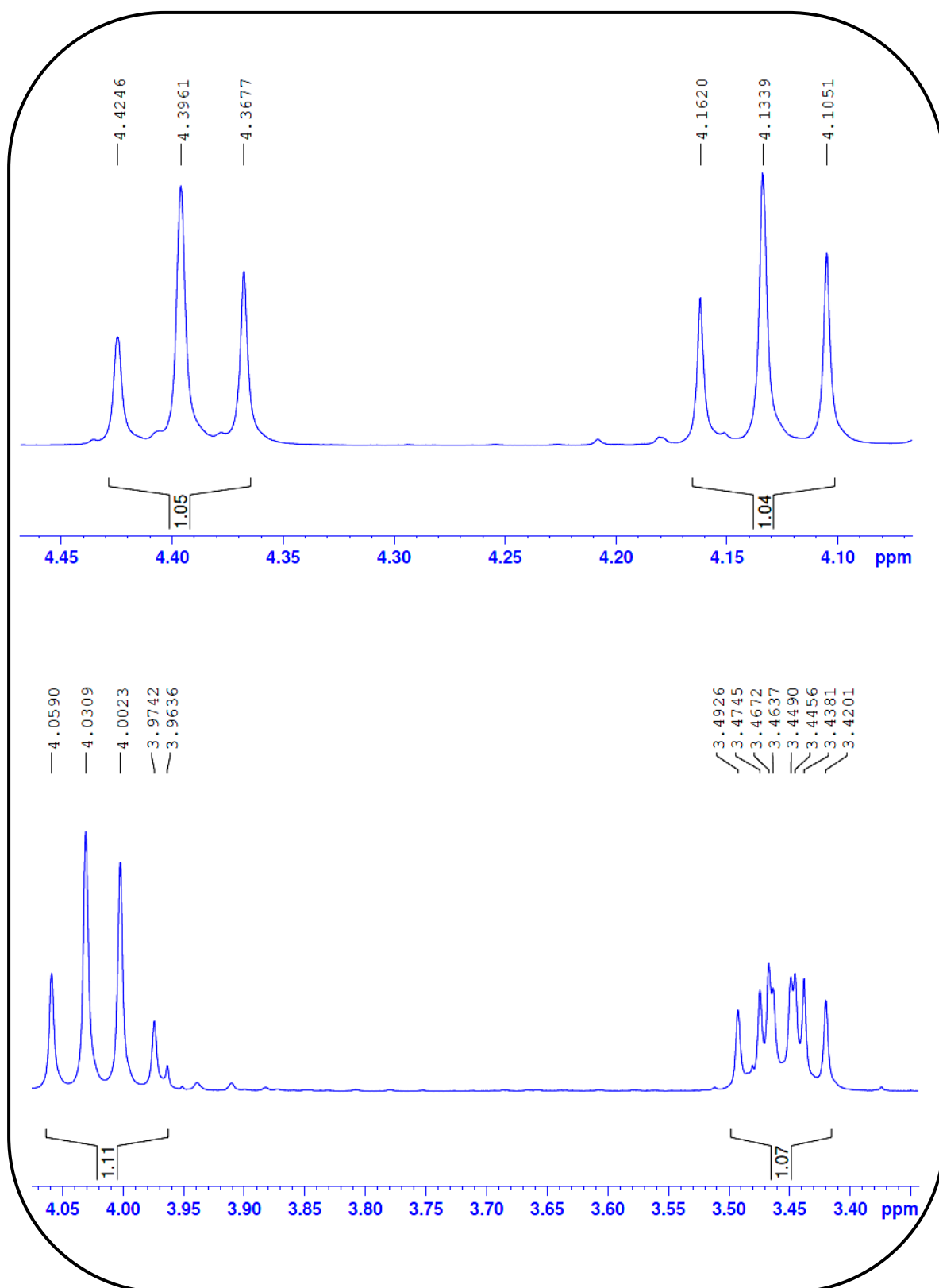


Figura 22. Expansão dos sinais de RMN de ^1H de **PPM-4.8** nas regiões de 4,42 a 3,49 ppm

Figura 23. Espectro de RMN ^{13}C de PPM-4.8 (75 MHz, CDCl_3)

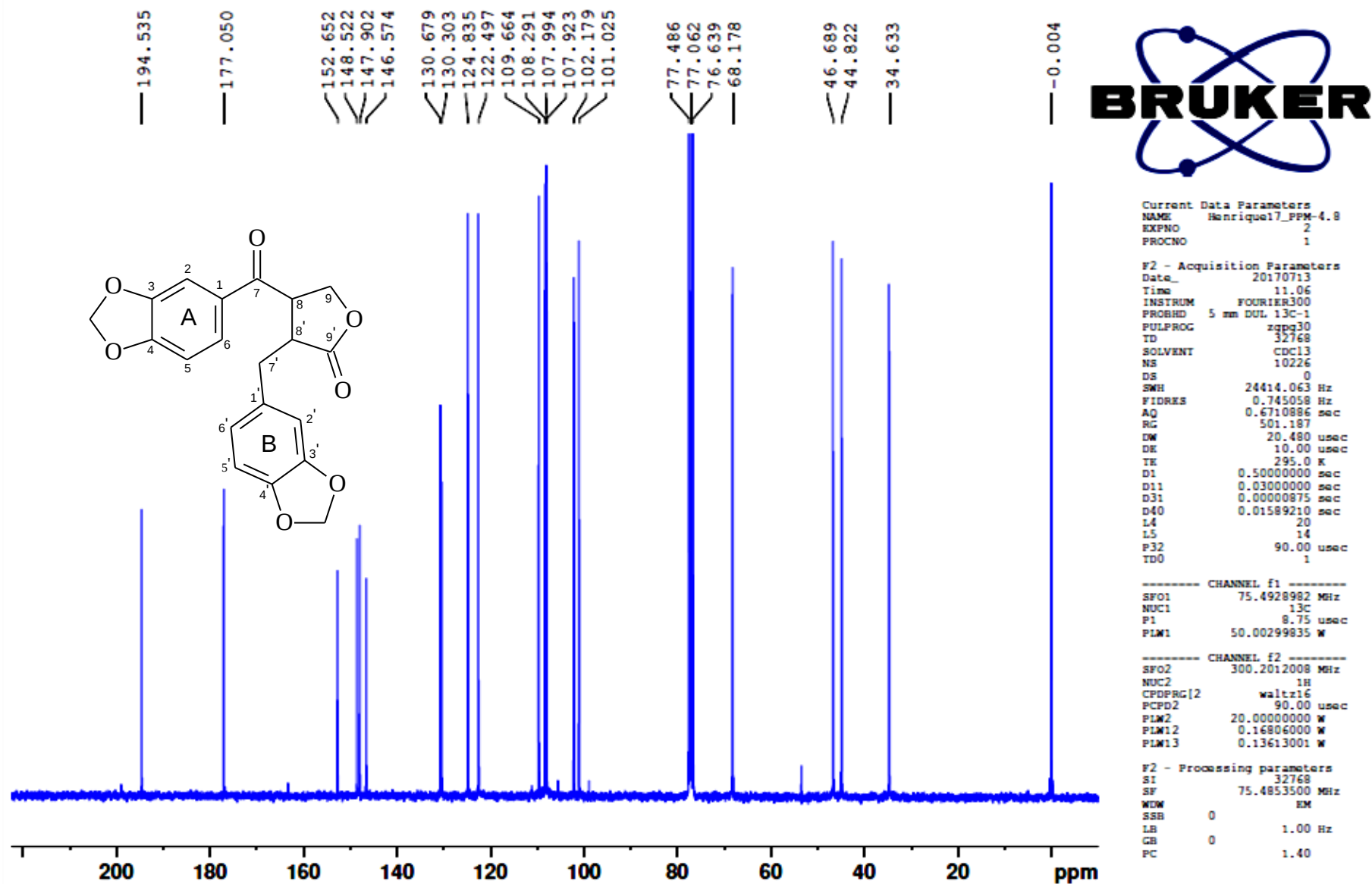
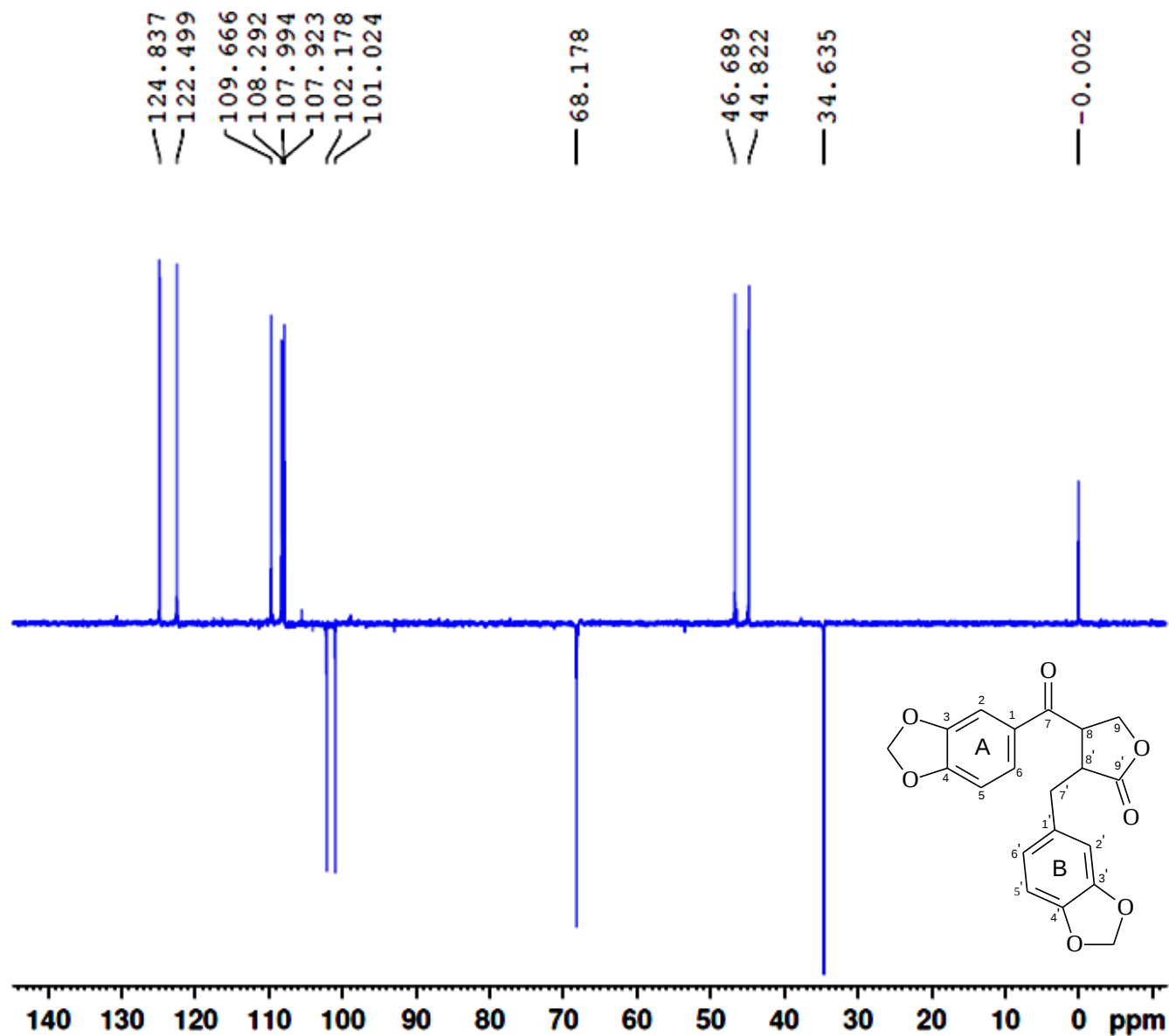


Figura 24. Espectro de Dept -135° de PPM-4.8 (75 MHz, CDCl₃)



Current Data Parameters
NAME: Henrique17_PPM-4.8
EXPNO: 4
PROCNO: 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_: 20170713
Time: 14.30
INSTRUM: FOURIER300
PROBHD: 5 mm DUL 13C-1
PULPROG: dept135
TD: 65536
SOLVENT: CDCl3
NS: 2211
DS: 0
SWH: 24414.063 Hz
FIDRES: 0.372529 Hz
AQ: 1.3421773 sec
RG: 501.187
DW: 20.480 usec
DE: 10.00 usec
TE: 295.7 K
CNST2: 145.0000000
D1: 1.00000000 sec
D2: 0.00344828 sec
D14: 0.00001114 sec
D33: 0.00000825 sec
D34: 0.00344053 sec
D35: 0.00345340 sec
L4: 40
P32: 90.00 usec
TD0: 1

----- CHANNEL f1 -----
SFO1: 75.4928978 MHz
NUC1: 13C
P1: 8.75 usec
P2: 17.50 usec
PLW1: 50.00299835 W

----- CHANNEL f2 -----
SFO2: 300.2012008 MHz
NUC2: 1H
CPDPRG2: waltz16
P3: 8.25 usec
P4: 16.50 usec
PCPD2: 90.00 usec
PLW2: 20.00000000 W
PLW12: 0.16806000 W

F2 - Processing parameters
S1: 32768
SF: 75.4853500 MHz
WDW: EM
SSB: 0
LB: 1.00 Hz
GB: 0
PC: 1.40



Current data parameters
NAME: henrique17_ppm-4.8
EXPNO: 200
PROCNO: 1

F2 - Acquisition parameters
Date_: 20100713
Time: 17.45
INSTRUM: spect
PROBHD: 5 mm BBO 13C-1
PULPROG: zgpg30
TD: 65536
SOLVENT: CDCl3
NS: 800
DS: 4
SWH: 600.516 MHz
FIDRES: 2.460232 Hz
AQ: 0.1677722 sec
RG: 501.187
DM: 81.920 cmhsc
DE: 10.00 cmhsc
TE: 293.2 K
CMT2: 145.000000
d5: 0.0000000 sec
d1: 1.0000000 sec
d4: 0.0010244 sec
d11: 0.0000000 sec
d13: 0.0000400 sec
d16: 0.0000000 sec
d31: 0.0000744 sec
d32: 0.0001528 sec
d33: 0.0000920 sec
d34: 0.0001840 sec
d36: 0.0010000 sec
d37: 0.0000000 sec
d38: 0.0001745 sec
d42: 0.0000146 sec
d43: 0.0000218 sec
d44: 0.0010000 sec
d46: 0.0001614 sec
d48: 0.0000000 sec
d49: 0.0000000 sec
d55: 75.00 cmhsc

Channel f1
NUC1: 13C
P1: 7.00 sec
P2: 15.28 cmhsc
P1M1: 20.0000000 W

Channel f2
NUC2: 13C
CPCPRG2: zgpg30
P3: 9.00 cmhsc
P4: 10.00 cmhsc
PCPRG2: zgpg30
P1M2: 10.0000000 W
P1M12: 0.0012998 W

Channel f3 Channel f4
CPHASE1: 0.00 sec
CPHASE2: 0.00 sec
CPHASE3: 0.00 sec
CPHASE4: 0.00 sec
CPHASE5: 0.00 sec
CPHASE6: 0.00 sec
CPHASE7: 0.00 sec
CPHASE8: 0.00 sec
CPHASE9: 0.00 sec
CPHASE10: 0.00 sec
CPHASE11: 0.00 sec
CPHASE12: 0.00 sec
CPHASE13: 0.00 sec
CPHASE14: 0.00 sec
CPHASE15: 0.00 sec
CPHASE16: 0.00 sec
CPHASE17: 0.00 sec
CPHASE18: 0.00 sec
CPHASE19: 0.00 sec
CPHASE20: 0.00 sec
CPHASE21: 0.00 sec
CPHASE22: 0.00 sec
CPHASE23: 0.00 sec
CPHASE24: 0.00 sec
CPHASE25: 0.00 sec
CPHASE26: 0.00 sec
CPHASE27: 0.00 sec
CPHASE28: 0.00 sec
CPHASE29: 0.00 sec
CPHASE30: 0.00 sec
CPHASE31: 0.00 sec
CPHASE32: 0.00 sec
CPHASE33: 0.00 sec
CPHASE34: 0.00 sec
CPHASE35: 0.00 sec
CPHASE36: 0.00 sec
CPHASE37: 0.00 sec
CPHASE38: 0.00 sec
CPHASE39: 0.00 sec
CPHASE40: 0.00 sec
CPHASE41: 0.00 sec
CPHASE42: 0.00 sec
CPHASE43: 0.00 sec
CPHASE44: 0.00 sec
CPHASE45: 0.00 sec
CPHASE46: 0.00 sec
CPHASE47: 0.00 sec
CPHASE48: 0.00 sec
CPHASE49: 0.00 sec
CPHASE50: 0.00 sec
CPHASE51: 0.00 sec
CPHASE52: 0.00 sec
CPHASE53: 0.00 sec
CPHASE54: 0.00 sec
CPHASE55: 0.00 sec
CPHASE56: 0.00 sec
CPHASE57: 0.00 sec
CPHASE58: 0.00 sec
CPHASE59: 0.00 sec
CPHASE60: 0.00 sec
CPHASE61: 0.00 sec
CPHASE62: 0.00 sec
CPHASE63: 0.00 sec
CPHASE64: 0.00 sec
CPHASE65: 0.00 sec
CPHASE66: 0.00 sec
CPHASE67: 0.00 sec
CPHASE68: 0.00 sec
CPHASE69: 0.00 sec
CPHASE70: 0.00 sec
CPHASE71: 0.00 sec
CPHASE72: 0.00 sec
CPHASE73: 0.00 sec
CPHASE74: 0.00 sec
CPHASE75: 0.00 sec
CPHASE76: 0.00 sec
CPHASE77: 0.00 sec
CPHASE78: 0.00 sec
CPHASE79: 0.00 sec
CPHASE80: 0.00 sec
CPHASE81: 0.00 sec
CPHASE82: 0.00 sec
CPHASE83: 0.00 sec
CPHASE84: 0.00 sec
CPHASE85: 0.00 sec
CPHASE86: 0.00 sec
CPHASE87: 0.00 sec
CPHASE88: 0.00 sec
CPHASE89: 0.00 sec
CPHASE90: 0.00 sec
CPHASE91: 0.00 sec
CPHASE92: 0.00 sec
CPHASE93: 0.00 sec
CPHASE94: 0.00 sec
CPHASE95: 0.00 sec
CPHASE96: 0.00 sec
CPHASE97: 0.00 sec
CPHASE98: 0.00 sec
CPHASE99: 0.00 sec
CPHASE100: 0.00 sec

F1 - Acquisition parameters
TD: 65536
SOLVENT: CDCl3
NS: 800
DS: 4
SWH: 600.516 MHz
FIDRES: 2.460232 Hz
AQ: 0.1677722 sec
RG: 501.187
DM: 81.920 cmhsc
DE: 10.00 cmhsc
TE: 293.2 K
CMT2: 145.000000
d5: 0.0000000 sec
d1: 1.0000000 sec
d4: 0.0010244 sec
d11: 0.0000000 sec
d13: 0.0000400 sec
d16: 0.0000000 sec
d31: 0.0000744 sec
d32: 0.0001528 sec
d33: 0.0000920 sec
d34: 0.0001840 sec
d36: 0.0010000 sec
d37: 0.0000000 sec
d38: 0.0001745 sec
d42: 0.0000146 sec
d43: 0.0000218 sec
d44: 0.0010000 sec
d46: 0.0001614 sec
d48: 0.0000000 sec
d49: 0.0000000 sec
d55: 75.00 cmhsc

F2 - Processing parameters
SI: 32768
SF: 300.2000000 MHz
WDW: EM
SSB: 0
LB: 0 Hz
GB: 0
PC: 1.40

F1 - Processing parameters
SI: 32768
SF: 75.48214 MHz
WDW: EM
SSB: 0
LB: 0 Hz
GB: 0
PC: 1.40

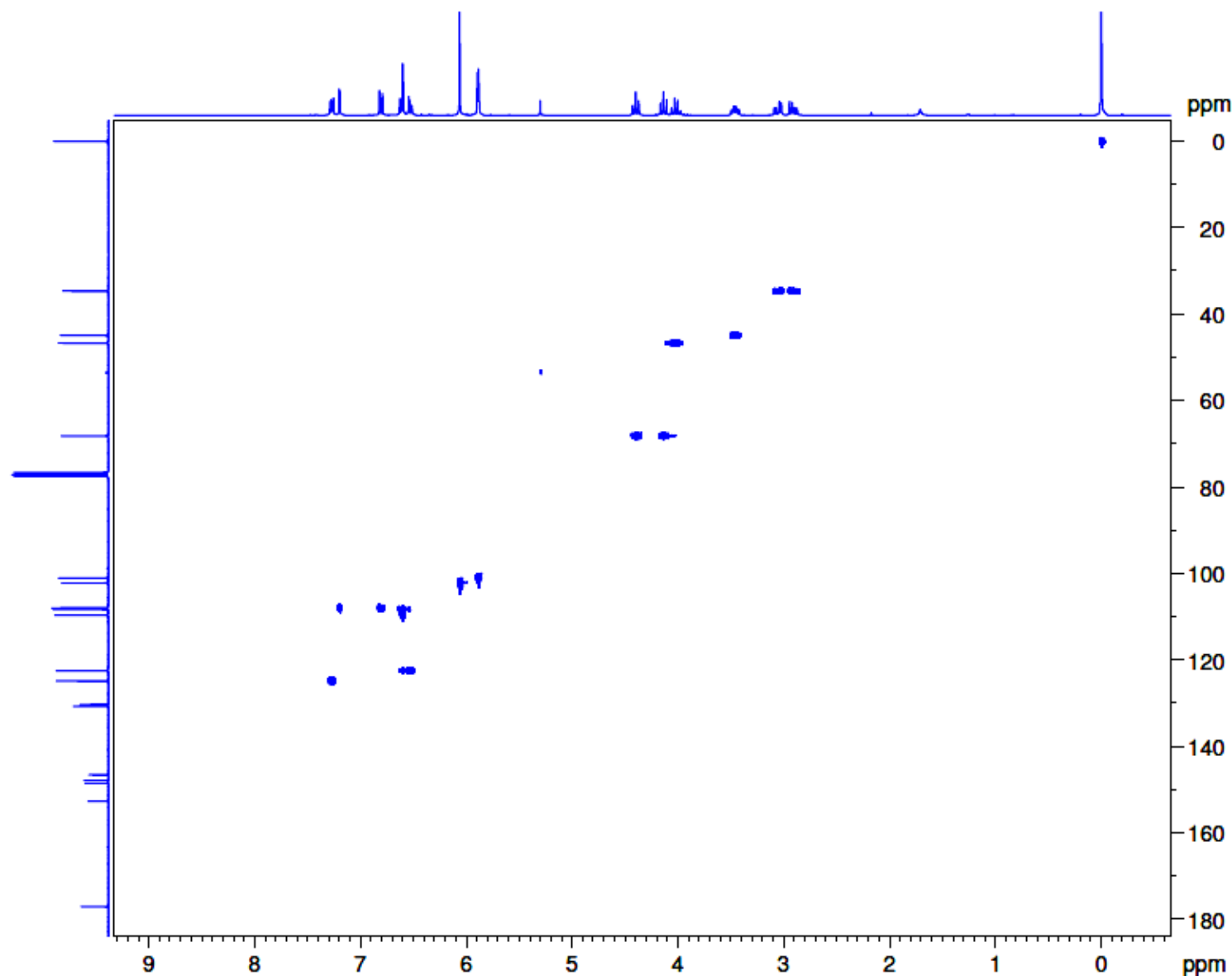
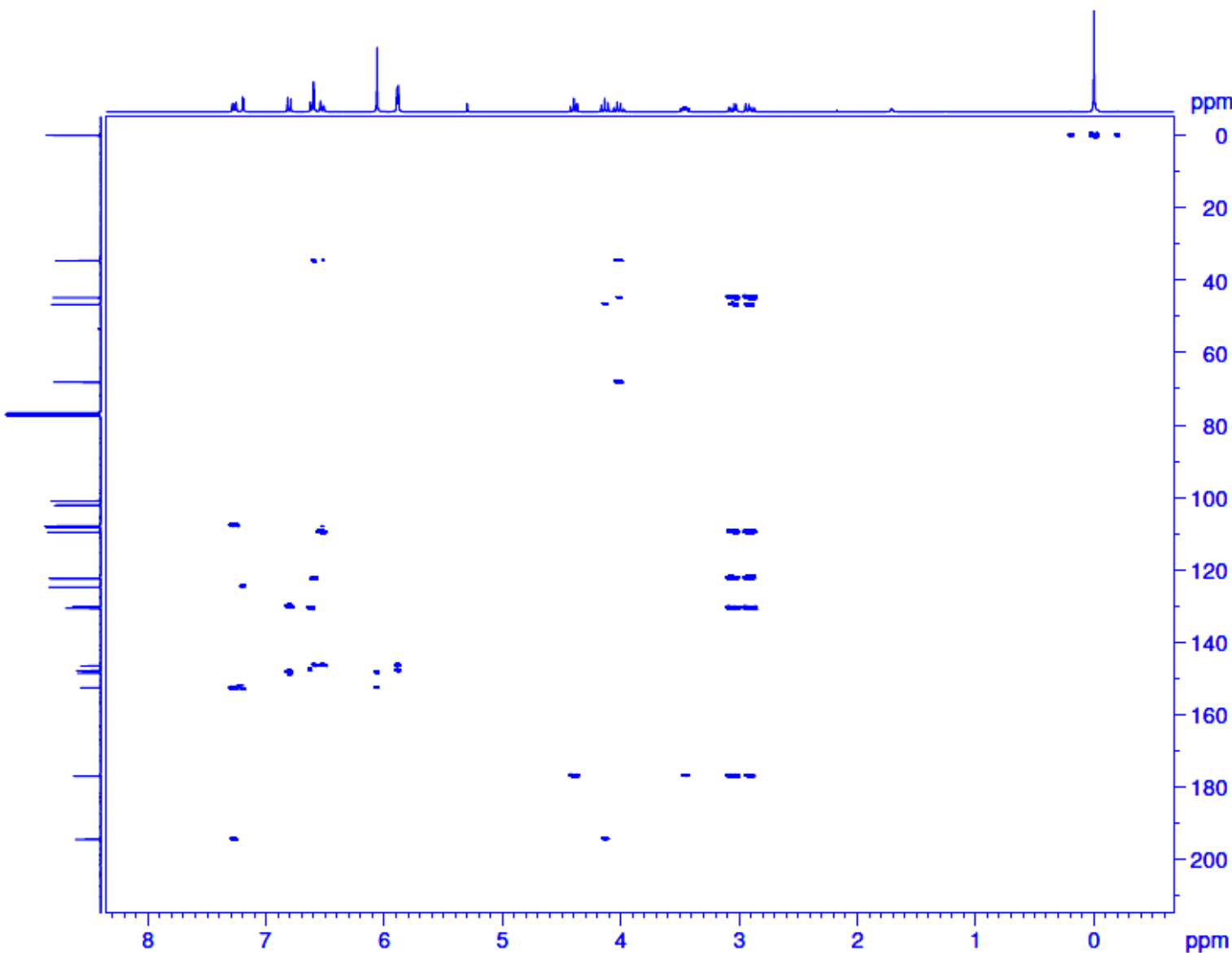


Figura 25. Mapa de contorno de HSQC de PPM-4.8 (75 MHz, CDCl₃)



Current Data Parameters
NAME Henrique17_PPM-4.8
EXPNO 300
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20170714
Time 0.34
INSTRUM FOURIER300
PROBHD 5 mm DUL 13C-1
PULPROG hmcgplpndqf
TD 2048
SOLVENT CDCl3
NS 100
DS 16
SWH 6101.516 Hz
FIDRES 2.980232 Hz
AQ 0.1677722 sec
RG 501.187
DW 81.320 usec
DE 10.00 usec
TE 296.0 K
CNS12 145.0000000
CNS13 8.0000000
D0 0.00000300 sec
D1 1.00000000 sec
D2 0.00344828 sec
D4 0.04200000 sec
D14 0.00020000 sec
D31 0.00000764 sec
D32 0.00001528 sec
D33 0.00000930 sec
D34 0.00100000 sec
D38 0.00003010 sec
D39 0.00003010 sec
IN0 0.00003010 sec

===== CHANNEL f1 =====
SFO1 300.2019513 MHz
NUC1 13C
P1 7.64 usec
P2 15.28 usec
P1M1 20.00000000 W

===== CHANNEL f2 =====
SFO2 75.4932760 MHz
NUC2 13C
P3 9.30 usec
P1M2 50.00000000 W

===== GRADIENT CHANNEL =====
GPM1[1] SINE.100
GPM1[2] SINE.100
GPM1[3] SINE.100
GPE1 50.00 %
GPE2 30.00 %
GPE3 40.10 %
P16 1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters
TD 213
SFO1 75.49328 MHz
FIDRES 155.974609 Hz
SW 230.037 ppm
F2MODE QF

F2 - Processing parameters
SI 4096
SF 300.1999950 MHz
WDW SINE
SSB 0
LB 0 Hz
GB 0
PC 1.40

F1 - Processing parameters
SI 4096
MC2 QF
SF 75.4853584 MHz
WDW SINE
SSB 0
LB 0 Hz
GB 0

Figura 26. Mapa de contorno de HMBC de PPM-4.8 (75 MHz, CDCl₃)

5.2.2. Determinação da substância 7 (PPM-4.10.5.7.6)

A substância 7, codificada como PPM-4.10.5.7.6 (10 mg) foi isolada na forma de um sólido branco, conforme os procedimentos cromatográfico descrito no Esquema 7, em placa de CCD mostrou absorção intensa no UV 254 , após revelada em vanilina sulfúrica exibiu uma única mancha cinza, apresentou $R_f=0,6$ utilizando-se DCM/AcOEt (9:1) como sistema de eluição (Figura 24).

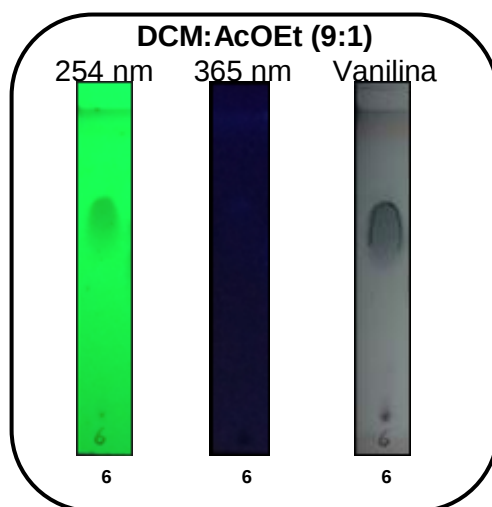


Figura 27. Placa cromatográfica de PPM-4.10.5.7.6

Para a determinação estrutural, essa amostra foi submetida a experimentos de RMN 1D (^1H , ^{13}C e Dept-135°), 2D (HSQC e HMBC) e por comparação com dados existente na literatura.

No espectro de RMN ^1H (Tabela 16; Figura 29) foi observado a presença de 6 sinais de hidrogênios característicos de sistema aromático na região entre δ 6,64-6,36, com padrão de substituição do tipo *orto*, *orto/meta* e *meta*, sugerindo a presença de dois grupos arila tri-substituídos. No anel A do sistema aromático foram detectados pela presença de três sinais em δ 6,36 (d, $J=1,5$ Hz; H-2), 6,41 (dd, $J=7,8$ e $1,6$ Hz; H-6) e 6,62 (d; $J=7,8$ Hz; H-5). O mesmo padrão de acoplamento foi verificado para o anel B, com sinais em δ 6,62 (H-2' e H-6') e 6,64 (H-5'), conforme

mostra a Tabela 16. Os sinais entre δ 5,94-5,96 são indicativos de substituição do grupo metilenodióxi dos anéis aromáticos.

Na região de hidrogênios metínicos foram observados os sinais em δ 2,40 (H-8) e 2,36 (H-8'), além dos oximetínicos em δ 4,70 (H-9) e 4,59 (H-7'). O singlete largo em δ 3,36 foi atribuído ao hidrogênio oximetílico pertencente à metoxila. Verificou-se também os hidrogênios oximetilênico em δ 4,18 e 3,92 os quais foram atribuídos à H-9'.

O espectro de RMN ^{13}C (Tabela 16, Figura 33) mostra sinais correspondentes a 21 átomos de carbono, que associado com o experimento de Dept -135° (Figura 34) foi possível confirmar a presença dos grupos oximetilênico em δ 69,02 (C-9'), oximetínico em δ 108,12 (C-9) e 73,60 (C-7'). E também deslocamentos característicos do grupo metilenodioxio em δ 100,94 e 100,88.

No experimento HSQC (Figura 35), observou-se as seguintes correlações para os grupos metilenodioxio: δ 5,94 e 5,93 $\rightarrow$ δ 100,94; δ 5,95 e 5,91 $\rightarrow$ δ 100,88. Os hidrogênios do oximetilênico em δ 4,18 e 3,92 mostraram correlações com o deslocamento de carbono em δ 69,02 (C-9').

No espectro de correlação à longa distância HMBC (Figura 36) para o anel A, o hidrogênio em δ 6,36 (H-2) correlacionou com o carbono metilênico em δ 38,89 (C-7) e com sinais de carbonos aromáticos em δ 147,46 (C-3), 145,88 (C-4) e 121,77 (C-6). Para o anel B, mostra correlações do hidrogênio em δ 6,62 (H-2') com o sinal de carbono carbinólico em δ 73,60 (C-7') e ainda com carbonos aromáticos em δ 118,59 (C-6'), 146,32 (C-3') e 147,50 (C-4').

No espectro de correlação à longa distância HMBC (Figura 36) para o anel A, o hidrogênio em δ 6,36 (H-2) correlacionou com o carbono metilênico em δ 38,89 (C-7) e com sinais de carbonos aromáticos em δ 147,46 (C-3), 145,88 (C-4) e 121,77

(C-6). Para o anel B, mostra correlações do hidrogênio em δ 6,62 (H-2') com o sinal de carbono carbinólico em δ 73,60 (C-7') e ainda com carbonos aromáticos em δ 118,59 (C-6'), 146,32 (C-3') e 147,50 (C-4'). A substituição do grupo metilenodioxi na posição 3/4, no anel A, foi possível devido às correlações dos hidrogênios em δ 5,94 e 5,93 com os carbonos em δ 147,46 (C-3) e 145,88 (C-4). Da mesma forma que os hidrogênios em δ 5,90 e 5,96 correlacionaram com os carbonos em δ 146,32 (C-3') e 147,50 (C-4') pertencente ao anel B, confirmando a substituição na posição 3'/4'. Outras correlações essenciais para a identificação da substância **7** são mostradas no espectro de HMBC e na Tabela 16.

A orientação do grupo α -metoxi em C-9 da substância **7** foi baseada nas constantes de acoplamento em comparação com a literatura (MARCO et al. 1996). Os hidrogênios para esse grupo α posicionado apresentaram constantes menores quando comparadas com hidrogênios em beta (Tabela 15)

As análises dos dados espectrais revelaram que a substância **7** apresenta algumas semelhanças estruturais com a lignana oxo-parabenzolactona (substância **6**), a principal diferença entre as duas substâncias é a ausência de dois grupos carbonílicos e o surgimento de um grupo metoxila em C-9 e uma hidroxila em C-7', permitindo assim, identificar **7** como a lignana 7'-hidroxi-9 α -metilcubebina

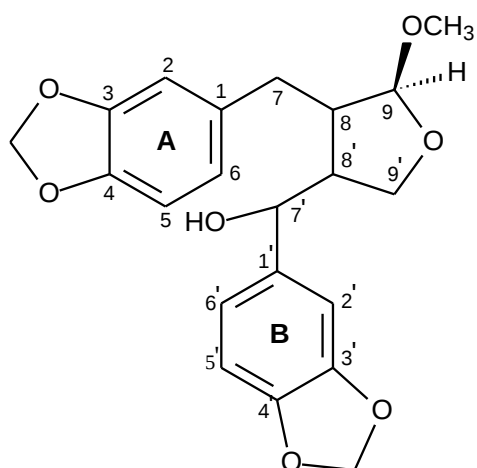


Figura 28. Estrutura da 7'-hidroxi-9α-metilcubebina

Tabela 15. Dados de RMN da orientação do grupo metoxi em C-9 da substância **7** em comparação com literatura.

Nº	RMN ¹³ C δ (ppm)	RMN ¹ H δ (ppm), mult. J (Hz)*	RMN ¹³ C e δ(ppm)				RMN ¹ H δ (ppm), mult., J (Hz)**
	Substância 7		MARCO et al. (1996)				
			9α-OMe		9β-OMe		
9	108,12	4,70 <i>sl</i>	109,9	4,68 <i>d</i> (1,4 Hz)	105,4	4,64 <i>d</i> (4,4 Hz)	

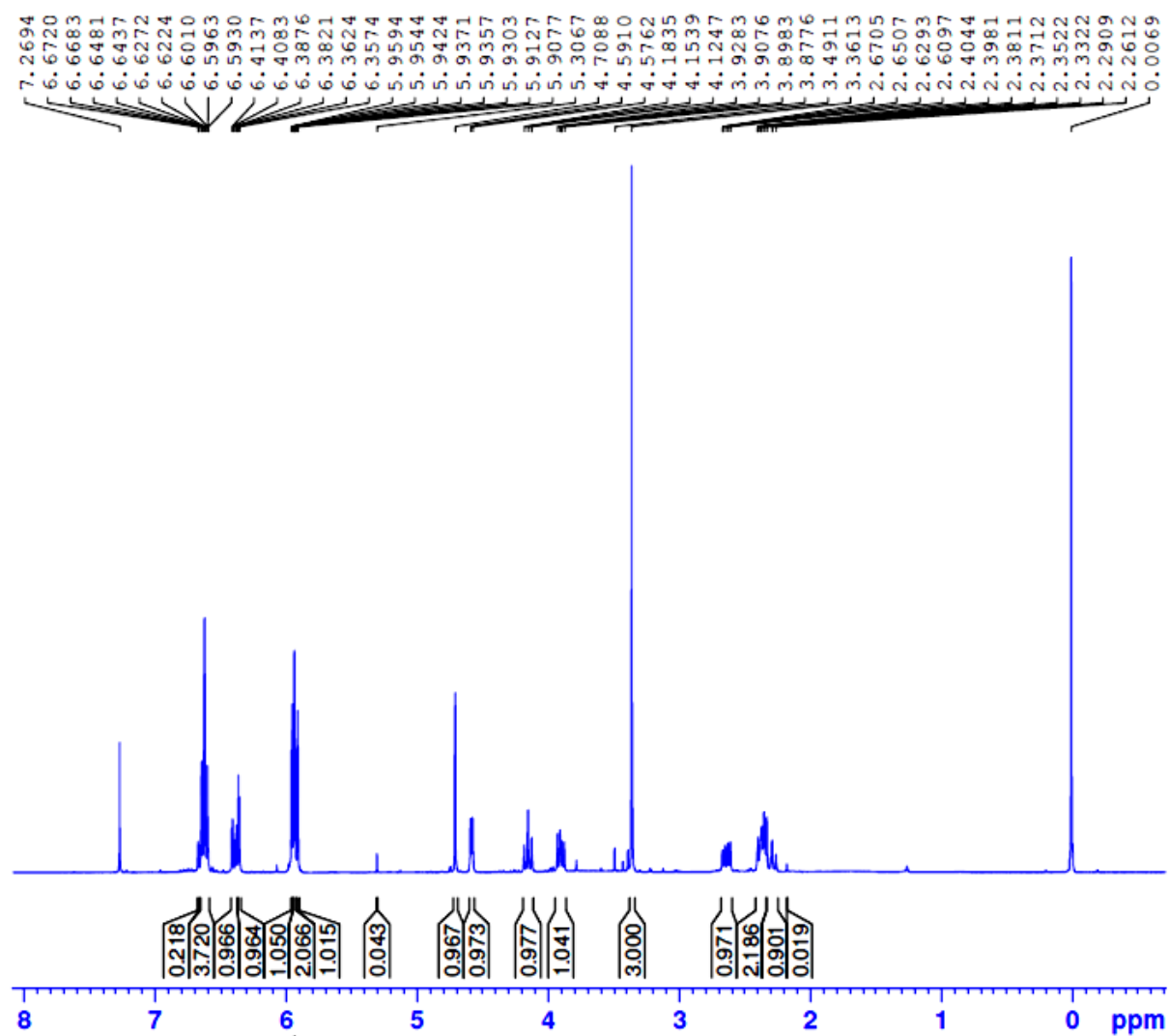
*300 MHz, CDCl₃; **400 MHz, CDCl₃

Tabela 16. Dados de RMN da fração PPM-4.10.5.7.6 em CDCl₃

Posição	RMN ¹ H δ (ppm), multiplicidade, J (Hz)*	RMN ¹³ C δ (ppm)**	HMBC
1		132,58	
2	6,36 <i>d</i> (J= 1,5 Hz)	109,01	C-7, C-6, C-4, C-3
3		147,46	
4		145,88	
5	6,62 <i>d</i> (J=7,8 Hz)	107,75	C-1, C-3
6	6,41 <i>dd</i> (J=7,8 e 1,5 Hz)	121,77	C-7, C-2, C-4
7	2,30 <i>dd</i> (J=12,2 e 7,5 Hz; H-7a)	38,89	C-8, C-2, C-6 e C-1
	2,67 <i>dd</i> (J=12,2 e 7,5 Hz; H-7b)		C-8, C-8', C-9, C-6, C-1
8	2,40 <i>m</i>	49,72	C-7, C-7', C-9, C-1
9	4,70 <i>sl</i>	108,12	C-7, C-9', (9)-OCH ₃ , C-8, C-8'
-O-CH ₃	3,36 <i>sl</i>	54,00	C-9
1'		137,80	
2'	6,62 <i>d</i> (J=1,5 Hz)	106,01	C-7', C-6', C-3', C-4'
3'		146,32	
4'		147,50	
5'	6,64 <i>d</i> (J=7,8 Hz)	107,84	C-2', C-6', C-3', C-4'
6'	6,62 <i>dd</i> (J=7,8 e 1,5 Hz)	118,59	C-7', C-2'
7'	4,59 <i>d</i> (4,4 Hz)	73,60	C-8', C-8, C-9', 'C-2'
8'	2,37 <i>m</i>	47,80	C-7, C-8, C-7', C-9, C-1
9'	4,18 <i>t</i> (J=8,9 Hz; H-9a)	69,02	C-8', C-8, C-7', C-9
	3,92 <i>dd</i> (J=8,9 e 6,2 Hz; H-9b)		C-8, C-7'
(3,4)-	5,94 <i>d</i> (J=1,5 Hz; H _a)	100,94	C-4, C-3
OCH ₂ O-	5,93 <i>d</i> (J=1,5 Hz; H _b)		
(3',4')-	5,95 <i>d</i> (J=1,5 Hz; H _a)	100,88	C-4', C-3
OCH ₂ O-	5,91 <i>d</i> (J=1,5 Hz; H _b)		

*300 MHz, CDCl₃

Figura 29. Espectro de RMN ^1H de PPM-4.10.5.7.6 (300 MHz, CDCl_3)



Current Data Parameters
NAME Henrique17_PPM-4.10.5.7.6
EXPNO 11
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20170810
Time 15.25
INSTRUM FOURIER300
PROBHD 5 mm DUL 13C-1
PULPROG zg
TD 65536
SOLVENT CDCl_3
NS 32
DS 0
SWH 6103.516 Hz
FIDRES 0.093132 Hz
AQ 5.3687091 sec
RG 31.623
DW 81.920 usec
DE 10.00 usec
TE 295.1 K
D1 1.00000000 sec
TD0 1

----- CHANNEL f1 -----
SFO1 300.2019513 MHz
NUC1 ^1H
P1 7.88 usec
PLW1 20.00000000 W

F2 - Processing parameters
SI 65536
SF 300.2000000 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0 Hz
GB 0
PC 1.00

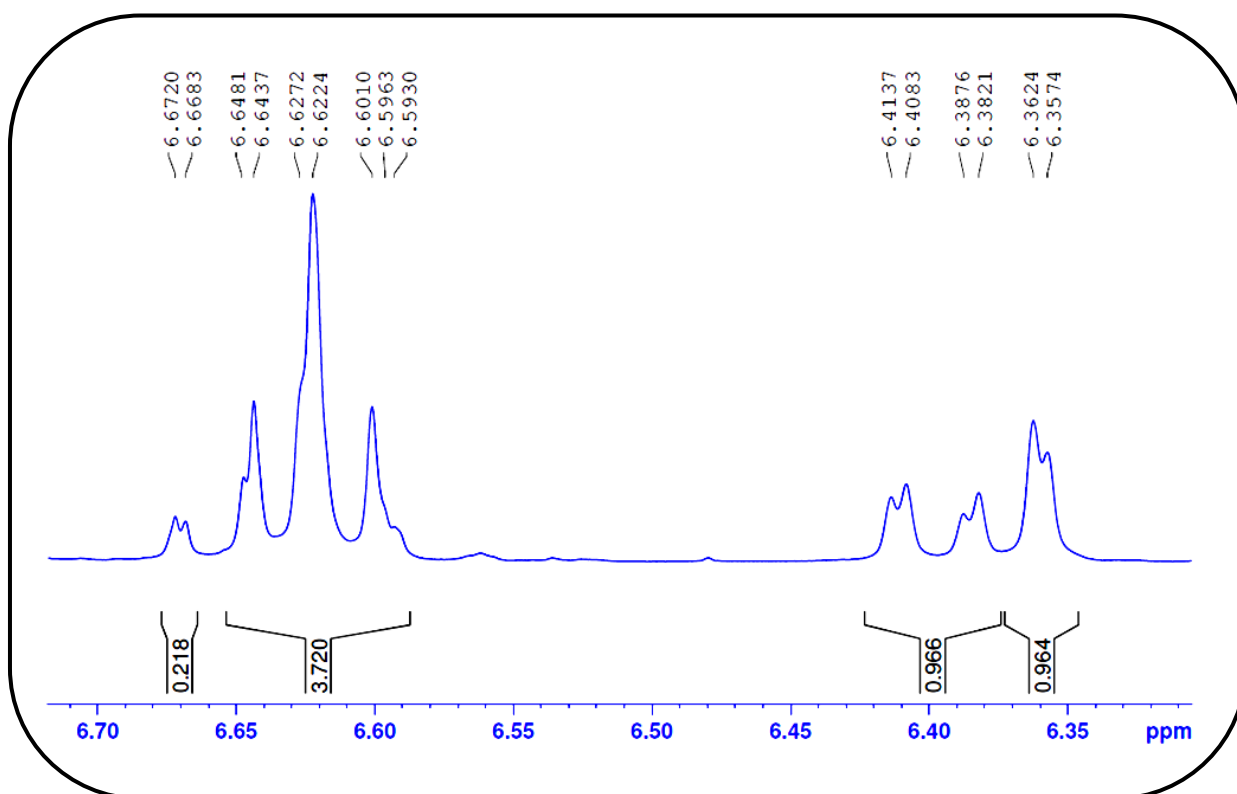


Figura 30. Expansão dos sinais de RMN de ^1H de **PPM-4.10.5.7.6** nas regiões de 6,64 a 6,36 ppm

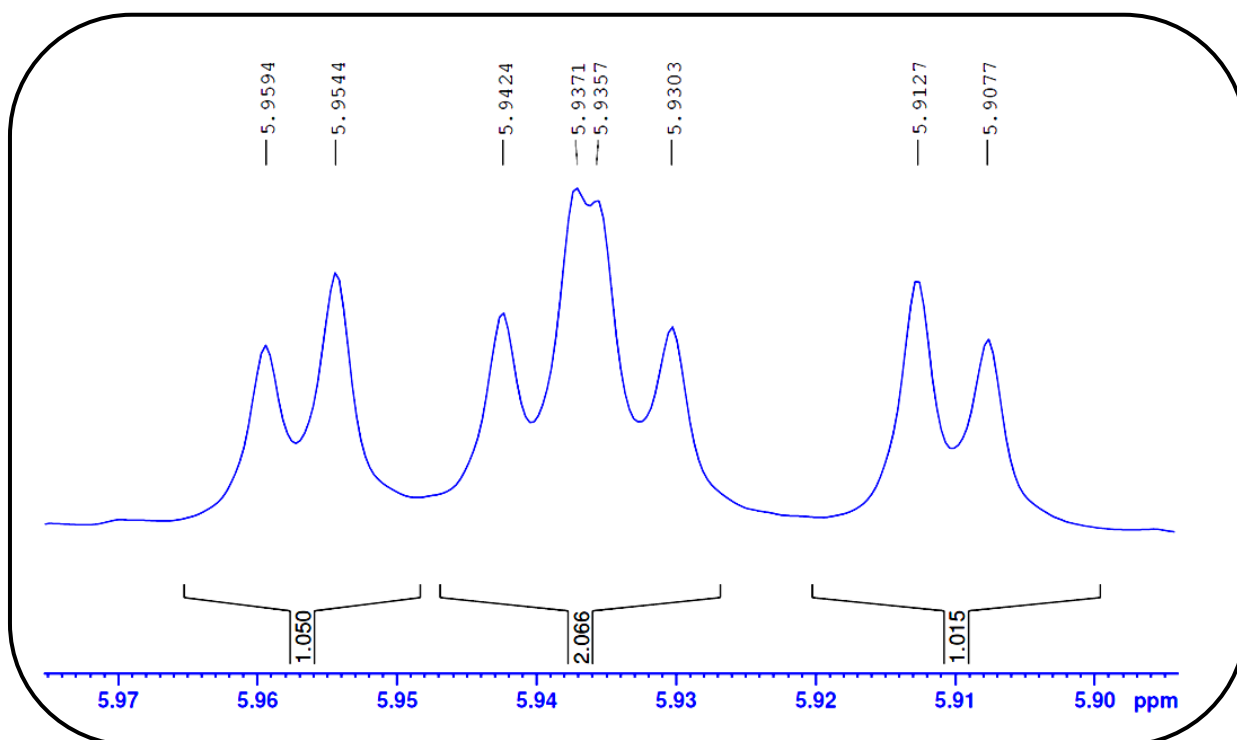


Figura 31. Expansão dos sinais de RMN de ^1H de **PPM-4.10.5.7.6** nas regiões de 5,95 a 5,90 ppm

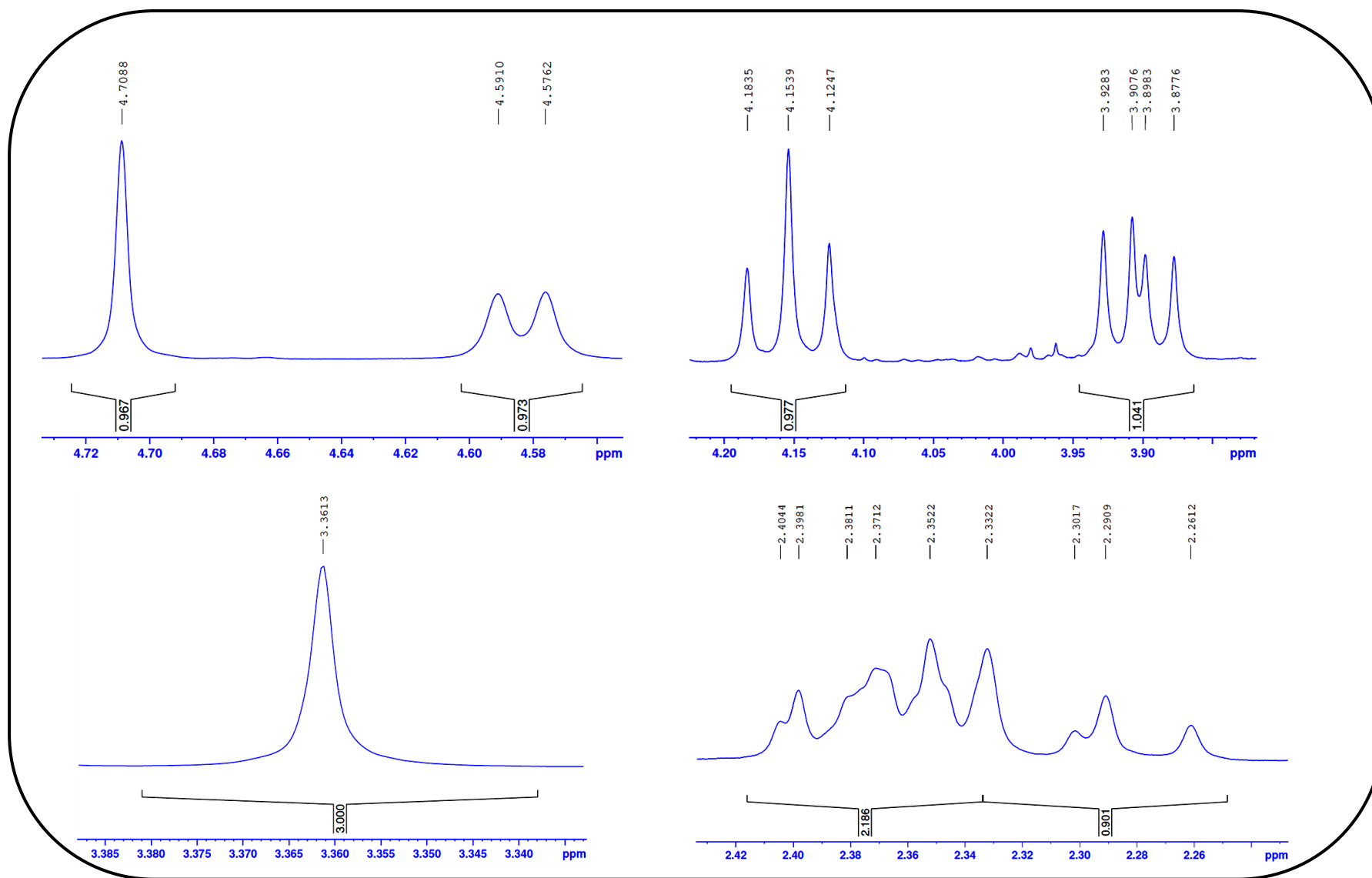
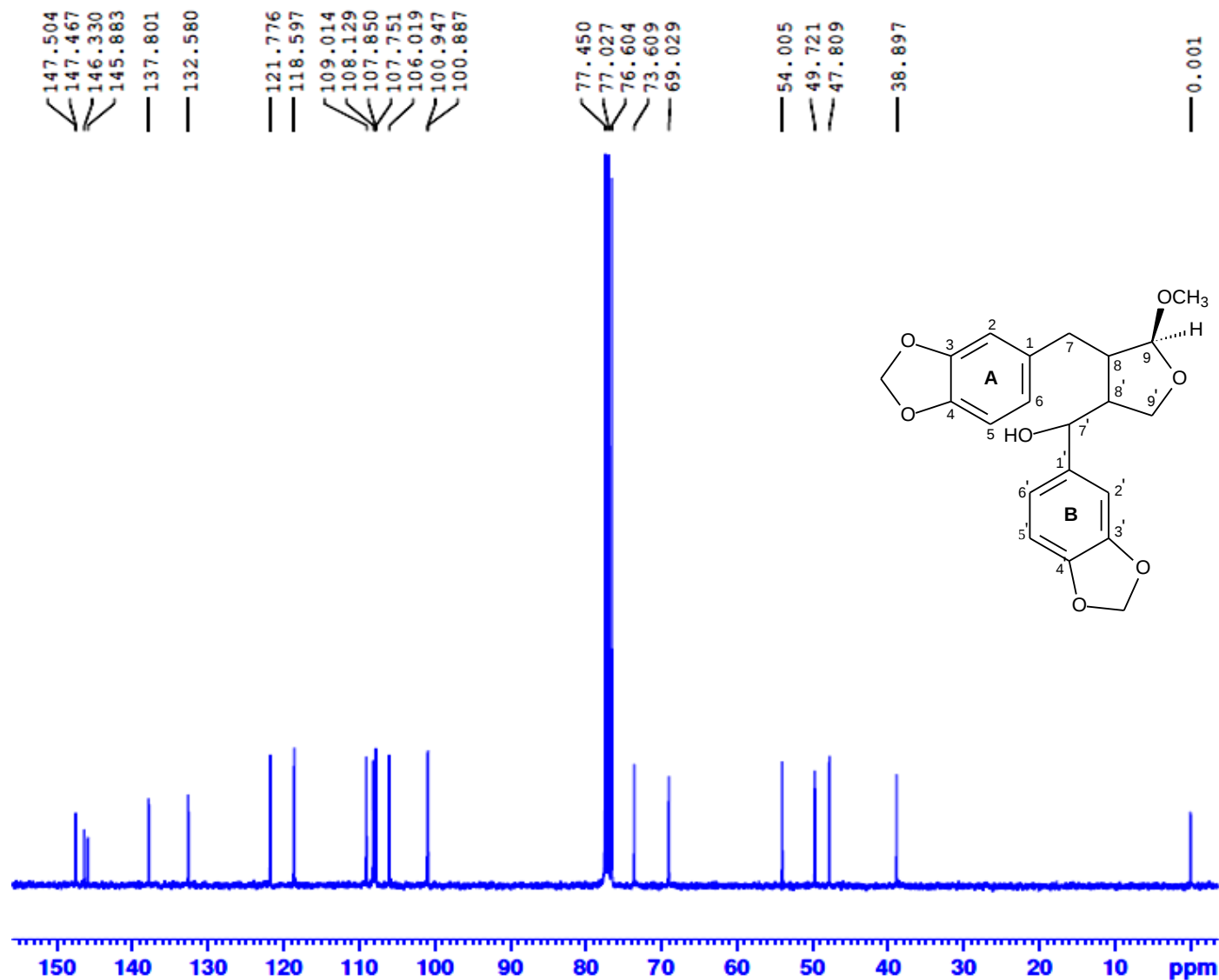


Figura 32. Expansão dos sinais de RMN de ^1H de **PPM-4.10.5.7.6** nas regiões de 4,70 a 2,26 ppm

Figura 33. Espectro de RMN ^{13}C de PPM-4.10.5.7.6 (75 MHz, CDCl_3)



Current Data Parameters
NAME Henrique17_PPM-4.10.5.7.6
EXPNO 2
PROCNO 1

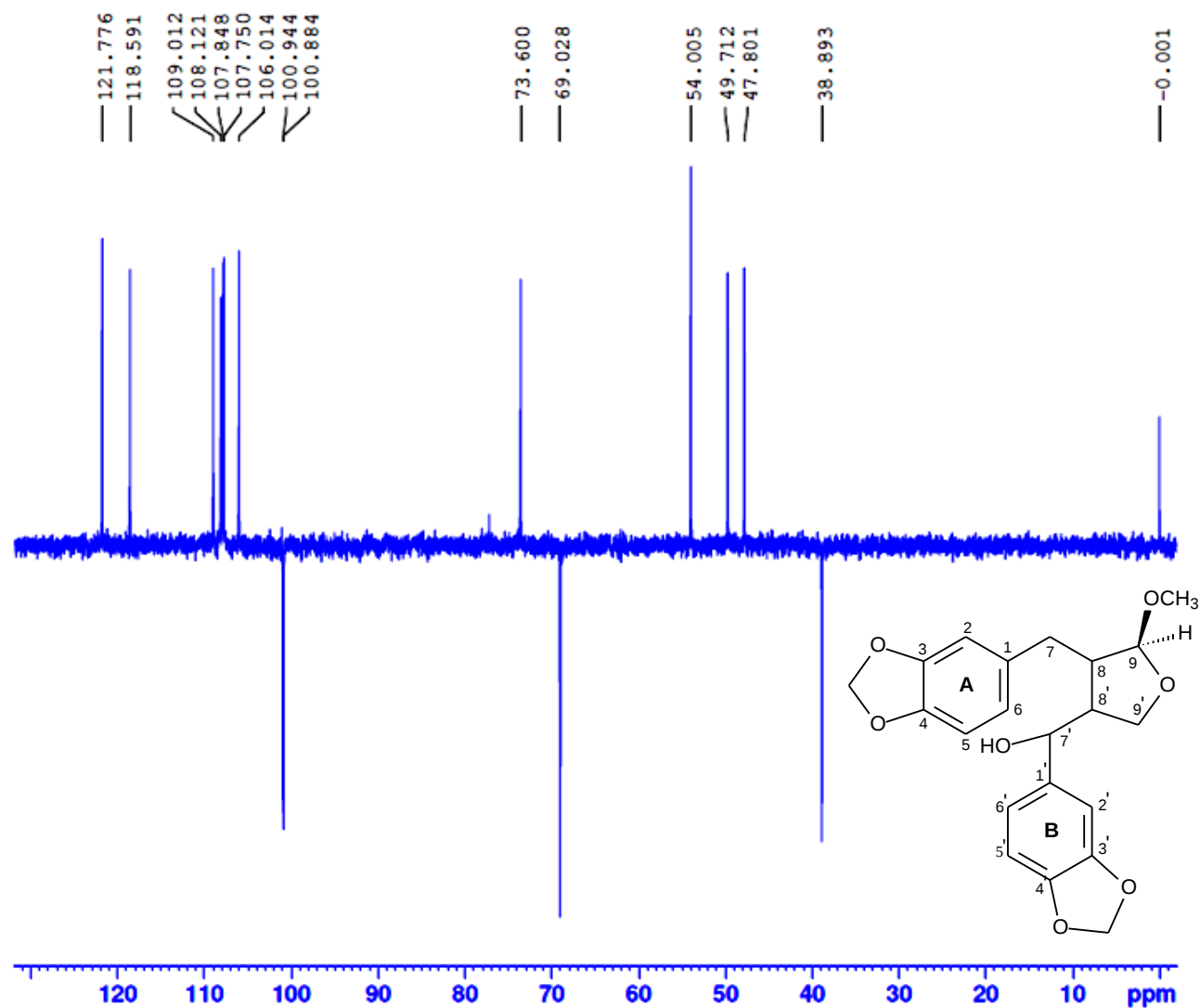
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20170810
Time 10.55
INSTRUM FOURIER300
PROBHD 5 mm DUL 13C-1
PULPROG zgpg30
TD 32768
SOLVENT CDCl_3
NS 9790
DS 0
SWH 24414.063 Hz
FIDRES 0.745058 Hz
AQ 0.6710886 sec
RG 501.187
DW 20.480 usec
DE 10.00 usec
TE 295.7 K
D1 0.50000000 sec
D11 0.03000000 sec
D31 0.00000875 sec
D40 0.01589210 sec
L4 20
L5 14
P32 90.00 usec
TD0 1

===== CHANNEL f1 =====
SFO1 75.4928982 MHz
NUC1 13C
P1 8.75 usec
PLW1 50.00299835 W

===== CHANNEL f2 =====
SFO2 300.2012008 MHz
NUC2 1H
CPDPRG2 waltz16
PCPD2 90.00 usec
PLW2 20.00000000 W
PLW12 0.16806000 W
PLW13 0.13613001 W

F2 - Processing parameters
S1 32768
SF 75.4853500 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.00 Hz
GB 0
PC 1.40

Figura 34. Espectro de Dept-135° de PPM-4.10.5.7.6 (75 MHz, CDCl₃)



Current Data Parameters
NAME Henrique17_PPM-4.10.5.7.6
EXPNO 4
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20170811
Time 9.04
INSTRUM FOURIER300
PROBHD 5 mm DUL 13C-1
PULPROG zgpg30
TD 65536
SOLVENT CDCl3
NS 1230
DS 8
SWH 24414.063 Hz
FIDRES 0.372529 Hz
AQ 1.3421773 sec
RG 501.187
DW 20.480 usec
DE 10.00 usec
TE 295.0 K
CNS2 145.0000000
D1 2.00000000 sec
D2 0.00344828 sec
D14 0.00001114 sec
D33 0.00000825 sec
D34 0.00344053 sec
D35 0.00345340 sec
L4 40
P32 90.00 usec
TD0 1

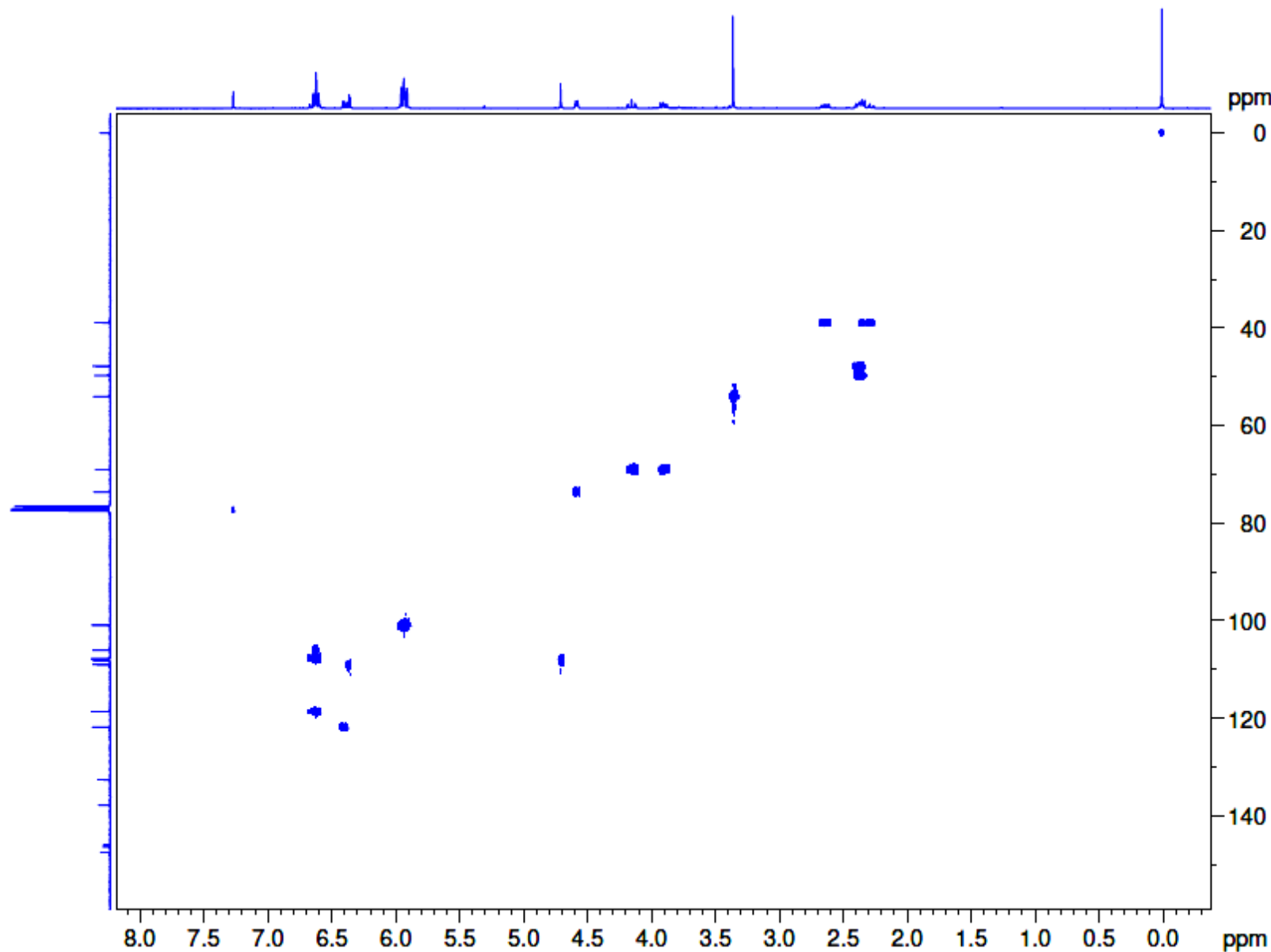
----- CHANNEL f1 -----
SFO1 75.4913881 MHz
NUC1 13C
P1 8.75 usec
P2 17.50 usec
PIN1 50.00299835 W

----- CHANNEL f2 -----
SFO2 300.2009601 MHz
NUC2 1H
CPDPRG2 waltz16
P3 8.25 usec
P4 16.50 usec
PCPD2 90.00 usec
PIN2 20.00000000 W
PIN12 0.16806000 W

F2 - Processing parameters
S1 32768
SF 75.4853500 MHz
WCH KM
SFB 0
LB 1.00 Hz
GB 0
PC 1.40



Figura 35. Mapa de contorno de HSQC de PPM-4.10.5.7.6 (75 MHz, CDCl₃)



Current Data Parameters
NAME Henrique17_PPM-4.10.5.7.6
EXPNO 200
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20170810
Time 15.30
INSTRUM FOURIER300
PROBHD 5 mm QNP 13C-1
PULPROG zgpg30
TD 65536
SOLVENT CDCl₃
NS 64
DS 14
SWH 3051.758 Hz
FIDRES 1.490116 Hz
AQ 0.3355443 sec
RG 50.187
SN 143.840 usec
DS 10.00 usec
TE 295.4 K
CMT2 145.000000
D0 0.0000000 sec
D1 1.0000000 sec
D4 0.0012414 sec
D11 0.0000000 sec
D13 0.0000000 sec
D14 0.0000000 sec
D31 0.0000744 sec
D32 0.0001528 sec
D33 0.0000830 sec
D34 0.0001840 sec
D36 0.0010000 sec
D37 0.0000000 sec
D38 0.0001740 sec
D42 0.0000144 sec
D43 0.0002128 sec
D44 0.0010000 sec
D45 0.0001414 sec
D60 0.0003490 sec
LA 34
P35 75.00 usec

--- CHANNEL f1 ---
SFO1 300.2013509 MHz
NUC1 13
P1 7.44 usec
P2 15.28 usec
PAM1 20.0000000 W

--- CHANNEL f2 ---
SFO2 75.4821437 MHz
NUC2 13C
CPOPRG2 gmrp
P3 9.35 usec
P4 18.60 usec
PCPD2 75.00 usec
PDM2 50.0000000 W
PDM2 0.0032998 W

--- GRADIENT CHANNEL ---
CPHASE1[1] SINE, 100
CPHASE1[2] SINE, 100
CPHASE1[3] SINE, 100
CPE1 80.00 %
CPE2 30.00 %
CPE3 20.10 %
P16 1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters
TD 65536
SFO1 75.48214 MHz
FIDRES 111.824833 Hz
SN 189.777 ppm
PRMODE TPO2

F2 - Processing parameters
S1 4096
SF 300.1999983 MHz
WDW QCFINE
SSB 2
LB 0 Hz
GB 0
PC 1.40

F1 - Processing parameters
S1 4096
MC2 TPO1
SF 75.4821437 MHz
WDW QCFINE
SSB 2
LB 0 Hz
GB 0



Current Data Parameters
NAME Henrique17_PPM-4.10.5.7.6
EXPNO 300
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20170810
Time 21.41
INSTRUM FOURIER300
PROBHD 5 mm DUL 13C-1
PULPROG hmcgcp1pndgqf
TD 2048
SOLVENT CDCl3
NS 128
DS 16
SWH 3051.758 Hz
FIDRES 1.490116 Hz
AQ 0.3355443 sec
RG 501.187
DW 163.840 usec
DE 10.00 usec
TE 296.7 K
CWST2 145.0000000
CWST13 8.0000000
D0 0.00000300 sec
D1 1.00000000 sec
D2 0.00344828 sec
D6 0.06250000 sec
D16 0.00020000 sec
D31 0.00000764 sec
D32 0.00001528 sec
D33 0.00000930 sec
D36 0.00100000 sec
D38 0.00003010 sec
D39 0.00003010 sec
IN0 0.00003010 sec

===== CHANNEL f1 =====
SFO1 300.2013509 MHz
NUC1 13
P1 7.64 usec
F2 15.28 usec
PLW1 20.00000000 W

===== CHANNEL f2 =====
SFO2 75.4932760 MHz
NUC2 13C
P3 9.30 usec
PLW2 50.00000000 W

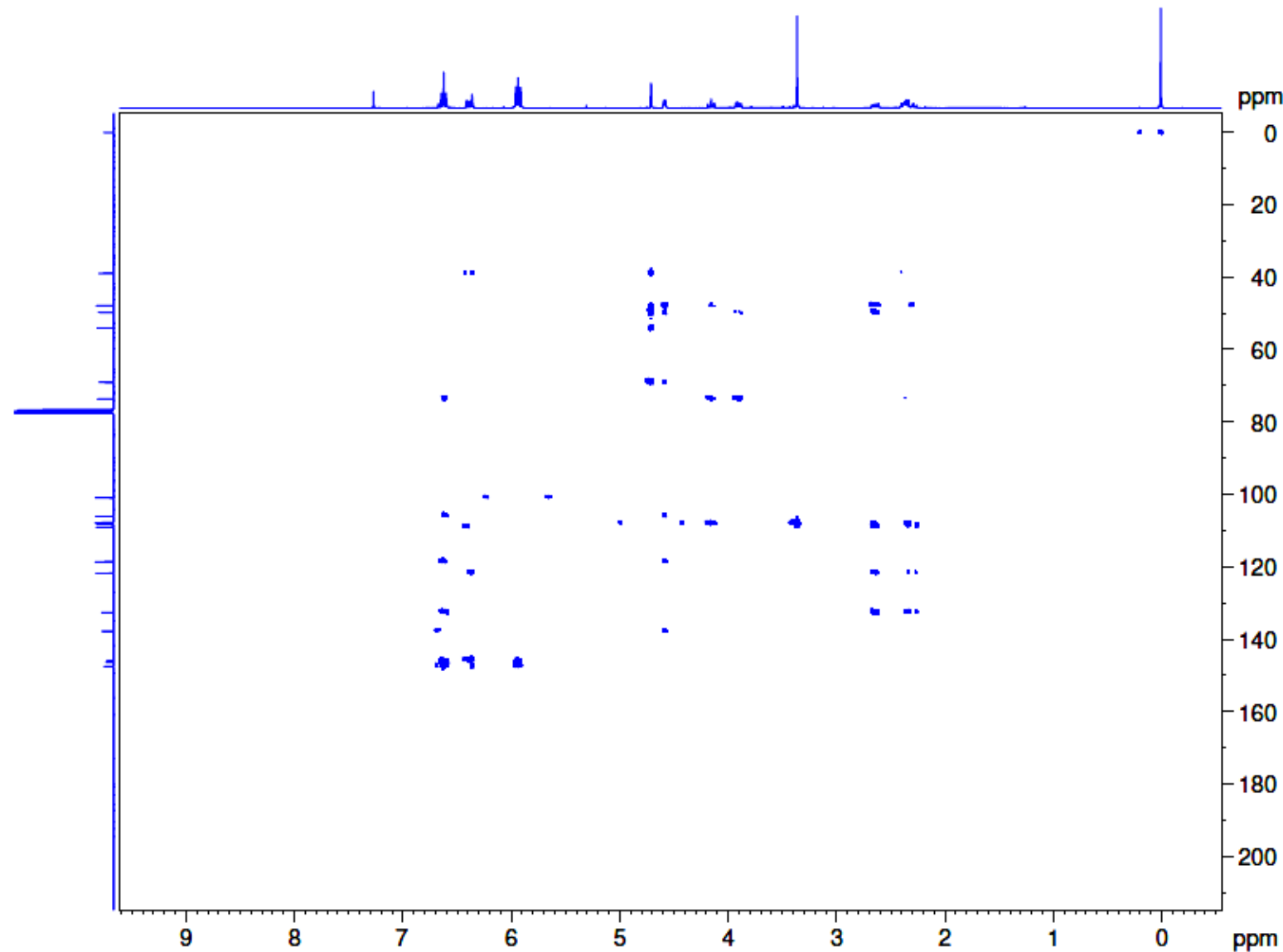
===== GRADIENT CHANNEL =====
CPHASE[1] SINE.100
CPHASE[2] SINE.100
CPHASE[3] SINE.100
GP21 50.00 %
GP22 30.00 %
GP23 40.10 %
P16 1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters
TD 226
SFO1 75.49328 MHz
FIDRES 147.002609 Hz
SW 220.037 ppm
F2MODE QF

F2 - Processing parameters
SI 4096
SF 300.1999911 MHz
WDW SINE
SSB 0
LB 0 Hz
GB 0
PC 1.40

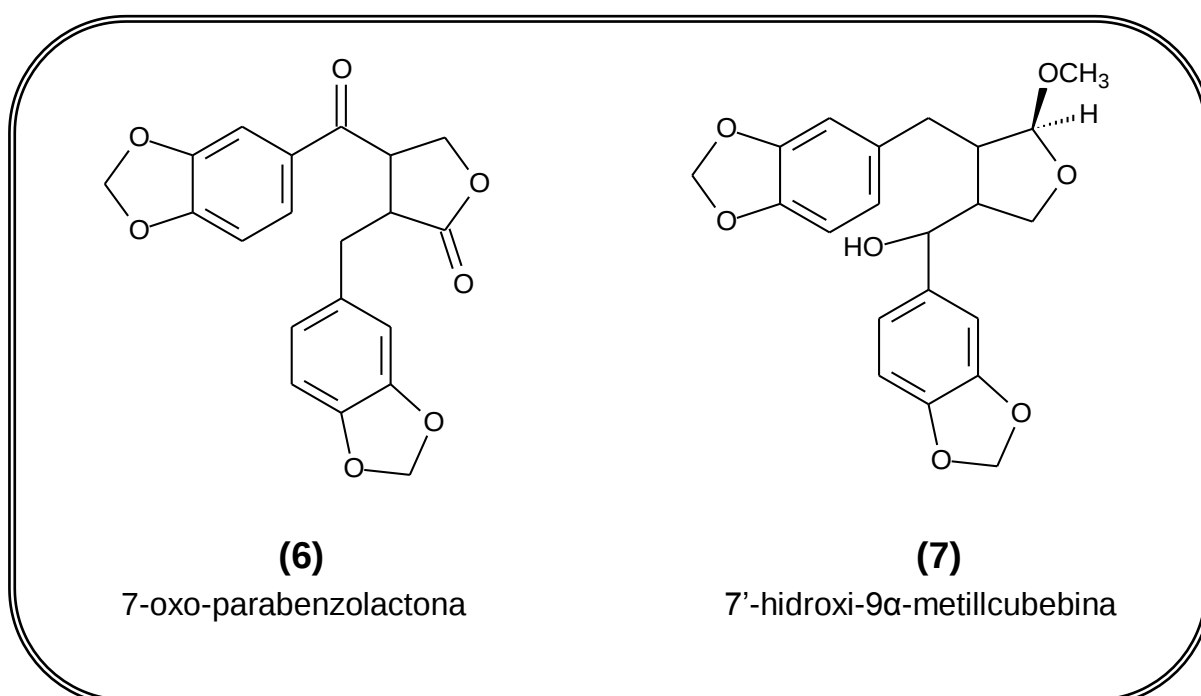
F1 - Processing parameters
SI 4096
MC2 QF
SF 75.4853696 MHz
WDW SINE
SSB 0
LB 0 Hz
GB 0

Figura 36. Mapa de contorno de HMBC de PPM-4.10.5.7.6 (75 MHz, CDCl₃)



5. 3. Atividade antifúngica sobre as cepas de *Cândida* e *Cryptococcus*

Para avaliar atividade antifúngica das substâncias **6** e **7** (Quadro 7), foi realizado o teste de sensibilidade antifúngica pela técnica de microdiluição em caldo, que investigou a Concentração Inibitória Mínima (CIM) das substâncias frente às linhagem de *Candida albicans* (ATCC 60193), *Cryptococcus gattii* (ATCC 32269) *Cryptococcus neoformans* (ATCC 90112).



Quadro 7. Estruturas das lignanas utilizadas no ensaio antifúngico

A Tabela 17 apresenta os resultados encontrados para os testes *in vitro* das lignanas provenientes dos resíduos de madeira de *P. puncticulatum* frente às diferentes linhagens de fungos. Os resultados demonstram que as substâncias **6** e **7** na concentração de 320 µg/ml não apresentaram nenhuma redução do crescimento contra as cepas de *C. albicans*. Entretanto nos testes com as cepas de *C. gattii* e *C. neoformans*, a lignana **6** apresentou inibição de 100% de atividade com a

concentração inicial de 320 µg/ml. A lignana **7** exibiu maior atividade inibitória, pois sua CIM foi observada em 160 µg/ml, mostrando-se mais eficiente em relação a lignana **6**, provavelmente os grupos hidroxilas e a metoxila influenciaram de alguma forma na atividade produzindo a toxicidade aos fungos seja por desativação de enzimas, formação de radicais de oxigênio ativos, alteração na membrana plasmática ou nas proteínas de membrana (BRUNTON et al. 2008).

As lignanas do tipo dibenzilbutirolactona tem sido relatadas pelo potencial antifúngico (PANAGOULEAS et al. 2003) no entanto esse são os primeiros relatos de atividade com as substâncias 7-oxo-parabenzolactona e 7'-hidroxi-9α-metillcubebina.

Tabela 17. Resultados da CIM das substâncias sobre as cepas de fungos

Substância	CIM (µg/ml)		
	<i>Candida albicans</i>	<i>Cryptococcus gattii</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
6	>320	320	320
7	>320	160	160

>Não sensível para essa concentração

6. CONCLUSÃO

O presente estudo cumpriu o objetivo principal que se fundamentou na investigação fitoquímica e biológica dos resíduos da madeira de *Protium puncticulatum* (Breu-vermelho), resultando nas seguintes contribuições científicas:

Os estudos fitoquímicos trouxeram as primeiras informações do perfil químico da madeira de *P. puncticulatum*, com as substâncias da classe dos triterpenos (lupeol, α -amirina e β -amirina), esteroides (β -sitosterol e estigmasterol) e lignanas (7-oxo-parabenzolactona e 7'-hidroxi-9 α -metilcubebina), reforçando a importância no investimento da pesquisa com os resíduos de madeira, visando a preservação de muitas espécies amazônicas que ainda não foram estudadas, mas que tem sido ameaçada pela ação antrópica. As substâncias tiveram suas estruturas propostas a partir de análises por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e por comparação com dados da literatura.

As substâncias identificadas no estudo fitoquímico estão em acordo com a quimiossistemática da família Burseraceae, pois o gênero *Protium* pertence à tribo Protieae produzem substâncias de origem biossintética na rota do acetato (terpenos e esteróides) e do chiquimato (lignanas).

Na busca por substâncias com potencial biológico, as lignanas 7-oxo-parabenzolactona e 7'-hidroxi-9 α -metilcubebina, contribuíram com os primeiros relatos de atividade antifúngica frente as cepas de fungos oportunistas (*Candida albicans*, *Cryptococcus gattii* e *Cryptococcus neoformans*), levando em consideração a literatura consultada. Esse tipo de pesquisa sugere que substâncias com potencial biológico podem surgir a partir de metabolitos secundários isoladas de resíduos de madeira, como da manufatura de pequenos objetos.

A importância de agregar valor aos resíduos madeireiros descartados foi evidenciada no presente trabalho, uma vez que os resíduos serviram como ponto de partida para realizar estudos fitoquímicos, tornando possível conhecer a natureza química da madeira, colaborando assim com a comunidade científica através de informações dos metabolitos secundários que muitas vezes oferecem propriedades farmacológicas importantes. Apesar dos resultados da atividade antifúngica aqui reportada ser apenas de caráter preliminar, espera-se que estimulem estudos posteriores e que estabeleçam o real potencial das lignanas frente a microrganismos causadores de doenças.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADFA, M.; YOSHIMURA, T.; KOMURA, K.; KOKETSU, M. 2010. Antitermite Activities of Coumarin Derivatives and Scopoletin from *Protium javanicum* Burm. f. *Journal of Chemical Ecology*, 36: 720-726.
- ALMEIDA, P. D.; BOLETI, A. P.; RÜDIGER, A. L.; LOURENÇO, G. A.; VEIGA JUNIOR, V.F.; LIMA, E.S. 2015. Anti-Inflammatory Activity of Triterpenes Isolated from *Protium paniculatum* Oil-Resins. *Complementary and Alternative Medicine*, 15: 1-10.
- ANAYA, A. L.; RUBALCAVA, M. M.; ORTEGA, R.C.; SANTANA, C.G.; MONTEERRUBIO, P.N.; BAUTISTA, B.E.; RACHEAL, M.R. 2005. Allelochemicals from *Stauranthus perforates* a Rutaceous tree of the Yucatan Peninsula Mexico. *Phytochemistry*, 66: 487-494.
- APG (Angiosperm Phylogeny Group). <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>. Acesso em 08/09/2016.
- BANDEIRA, P. N.; PESSOA, O.D.; TREVISAN, M.T.S.; LEMOS, T.L. 2002. Metabólitos Secundários de *Protium heptaphyllum* MARCH. *Química Nova*, 25: 1078-1080.
- BANG, K. H, KIM, Y. K, MIN, B. S. 2000. Antifungal activity of magnolol and honokiol. *Archives of Pharmacal Research*, 23: 46-49.
- BARBOSA, A. P.; VIANEZ, B.F.; VAREJÃO, M.J.; ABREU, R.L. 2001. Considerações sobre o perfil tecnológico do setor madeireiro na Amazônia Central. *Parcerias Estratégicas*, 12: 42-61.
- BROWN, G. D.; DENNING, D. W.; GOW, N. A. R.; LEVITZ, S. M.; NETEA, M. G.; WHITE, T. C. 2012. Hidden killers: Human fungal infections. *Science Translational Medicine*, 4: 1-10.
- BRUNTON, L.; PARKER, K.; BLUMENTHAL, D.; BUXTON, I. 2007. *Goodman & Gilman's Manual of Pharmacology and Therapeutics*. 1.ed. New York: MCGraw Hill, 1219p.
- CALIXTO, J. B.; OTUKI, M.F.; LIMA, F.V.; MALHEIROS, A.; CECHINEL-FILHO, V.; MONACHE, F.D.; YUNES, R.A. 2001. Evaluation of the antinociceptive action caused by ether fraction and a triterpene isolated from resin of *Protium kleinii*. *Life Sciences*, 69: 2225–2236.
- CAMPOS, C.S.; ANDRADE, M.C.N. 2011. Aproveitamento de resíduos madeireiros para o cultivo do cogumelo comestível *Lentinus strigosus* de ocorrência na Amazônia. *Acta Amazonica*, 41: 1-8.
- CARVALHO, L.E.; PINTO, D.S.; MAGALHÃES, L.A.M.; LIMA, M.P.; MARQUES, M.O.M.; FACANALI, R. 2010. Chemical Constituents of Essential Oil of *Protium*

decandrum (Burseraceae) from Western Amazon. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 13: 181-184.

CHAVES, M. H.; VIEIRA-JÚNIOR, G. M.; SOUZA, C. M. 2005. Resina de *protium heptaphyllum*: isolamento, caracterização estrutural e avaliação das propriedades térmicas. *Química Nova*, 28: 183-187.

CHANG, C.; SORRELL, T.; CHEN, S. 2015. Pulmonary Cryptococcosis: Semin Respir Crit Care. *Pub Med*, 36: 681- 691.

CÉSPEDES, C. L.; AVILA, J. G.; GARCÍA, A. M.; BECERRA, J.; FLORES, C.; AQUEVEQUE, P.; BITTNER, M.; HOENEISEN, M.; MARTINEZ, M.; SILVA, M. 2006. Antifungal and antibacterial activities of *Araucaria araucana* (MOL.) K. Kosh heartwood lignans. *Zeitschrift für Naturforschung*, 61: 35-43.

CORREIA, M. P. 1984. *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. IBDF , Rio de Janeiro, 646p.

COSTA, T. O.; ALMEIDA, R. A.; KOOLEN, H. H.; SILVA, F. M.; PINTO, A. C. 2015. Constituintes químicos do caule de *Protium hebetatum* (Burseraceae). *Acta amazônica*, 42: 557-560.

COUTO, G. M. 2009. *Utilização de serragens de Eucalyptus sp. na preparação de carvões ativados*. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras - Minas Gerais. 89p.

CLSI - Clinical And Laboratory Standards Institute. 2008. *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts*, CLSI M27 – A3 (28). 3rd ed.

CRAVO, A. B. 1996. Plantas & perfumes: As essências mais usadas. Ed. Hemus, São Paulo, p.33.

DALY, D. C. 1992. New taxa and combinations in *Protium* Burm. F. Studies in neotropical Burseraceae VI. *Brittonia*, 44: 280-299.

DAWSON, A. L, DELLAVALLE, R. P, ELSTON, D. M. 2012. Infectious skin diseases: A review and needs assessment. *Dermatologic Clinics*, 30: 141-51.

DUTRA, I. R; NASCIMENTO, S. M. Resíduos de indústria madeireira: caracterização, consequências sobre o meio ambiente e opções de uso. *Revista científica eletrônica*. Pará, Ed. nº5. 2005. Disponível em < http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/7kc54tJmvnT43W_2013-4-25-14-47-28.pdf>. Acesso em: 03/10/2016.

ENDRINGER, D.C.; ANDRADE, T.U.; LIMA, E.M.; NASCIMENTO, A.M.; LENZ, D.; SCHERER, R.; MEYRELLES, S.S.; BOËCHAT, G.A.P. 2014. Triterpenes from the *Protium heptaphyllum* resin - chemical composition and cytotoxicity. *Revista Brasileira Farmacognosia*, 24: 399-407.

FINE, P. V.; DALY, D. C.; MUNOZ, G. V.; MESONES, I.; CAMERON, K. M. 2005. The contribution of edaphic heterogeneity to the evolution and diversity of Burseraceae trees in the western Amazon. *Evolution*, 59: 1464-1478.

GERTSCH, J.; TOBLER, R. T.; BRUN, R.; STICHER, O.; HEILMANN, J. 2003. Antifungal, antiprotozoal, cytotoxic and piscicidal properties of justicidin B and a new arynaphthalide lignan from *Phyllanthus piscatorum*. *Planta Medica*, 69: 420-424.

GODOY, M. F. .P.; VICTOR, S.R.; BELLINI, A.M.; GUERREIRO, G.; ROCHA, W.C.; BUENO, O.C.; HEBLING, M.J.A.; BACCI-JR, M.; SILVA, M.F.G.F.; VIEIRA, P.C.; FERNANDES, J.B.; PAGNOCCA, F.C. 2005. Inhibition of the symbiotic fungus of leaf-cutting ants by coumarins. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 16: 669-672.

GOMES, R. F. 2015. *Avaliação dos constituintes químicos em resíduos madeireiros de Inga alba Willd. e Inga paraensis Ducke*. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus-AM. 132p.

GUIMARÃES, A.C.; SIANI, A.C. 2007. Triterpenos das folhas de *Protium strumosum*. *Fitos*, 3: 67-76.

HAMDAN, J. S, HAHN, R. C. 2006. Antifungal drugs for systemic mycosis: an overview of mechanism of action and resistance. *Anti-infective Agents in Medicinal Chemistry*, 5: 403-412.

HAMERSKI, L.; DIAS, M. O.; PINTO, A. C. 2011. Separação semipreparativa de α e β -amirina por cromatografia líquida de alta eficiência. *Química Nova*, 34: 704-706.

HWANG, B.; CHO, J.; HWANG, I. S.; JIN, H. G.; WOO, E. R.; LEE, D. G. 2011. Antifungal activity of lariciresinol derived from *Sambucus williamsii* and their membrane-active mechanisms in *Candida albicans*. *Biochemical Biophysical Research Communications*, 410: 489-493.

HAY, R. J. 2006. Fungal infections. *Journal Clinics in Dermatology*, 24: 201–212.

HAYASIDA, W.; SOUSA, A. S.; LIMA, M.P.; NASCIMENTO, C. C.; FERREIRA, A.G. 2011. Resíduos madeireiros do alburno de pau-rainha (*Brosimum rubescens*): Investigação de metabólitos secundários e alguns aspectos tecnológicos. *Acta Amazonica*, 41: 285-288.

HAYASIDA, W.; SOUSA, A. S.; LIMA, M. P.; NASCIMENTO, C. C.; FERREIRA, A. G. 2008. Proposta de aproveitamento em resíduos de pau-rainha (*Brosimum rubescens*) descartados pelo setor madeireiro. *Acta Amazonica*, 38:749-752.

KHALID, S. A. 1983. Chemistry of the Burseraceae. In: Waterman, P.G.; Grundon, M F. (Eds). *Chemistry and Chemical taxonomy of the Rutales*. Academic Press, New York, p. 281-299.

HWANG, B.; LEE, J.; LIU, Q. H.; WOO, E. R.; LEE, D. G. 2010. Antifungal effect of (+)-pinioresinol isolated from *Sambucus williamsii*. *Molecules*, 15: 3507-3516.

KIMURA, I.; YOSHIKAWA, M.; KOBAYASHI, S.; SUGIHARA, Y.; SUZUKI, M.; OOMINAMI, H.; MURAKAMI, T.; MATSUDA, H.; DOIPHODE, V.V. 2001. New triterpenes, myrrhanol A and myrrhanone A, from guggul-gum resins, and their potent anti-inflammatory effect on adjuvant-induced air-pouch granuloma of mice. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 11: 985–989.

LANGENHEIM, J. H. Plant Resins: Chemistry, Evolution, Ecology and Ethnobotany. Portland: Timber Press. 2003. 586 p.

LIMA, M. P.; CASTRO, F.B.; SILVA, M. F.; FERREIRA, A. G.; FO, E. R.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C. 2002. Phytochemistry of *Crepidospermum rhoifolium*, *Tetragastris altissima*, *Protium icariba* and *P. apiculatum*:: CHEMOSYSTEMATIC IMPLICATIONS. *Revista Latinoamericana Química*, 29: 135-144.

LIMA, M. P.; BRAGA, P. A.; MACEDO, M. L.; SILVA, M. F.; FERREIRA, A. G.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C. 2004. Phytochemistry of *Trattinnickia burserifolia*, *T. rhoifolia*, and *Dacryodes hopkinsii*: Chemosystematic Implications. *Journal of the Brazilian Chemical*, 15: 385-394.

LIMA, F. V.; MALHEIROS, A.; OTUKI, M. F.; CALIXTO, J. B.; YUNES, R. A.; CECHINEL-FILHO, V.; Franco Delle MONACHE. 2005. Three New Triterpenes from the Resinous Bark of *Protium kleinii* and their Antinociceptive Activity. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 16: 578-582.

LIMA, M.P.; LIMA, T.A.; ROCHA, K.R.; MELO, M.F.; MARQUES, M.O. 2014. Aspectos morfológicos e químicos de *Protium spruceanum*: uma contribuição ao conhecimento de espécies aromáticas do bosque da ciência do inpa. *Scientia Amazonia*, 3: 6-10.

LIMA, M.P.; LIMA, T.A.; RIBEIRO, J.E.; MARQUES, M.O.; FACANALI, R.; 2016. Estimulo para produção de resina em *Protium hebetatum* Daly e avaliação dos constituintes químicos voláteis. *Scientia Amazonia*, 5: 21-24.

LOKVAM, J.; FINE, P.V.A. 2012. An Oxidized Squalene Derivative from *Protium suberratum* Engl. (Engl.) Growing in Peru. *Molecules*, 17: 7451-7457.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. 2002. *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas*. 2nd ed. Nova Odessa, São Paulo, 512p.

MACHADO, L.B.; ZOGHBI, M.G.B.; ANDRADE, E.H.A. 2003. Seasonal variation in the composition of the essential oils from the leaves, thin branches and resin of *Protium spruceanum* (Benth.) Engl. *Flavour and Fragrance Journal*, 18: 338-341.

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

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.

MARCO, J.A.; CERVERA, J.S.; MORANTE, M.D.; LLISO, V.G.; IRAU, J.V.; JASMIN JAKUPOVIC, J. 1996. Tricyclic sesquiterpenes from *Artemisia chamaemelifolia*. *Phytochemistry*, 41: 837- 844.

MARQUES, D. D.; GRAEBNER, I. B.; LEMOS, T. L.; MACHADO, L. L.; ASSUNÇÃO, J.C.; MONTE, F.J. 2010. Triterpenes from *Protium hebetatum* resin. *Natural Product Communications*, 5: 1181-1182.

MARQUES, M.O.M.; YOSHIDA, M. 1990. Estrutura de propacina. *Química nova*, 13: 245-246.

MELO, L.E.S. 2016. *Estudos químicos de resíduos madeireiros de Tabebuia serratifolia (Vahl) G. Nicholson, Acacia mangium willd. e Dipteryx polyphylla huber*. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus-AM. 206p.

MMA. Ministério do Meio Ambiente. Biodiversidade Brasileira. Disponível em <<http://www.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-brasileira>>. Acesso em: 12 de novembro de 2016

MORA, A.J.; DELGADO, G.; DELGADO, G.D.; USUBILLAGA, A.; KHOURI, N.; BAHSAS, A. .2001. 3- α -Hydroxytirucalla-7,24-dien-21-oic acid: a triterpene from *Protium crenatum* Sandwith. *Acta Crystallographica C*, 57: 638-640.

NASCIMENTO, C.C. 2007. *Artefatos de madeira tipo exportação*. Revista Amazonas Ciência - Especial Pappe, 3: 23-27.

OLIVEIRA, F.A.; VIEIRA JR, G.M.; CHAVES, M.H.; ALMEIDA, F.R.; FLORÊNCI, M.G.; LIMA, JR, R.C.; SILVA, R.M.; SANTOS, F.A.; RAO, V.S. 2004. Gastroprotective and anti-inflammatory effects of resin from *Protium heptaphyllum* in mice and rats. *Pharmacological Research*, 49: 105–111.

PANAGOULEAS, C.; SKAL TSA, H.; LAZARI, D.; SKAL TSOUNIS, A. L.; SOKOVIC, M. 2003. Antifungal activity of secondary metabolites of *Centaurea raphanina* ssp. mixta, growing wild in greece. *Pharmaceutical Biology*. 41: 266-270.

PERNET, R. 1972. Phytochimie des Burseracees. *Journal of Natural Products (Lloydia)*, 35: 280-287.

PINTO, D.S.; CARVALHO, L.E.; LIMA, M.P.; MARQUES, M.O.M.; FACANALI, R.; RIBEIRO, J.E.L.S. 2010. Volatiles of Foliar Rachis, Branches and Resin Elicited by Insects from *Protium hebetatum* Grows Wild in Amazon. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 13: 699-703.

RAMOS, M.F.S.; SIANI, A.C.; TAPPIN, M.R.R.; GUIMARÃES, A.C.; RIBEIRO, J.E.L.S. 2000. Essential oils from oleoresins of *Protium* spp. of the Amazon region. *Flavour and Fragrance Journal*, 150: 383-387.

SALES, C.C.; ABREU, R.L.S.; VIANEZ, B.F. 2000. Indústrias madeireiras de Manaus, Amazonas, Brasil. *Acta Amazonica*, 30: 319-331.

SHEN, T.; LOU, H.X. 2008. Bioactive constituents of myrrh and frankincense, two simultaneously prescribed gum resins in chinese traditional medicine. *Chemistry & Biodiversity*, 5: 540-553.

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

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

SILVA, J.R; ZOGHBI, M.G.; PINTO, A.C.; GODOY, R.L; AMARAL, A.C. 2009. Analysis of the Hexane Extracts From Seven Oleoresins of *Protium* Species. *Journal of Essential Oil Research*, 21: 305-308.

SIQUEIRA, J.B.G.; ZUGHBI, M.G.B.; CABRAL, J.A.; WILSONW, W. FILHO. 1995. Lignans From *Protium Tenuifolium*. *Journal of Natural*, 58: 730-732.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. 2005. *Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado na APG II*. 2nd ed. Nova Odessa, Instituto Plantarum, 640p.

SUN L, LIAO K, WANG, D. 2015. Effects of magnolol and honokiol on adhesion, yeast-hyphal transition, and formation of biofilm by *Candida albicans*. *Plos One*, 10: 117-695.

SUN, L.; CHEN, H.; SHAO, C.; SONG, Y.; BAI, C. 2014. Pulmonary cryptococcosis with trachea wall invasion in an immunocompetent patient: a case report and literature review. *Respiration*, 87: 324-328.

SUSUNAGA, G.S.; SIANI, A.C.; PIZZOLATTI, M.G.; YUNES, R.A.; MONACHE, F.D. 2001. Triterpenes from the resin of *Protium heptaphyllum*. *Fitoterapia*, 72: 709-711.

TORTORA, G. J, FUNKE, B. R, CASE, C. L. 2005. Microbiologia, 8ª Ed, Editora Artmed, Porto Alegre, p. 894.

TENG, C.M.; LI, H.L.; WU, T.S.; HUNG, S.C.; HUNG, T.F. 1992. Antiplatelet actions of some coumarin compounds isolated from plant sources. *Thrombosis research*, 66: 549-557.

TROPICOS.ORG. *Missouri Botanical Garden*. 2016. Disponível em: <<http://www.tropicos.org>>. Acesso em: 25 outubro de 2016.

VIEIRA, R.S. 2006. Pequenos objetos de madeira de eucalipto: possibilidade de aproveitamento de resíduo. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 99p.

WIECHETECK, M. 2009. Aproveitamento de resíduos e subprodutos florestais, alternativas tecnológicas e propostas de políticas ao uso de resíduos florestais para fins energéticos. PNUD. Curitiba-PR, 40p.

ZOGHBI, M.G.B.; ANDRADE, E.H.A. 2002. Composition of the essential oils from leaves, woods, fruits and resin of *Protium spruceanum* (Benth.) Engl. *Journal of Essential Oil Research*, 14: 169-171.

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

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 in Guinea-Pig Ileum and Isolation of a Diterpeno Lignan Hybrid. *Journal Natural Products*, vol. 71, pag. 1167-1172, 2008.

ZHOU, P.; FU, J.; HUA, H.; LIU, X. 2017. In vitro inhibitory activities of magnolol against *Candida* spp. *Drug Design, Development and Therapy*, 11: 2653–2661.