

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**RESÍDUOS MADEIREIROS DE *Pithecellobium racemosum*  
DUCKE: INVESTIGAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS,  
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E  
PROPRIEDADES TECNOLÓGICAS.**

PRISCILA BRASIL AUGUSTO DE SOUZA

MANAUS-AMAZONAS

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

PRISCILA BRASIL AUGUSTO DE SOUZA

**RESÍDUOS MADEIREIROS DE *Pithecellobium racemosum*  
DUCKE: INVESTIGAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS,  
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E  
PROPRIEDADES TECNOLÓGICAS**

Orientadora: Dra. Maria da Paz Lima (INPA)

MANAUS-AMAZONAS

2019

## Ficha Catalográfica

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

S729r Souza, Priscila Brasil Augusto de  
Resíduos madeireiros de *Pithecellobium racemosum* Ducke:  
investigação dos constituintes químicos, avaliação da atividade  
antibacteriana e propriedades tecnológicas. / Priscila Brasil Augusto  
de Souza. 2019  
107 f.: il. color; 31 cm.

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

1. Fabaceae. 2. Esteroides. 3. Triterpenos. 4. Ensaios  
antimicrobianos. 5. Mimosoideae. I. Lima, Maria da Paz II.  
Universidade Federal do Amazonas III. Título

Aos meus pais, **Carolina Brasil da Silva** e **Zilmar Augusto de Souza**, pelo amor incondicional, apoio, amizade e incentivo em todos os momentos, e aos meus queridos avós **Isabel Brasil**, **Cyla Evangelista**, **Armando Osaki** e **Zeferino Augusto**.

DEDICO

## AGRADECIMENTOS

Em poucas palavras gostaria de expressar toda minha gratidão à **Deus** que é bom o tempo todo e que tem me dado forças quando preciso.

Aos meus pais, **Zilmar Augusto** e **Carolina Brasil**, por todo apoio e amor incondicional que me proporcionam. Muita honra em ser a “Pitila” e a “Lane” de vocês. Vocês são a razão do meu esforço!

Ao meu noivo **Francisco Jimmy**, por todo amor, dedicação, paciência e companheirismo. Muito obrigada por me ajudar e me esperar por horas a fio no laboratório. Você sabe como me fazer feliz meu companheiro de vida e dança!

Aos meus irmãos, **Patricia Brasil**, **Vanessa Learte**, **Williams Fellipe** e **Zilmar Augusto** por acreditarem em mim e por serem os melhores irmãos que eu poderia ter.

Aos meus sobrinhos, **Arthur Hernan** e **Evelyne Rocha**, meus pequeninos que a titia tanto ama!

À Dra. **Maria da Paz Lima**, por ter me aceitado como aluna de mestrado mesmo sem me conhecer. Muito obrigada por confiar no meu trabalho e por ser a melhor orientadora de pesquisa. A senhora é certamente minha mãe científica!

Aos meus colegas de laboratório, **Henrique Cativo**, **Jeniffer Santiago**, **Paulo Alan**, **Daniele Roque**, **Junior Chaves** e **Ayrton Telles** pelas contribuições, companheirismo e pelos momentos de alegria. Vocês foram muito importantes nessa caminhada, em especial o Henrique que sempre foi muito proativo em auxiliar nas técnicas unidimensionais e bidimensionais.

Aos professores da banca de qualificação, **Profa. Dra. Rita Nunomura** e **Prof. Dr. Joel Passos**, e aos professores da banca de defesa **Profa. Dra. Cecília Verônica Nunez** e **Profa. Dra. Jaqueline Bezerra**, por todas as sugestões e orientações dadas para a conclusão desse trabalho. Vocês foram imprescindíveis!

Aos professores, **Prof. Dr. Paulo Couceiro**, **Profa. Dra. Sidilene Farias** e **Prof. Dr. Marcos Machado** por todo apoio durante a graduação e ensinamentos

que contribuíram bastante para ampliar minha visão sobre o ofício de ser professora em Química. Vocês me mostraram que é possível amar o que se faz.

À Dra. **Claudete Cantanhede** e ao **Dr. Jorge Alves**, por terem me dado todo o suporte com relação aos resíduos madeireiros.

Às minhas amigas **Lídia Kézia** e **Rafaela Máximo** que há muitos anos estão do meu lado. Obrigada por serem minhas amigas desde o ensino médio e por confiarem em mim.

Ao meu amigo **Davi Santos**, pelas horas de estudos, companhia durante todo o mestrado, por me auxiliar em algumas análises e pela incrível amizade que construímos. Serei eternamente grata por todos os conselhos e conversas distraídas que tivemos durante essa jornada.

Aos meus amigos desde a graduação, **Rosane Bindá, Jean Michel, Davi Santos, Nilton Ortiz, Giancarlo Nascimento** e **Priscila Duarte**, minha eterna gratidão por tornarem minha caminhada mais leve. Obrigada por todas as palavras de incentivos e principalmente por tentarem me compreender nos momentos que eu estava ocupada na realização desse trabalho. Amo cada um de vocês!

Às minhas colegas de trabalho do Colégio Militar da Polícia Militar I, **Géssika Cavalcante, Orleane Lima** e **Regiane Neres**, por todo companheirismo, pelos cafés e almoços com direito a conversas descontraídas. Vocês são demais meninas!

Aos técnicos da Central Analítica do Laboratório Temático de Química de Produtos Naturais (CA-LTQPN) do INPA, **Magno Muniz** e **Zelina Torres** por me tirarem dúvidas e pelo suporte na obtenção dos espectros de RMN e EM.

À **FIOCRUZ-AM** por contribuir com os ensaios biológicos.

À **Central Analítica da UFAM** com o experimento espectroscópico.

Ao **INPA** pela estrutura física oferecida e oportunidade de trabalho.

E por fim, à **CAPES** pelo auxílio financeiro através da bolsa de estudos, pois sem ela, esta conquista não seria possível.

## RESUMO

A família Fabaceae compreende cerca de 727 gêneros e 19.325 espécies no mundo contendo muitos relatos na literatura sobre os estudos fitoquímicos de várias espécies, porém há uma escassez sobre a composição química de suas madeiras. O gênero *Pithecellobium* possui aproximadamente 120 espécies, no entanto os estudos químicos são limitados à dezessete espécies cujos relatos são de flavonoides, triterpenos, esteroides, saponinas e cumarinas. Visando contribuir para o estudo fitoquímico da família Fabaceae e do gênero *Pithecellobium*, a madeira de *Pithecellobium racemosum* foi submetida ao estudo fitoquímico e ensaio antibacteriano. O fracionamento cromatográfico dos extratos hexânico, metanólico e hidroalcoólico dos resíduos de *P. racemosum* resultou no isolamento e identificação da espinasterona, espinasterol, derivado esterificado do espinasterol, ácido oleanólico e ácido-3 $\alpha$ ,21 $\alpha$ -dihidroxi-olean-12-en-28-óico, sendo este o primeiro relato da espinasterona, ácido oleanólico e ácido-3 $\alpha$ ,21 $\alpha$ -dihidroxi-olean-12-en-28-óico no gênero *Pithecellobium*. As substâncias isoladas foram identificadas por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) uni e bidimensional.

**Palavras-chaves:** Fabaceae; Esteroides; Triterpenos; Ensaios antimicrobianos.

## ABSTRACT

The Fabaceae family comprises about 727 genera and 19,325 species in the world containing many reports in the literature about the phytochemical studies of various species, however there is a shortage on the chemical composition of their woods. The genus *Pithecellobium* has approximately 120 species, however chemical studies are limited to seventeen species whose reports are of flavonoids, triterpenes, steroids, saponins and coumarins. In order to contribute to the phytochemical study of the Fabaceae family and the genus *Pithecellobium*, the wood of *Pithecellobium racemosum* was submitted to a phytochemical study and antibacterial assay. The chromatographic fractionation of hexane, methanolic and hydroalcoholic extracts of *P. racemosum* residues resulted in the isolation and identification of spinasterone, spinasterol, esterified derivative of spinasterol, oleanolic acid and 3 $\alpha$ ,21 $\alpha$ -dihydroxy-olean-12-en-28-oic, this being the first report of spinasterone, oleanolic acid and 3 $\alpha$ ,21 $\alpha$ -dihydroxy-olean-12-en-28-oic in the genus *Pithecellobium*. The isolated substances were identified by uni and bidimensional Nuclear Magnetic Resonance (NMR).

**Keywords:** Fabaceae; Steroids; Triterpenes; Antimicrobial assays.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Distribuição das espécies da subfamília Mimosoideae no mundo. ...	18
<b>Figura 2.</b> Ocorrência da <i>P. racemosum</i> nas regiões brasileiras. ....	30
<b>Figura 3.</b> Sentido radial e tangencial da madeira. ....	37
<b>Figura 4.</b> Material vegetal concedido pelo Laboratório de Tecnologia da Madeira (COTI-INPA).....	38
<b>Figura 5.</b> Macrofotografia do plano Transversal (10 X) de <i>Pithecellobium racemosum</i> Ducke. ....	53
<b>Figura 6.</b> Estrutura da Espinasterona. ....	57
<b>Figura 7.</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de PRH-13. ....	59
<b>Figura 8.</b> Ampliação dos sinais de RMN de <sup>1</sup> H de PRH-13 na região de hidrogênios olefínicos.....	60
<b>Figura 9.</b> Ampliação dos sinais de RMN de <sup>1</sup> H de PRH-13 na região de hidrogênios metílicos.....	60
<b>Figura 10.</b> Espectro de RMN de <sup>13</sup> C PRH-13 (75 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	61
<b>Figura 11.</b> Mapa de correlações de HSQC editado de PRH-13. ....	62
<b>Figura 12.</b> Ampliação da região de hidrogênios metílicos do mapa de correlação de HSQC-edit de PRH-13. ....	63
<b>Figura 13.</b> Ampliação da região de hidrogênios olefínicos do mapa de correlação de HSQC-edit de PRH-13. ....	63
<b>Figura 14.</b> Mapa de correlações de HMBC de PRH-13.....	64
<b>Figura 15.</b> Sólido branco da subfração 3 (PRH-22.3) e CCD. ....	65
<b>Figura 16.</b> Estrutura do Espinasterol. ....	66
<b>Figura 17.</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de PRH-22.3. ....	68
<b>Figura 18.</b> Ampliação dos sinais de RMN de <sup>1</sup> H de PRH-22.3 na região de ...	69

<b>Figura 19.</b> Ampliação dos sinais de RMN de $^1\text{H}$ de PRH-22.3 na região de hidrogênios metílicos.....	69
<b>Figura 20.</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ de PRH-22.3 (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	70
<b>Figura 21.</b> Espectro de Massas de Alta Resolução de PRH-22.3 (ESI, modo positivo).....	71
<b>Figura 22.</b> Estrutura do $3\beta$ -nonanoato de espinasterol.....	73
<b>Figura 23.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ de PRM-16 (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	75
<b>Figura 24.</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ de PRM-16 (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ ). .....	76
<b>Figura 25.</b> Espectro de DEPT-135° de PRM-16 (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	77
<b>Figura 26.</b> Mapa de correlações de HSQC de PRM-16 (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ ). .....	78
<b>Figura 27.</b> Mapa de correlações de HMBC de PRM-16 (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	79
<b>Figura 28.</b> Ampliação do mapa de contornos de HMBC de PRM-16.....	80
<b>Figura 29.</b> Espectro de Massas da substância 3 (ESI, modo positivo). .....	82
<b>Figura 30.</b> Estrutura do ácido oleanólico. ....	84
<b>Figura 31.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ de PRM-40 (300 MHz, Piridina).....	86
<b>Figura 32.</b> Ampliação dos sinais de RMN de $^1\text{H}$ de PRM-40 na região do H-12, H-3 e H-18, respectivamente.....	87
<b>Figura 33.</b> Ampliação dos sinais de RMN de $^1\text{H}$ de PRM-40 na região dos hidrogênios metílicos.....	87
<b>Figura 34.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (75 MHz, Piridina) da substância 4. ....	88
<b>Figura 35.</b> Mapa de contornos de HSQC de PRM-40 (75 MHz, Piridina).....	89
<b>Figura 36.</b> Mapa de contornos de HMBC de PRM-40. ....	90
<b>Figura 37.</b> Espectro de Massas de Alta Resolução da substância 4 e proposta de fragmentação (ESI, modo positivo). .....	91
<b>Figura 38.</b> Estrutura do ácido- $3\alpha,21\alpha$ -dihidroxi-olean-12-en-28-óico. ....	93

<b>Figura 39.</b> RMN de $^1\text{H}$ de PRM-44.10 (300 MHz, Acetona).....	98
<b>Figura 40.</b> Datos de RMN de $^{13}\text{C}$ de PRM-44.10 (75 MHz, Acetona).....	99
<b>Figura 41.</b> Mapa de contornos de HSQC de PRM-44.10 (75 MHz, Acetona).	100

## LISTA DE TABELA

<b>Tabela 1.</b> Esteroides e triterpenos relatados no gênero <i>Pithecellobium</i> . ....	20
<b>Tabela 2.</b> Cumarinas identificados em <i>P. dulce</i> e <i>P. multiflorum</i> . ....	22
<b>Tabela 3.</b> Saponinas isolados e identificadas em <i>P. dulce</i> e <i>P. lucidum</i> . ....	23
<b>Tabela 4.</b> Classes de flavonoides identificados no gênero <i>Pithecellobium</i> . ....	26
<b>Tabela 5.</b> Reunião das frações de PRH-22. ....	40
<b>Tabela 6.</b> Reunião das frações de PRH. ....	42
<b>Tabela 7.</b> Reunião das frações de PRM. ....	44
<b>Tabela 8.</b> Reunião das frações de PRM-44. ....	46
<b>Tabela 9.</b> Reunião das frações de PRM-54.4.7. ....	48
<b>Tabela 10.</b> Reunião das frações obtidas de PRMA. ....	49
<b>Tabela 11.</b> Reunião das frações obtidas de PRMA-5. ....	49
<b>Tabela 12.</b> Reunião das frações obtidas de PRMA-5.3. ....	50
<b>Tabela 13.</b> Lista das cepas bacterianas gram-positivas. ....	51
<b>Tabela 14.</b> Critério de avaliação da atividade antimicrobiana, pelo método de difusão em ágar. ....	52
<b>Tabela 15.</b> Códigos e massas dos extratos madeireiros de <i>P. racemosum</i> . ...	56
<b>Tabela 16.</b> Dados de RMN de <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C e HMBC da espinasterona. ....	58
<b>Tabela 17.</b> Dados de RMN de <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C do espinasterol. ....	67
<b>Tabela 18.</b> Dados de RMN de <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C do 3β-nonanoato de espinasterol. ....	74
<b>Tabela 19.</b> Dados de RMN de <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C e HMBC do ácido oleanólico. ....	85
<b>Tabela 20.</b> Dados de RMN de <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C do ácido-3α,21α-dihidroxi-olean-12-en-28-óico. ....	94

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1.</b> Estruturas dos esteroides e triterpenos relatados no gênero <i>Pithecellobium</i> .....	21
<b>Quadro 2.</b> Estruturas das cumarinas relatadas no gênero <i>Pithecellobium</i> .....	23
<b>Quadro 3.</b> Estruturas das saponinas identificadas no gênero <i>Pithecellobium</i> .....	24
<b>Quadro 4.</b> Flavonoides relatados no gênero <i>Pithecellobium</i> .....	28
<b>Quadro 5.</b> Metabólitos secundários identificados em <i>P. racemosum</i> .....	31
<b>Quadro 6.</b> Propriedades tecnológicas de <i>Pithecellobium racemosum</i> .....	54
<b>Quadro 7.</b> Metabólitos secundários identificados em <i>P. racemosum</i> .....	55

## LISTA DE ESQUEMAS

<b>Esquema 1.</b> Obtenção dos extratos da amostra de <i>Pithecellobium racemosum</i> . .....	39
<b>Esquema 2.</b> Fracionamento cromatográfico de PRH. ....	41
<b>Esquema 3.</b> Fracionamento cromatográfico de PRM. ....	43
<b>Esquema 4.</b> Fracionamento cromatográfico de PRM-44. ....	45
<b>Esquema 5.</b> Fracionamento cromatográfico de PRM-54.4.7.8. ....	47
<b>Esquema 6.</b> Fracionamento cromatográfico de PRMA. ....	48
<b>Esquema 7.</b> Fracionamento cromatográfico de PRMA-5.3. ....	50
<b>Esquema 8.</b> Proposta de fragmentação do 3 $\beta$ -nonanoato de espinasterol. ....	81

## LISTA DE LISTAS

<b>Lista 1.</b> Sinonímias da espécie <i>Pithecellobium racemosum</i> . .....	30
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcOEt – Acetato de etila

CC – Cromatografia em Coluna

CCD – Cromatografia em Camada Delgada

CDCl<sub>3</sub> – Clorofórmio deuterado

*d* – dubleto

*dd* – duplo dubleto

DCM - Diclorometano

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

EM – Espectrometria de massas

EMAR – Espectrometria de Massas de Alta Resolução

ESI – Eletrospray

h – Altura

Hex – Hexano

HMBC – Heteronuclear Multiple-Bond Correlation

HSQC – Heteronuclear Single-Quantum Correlation

HSQC edit – Heteronuclear Single-Quantum Correlation Editado

Hz – Hertz

J – Constante de acoplamento

LQPN – Laboratório de Química de Produtos Naturais

LTM – Laboratório de Tecnologia da Madeira

MOBOT – Missouri Botanical Garden

*m* – multiplete

MeOH – Metanol

MeOD – Metanol deuterado

m/z – Relação massa/carga

PRH – *Pithecellobium racemosum* Hexânico

PRM – *Pithecellobium racemosum* Metanólico

RMN de  $^1\text{H}$  – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

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

s – singleto

s/ – singleto largo

t – tripleto

$\delta$  – Deslocamento químico em parte por milhão

$\Phi$  – Diâmetro

1D – unidimensional

2D – bidimensional

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO .....	17
1.1	Aspectos relevantes .....	17
1.2	Família Fabaceae e subfamília Mimosoideae .....	18
1.3	Gênero <i>Pithecellobium</i> .....	19
2.	OBJETIVOS .....	34
2.1	Objetivo geral .....	34
2.2	Objetivos específicos.....	34
3.	METODOLOGIA.....	35
3.1	Materiais utilizados .....	35
3.2	Equipamentos.....	35
3.3	Material botânico .....	36
3.3.1	Coleta e identificação .....	36
3.3.2	Determinação das propriedades físicas .....	36
3.3.2.1	Determinação da Densidade básica.....	37
3.3.3	Obtenção dos extratos vegetais .....	38
3.4	Extratos de <i>Pithecellobium racemosum</i> : Análises em CCD e fracionamentos cromatográficos .....	40
3.5	Extrato hexânico de <i>Pithecellobium racemosum</i> (PRH).....	40
3.5.1	Fracionamento cromatográfico do extrato hexânico.....	40
3.6	Extrato metanólico de <i>Pithecellobium racemosum</i> (PRM).....	43
3.6.1	Fracionamento cromatográfico do extrato metanólico.....	43
3.7	Extrato hidroalcoólico de <i>Pithecellobium racemosum</i> (PRMA).....	48
3.7.1	Fracionamento cromatográfico do extrato hidroalcoólico .....	48
4.	Ensaio biológicos.....	51
4.1	Ensaio antibacteriano - Teste de difusão em ágar .....	51
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
5.1.	Identificação científica da espécie .....	53
5.2.	Propriedades Tecnológicas .....	54
5.3.	Estruturas das substâncias identificadas.....	55
5.4.	Rendimentos dos extratos de <i>P. racemosum</i> .....	56
5.5.	Identificação da substância 1 .....	56
5.6	Identificação da substância 2 .....	65

5.7	Identificação da substância 3 .....	72
5.8	Identificação da substância 4 (PRM-40).....	83
5.9	Identificação da substância 5 (PRM-44.10).....	92
6.	Ensaio de Avaliação antibacteriana.....	99
6.1.	Ensaio antibacteriano – Teste de difusão em ágar.....	99
7.	CONCLUSÃO .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	101

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Aspectos relevantes

A Amazônia abriga mais de 365 milhões de hectares de florestas naturais, de acordo com o Serviço Florestal Brasileiro (SFB, 2010). Na região é encontrada a incidência de florestas densas e abertas, com diferentes ecossistemas tais como: várzeas, matas de igapó e entre outros (ADEODATO *et al.*, 2011). Devido à diversidade biológica existente nas suas florestas e na quantidade de espécies, o Brasil destaca-se na identificação de novos produtos, tornando imenso o campo de pesquisa de novas substâncias químicas biologicamente ativas. As substâncias bioativas apresentam potenciais terapêuticos para o desenvolvimento de novos produtos com intuito de tratar diversas patologias. Estima-se que cerca de 30% de todas as drogas avaliadas como agentes terapêuticos são derivados de metabólitos secundários (CALIXTO, 2005).

Os metabólitos secundários são encontrados em animais, plantas, fungos e entre outros micro-organismos. As plantas apresentam variedade de metabólitos secundários, tais como alcaloides, terpenos, antocianinas, esteroides, flavonoides, quinonas e ligninas. Os estudos desses metabólitos têm encontrado aplicações como fármacos, corantes, aromas, inseticidas e parecem ser os principais responsáveis pelas ações analgésica, anti-inflamatória, antiviral, hipoglicemiante, antiespasmódica e antialérgica (SANTOS, 2015; CALIXTO *et al.*, 1997).

Os estudos fitoquímicos realizados com diversas partes vegetativas das plantas são frequentemente relatados utilizando-se cascas, folhas, sementes, frutos, flores e raízes, porém há escassos relatos sobre estudos com a madeira (cerne ou alburno), devido à carência de material vegetal disponível. Na busca por alternativas de aproveitamento de resíduos madeireiros, o grupo de pesquisa “Plantas da Amazônia: Química, Quimiosistemática e Atividade Biológica”, coordenado pela Profa. Dra. Maria da Paz Lima do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), tem realizado estudos fitoquímicos com espécies de resíduos madeireiros buscando atividade de substâncias quimicamente ativas.

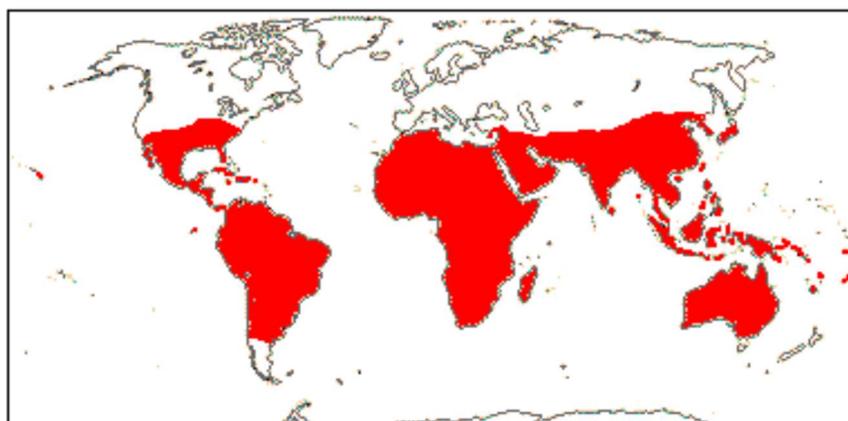
Nesse contexto, surge a oportunidade de realizar a investigação fitoquímica dos resíduos madeiros de *P. racemosum* como fonte para a extração de substâncias com potencial químico e biológico.

## 1.2 Família Fabaceae e subfamília Mimosoideae

A família Fabaceae compreende cerca de 727 gêneros e 19.325 espécies sendo considerada a terceira maior entre as Angiospermas do mundo, ficando atrás apenas das Asteraceae e Orchidaceae (SOUZA *et.*, 2009). De acordo com Lima (2000) *apud* Andrade e seus colaboradores (2009), Fabaceae tem uma ocorrência bastante representativa com cerca de 188 gêneros e 2.100 espécies em todos os biomas brasileiros, tornando-a a maior família no Brasil.

Segundo Ignoato (2012), há dois sistemas de classificação para a família Fabaceae. Um sistema reconheceu como uma única família que é dividida tradicionalmente em três subfamílias que são: Caesalpinioideae, Mimosoideae e Faboideae (ou Papilionoideae). O outro sistema de Cronquist, de 1988 e alguns autores, classificaram em três famílias distintas (Fabaceae, Ceasalpiniaceae e Mimosaceae).

Com base no sistema tradicional, a subfamília Mimosoideae, enfoque deste estudo, é a segunda maior da família Fabaceae, tendo a ocorrência de 3.270 espécies pertencentes a 82 gêneros e quatro tribos (Mimoseae, Acacieae, Ingeae e Mimosygantheae). De acordo com o Grupo de Filogenia das Angiospermas (APG), as espécies desta subfamília estão amplamente distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais do globo (MOBOT, 2012) (Figura 1).



Fonte: <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb>.

**Figura 1.** Distribuição das espécies da subfamília Mimosoideae no mundo.

Há muitos relatos na literatura sobre estudos das espécies de Fabaceae, mas há uma escassez sobre os estudos dos metabólitos secundários oriundos da madeira. Fitoquimicamente, a família destaca-se por apresentar uma rica composição química de substâncias bioativas, tais como: alcaloides, flavonoides, saponinas, lignanas e terpenoides, sendo que a classe dos flavonoides possui o maior número de relatos na literatura.

### 1.3 Gênero *Pithecellobium*

O gênero *Pithecellobium* possui aproximadamente 120 espécies, porém poucas foram estudadas fitoquimicamente (MA *et al.*, 2007). De acordo com o levantamento bibliográfico realizado há apenas dezessete espécies que foram estudadas no gênero *Pithecellobium*, os quais relatam o isolamento e a identificação de flavonoides, triterpenos, esteroides, saponinas e cumarinas.

Os esteroides de *Pithecellobium* estão distribuídos no cerne, casca da raiz, raízes e ramos. A literatura relata a identificação de sitosterol, espinasterol, estigmasterol e campesterol, bem como a identificação de derivados de esteroides glicosilados (Tabela 1 e Quadro 1). Segundo o trabalho de Choi e seus colaboradores (2017), relatam que o  $\beta$ -sitosterol, campesterol e estigmasterol exercem atividade contra fungos fitopatogênicos *Botrytis cinerea* causador do mofo cinzento, a *Phytophthora infestans* causadora de requeima do tomateiro, a *Magnaporthe grisea* causadora do brusone em trigos e *Rhizoctonia solani* Kuhn responsável pela queima-da-bainha.

Conforme mostra o Quadro 2, existem poucos registros de terpenoides no gênero *Pithecellobium*. Um triterpeno do tipo lupano a partir de extrato de cascas secas de *Pithecellobium dulce*, foi identificado como lupeol (8), e um triterpeno oleanano, o ácido equinocístico, que foi isolado a partir de extratos das cascas das madeiras e raízes (Tabela 1 e Quadro 1) (KATEKHAYE *et al.*, 2016; GUNASKERA *et al.*, 1982; KATEKHAYE e LADDAH, 2015). Estudos realizados por Wu e seus colaboradores (2010), constataram que o ácido equinocístico apresenta um potente efeito cardioprotetor nos modelos de isquemia miocárdica aguda em ratos.

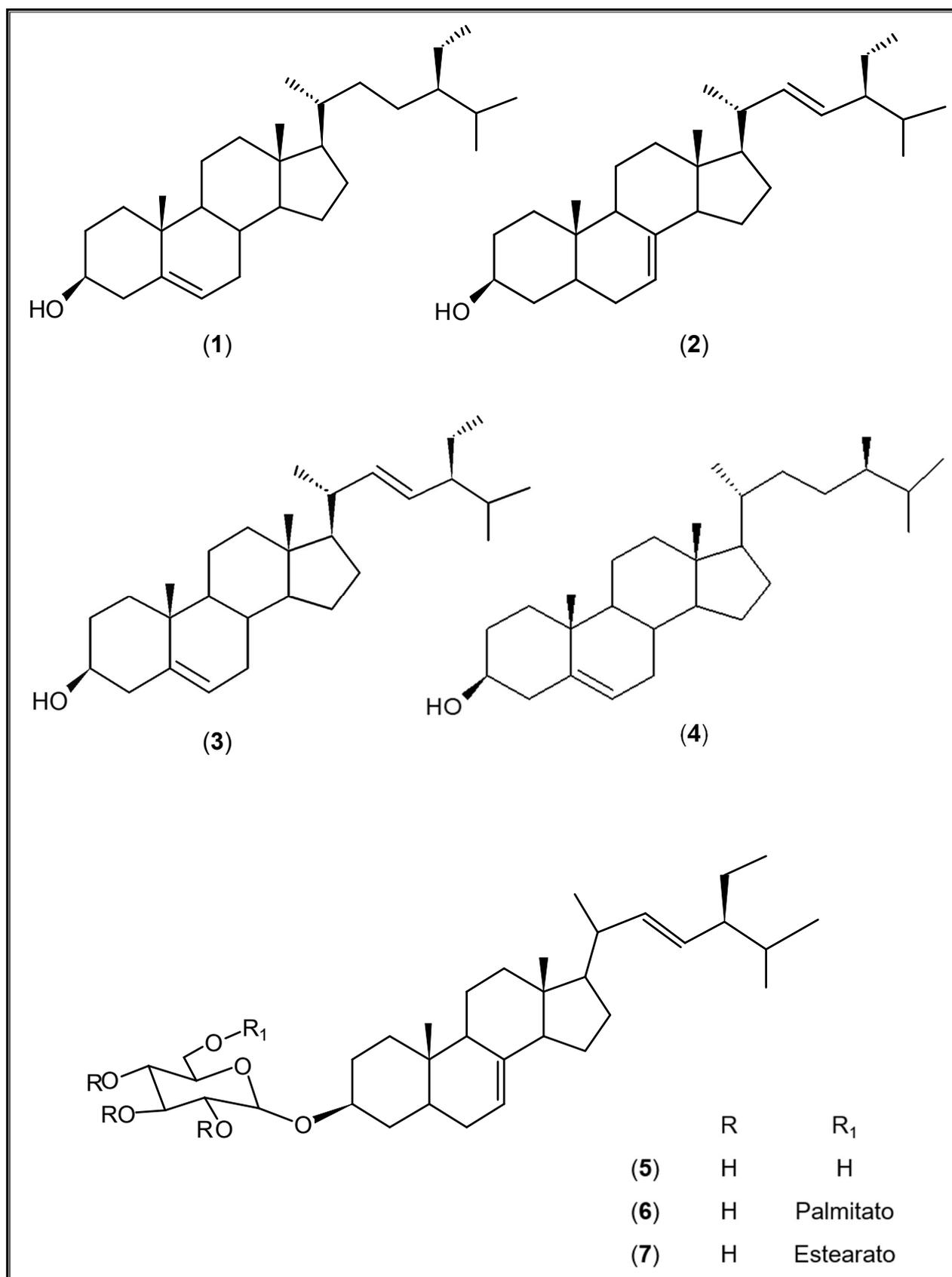
**Tabela 1.** Esteroides e triterpenos relatados no gênero *Pithecellobium*.

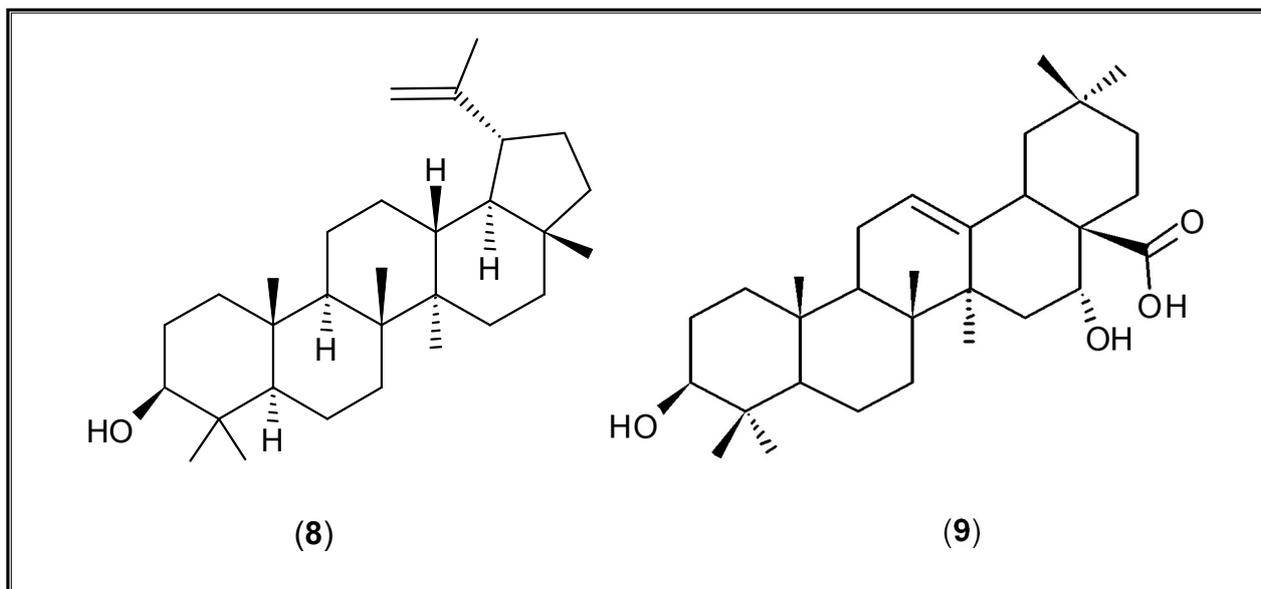
Classe	Substância	Ocorrência
	Sitosterol (1)	<i>P. dulce</i> [Ce] <sup>1</sup>
	Espinasterol (2)	<i>P. dulce</i> [Ce] <sup>1</sup> <i>P. multiflorum</i> [Ra] <sup>2</sup>
	Estigmasterol (3)	<i>P. dulce</i> [Ce] <sup>1</sup>
	Campesterol (4)	<i>P. dulce</i> [Ce] <sup>1</sup>
<b>Esteroides</b>	Mistura dos esteroides sitosterol, estigmasterol e campesterol (1, 3 e 4)	<i>P. dulce</i> [Ce e Ca] <sup>1</sup>
	Esteroides glicosilado (5)	<i>P. cauliflorum</i> [R] <sup>3</sup>
	3-O-[6'-O-palmitoil-β-D-glicosil]-espinasta-7-(23)-dieno (6)	<i>P. cauliflorum</i> [R] <sup>3</sup>
	3-O-[6'-O-estearil-β-D-glicosil]-espinasta-7-(23)-dieno (7)	<i>P. cauliflorum</i> [R] <sup>3</sup>
<b>Triterpenos</b>	Lupeol (8)	<i>P. dulce</i> [Ca] <sup>4</sup> <i>P. multiflorum</i> [Ra] <sup>5</sup>
	Ácido equinocístico (9)	<i>P. dulce</i> [Ca] <sup>6</sup>

1-NIGAM e MITRA, 1998; 2-GUNASEKERA *et al.*, 1982; 3- GOMES e ALEGRIO, 1998; 4- KATEKHAYE *et al.*, 2016; 5-GUNASEKERA *et al.*, 1982; 6-KATEKHAYE e LADDHA, 2015.

[Ce]- cerne; [Ra]- raízes; [Ca]- cascas; [R]- ramos.

**Quadro 1.** Estruturas dos esteroides e triterpenos relatados no gênero *Pithecellobium*.





Obs.: Continuação do Quadro 1 (p. 21).

Da casca da madeira de *P. dulce* foram identificadas duas substâncias com o esqueleto de cumarina, o bergapteno (10) e o 4(2,3-dihidrogeraniloxi)-5(4(2,3-dihidrogeraniloxi)fenil-bergapteno (11) (Tabela 2 e Quadro 2). O bergapteno, consiste em uma furanocumarina que apresenta ação fotossensibilizante que age no processo de repigmentação da pele, sendo amplamente empregado no tratamento de dermatoses, como é o exemplo do vitiligo, que é uma doença cutânea adquirida, caracterizada por máculas brancas que determina área de despigmentação da pele (LEÃO, 2005).

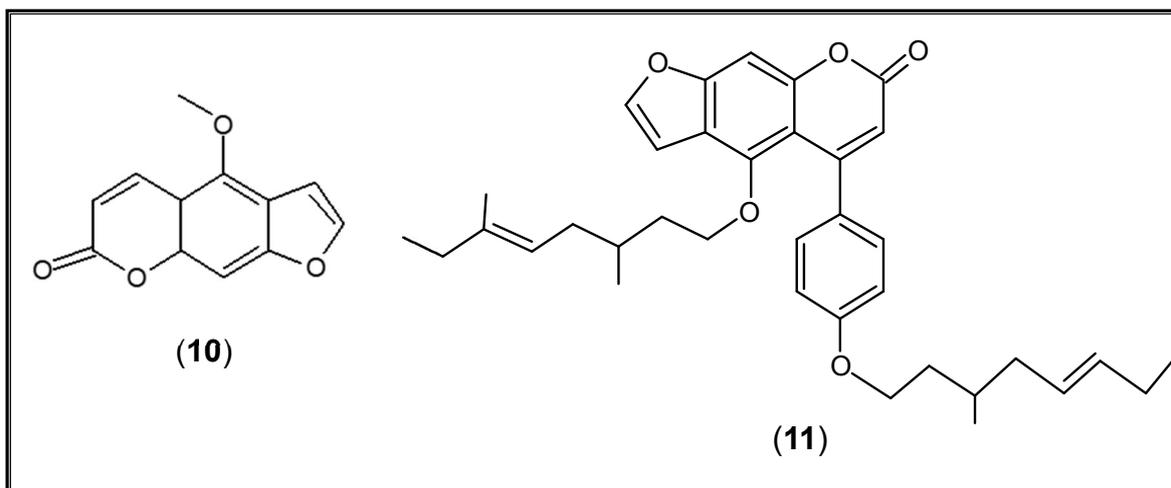
**Tabela 2.** Cumarinas identificados em *P. dulce* e *P. multiflorum*.

Substância	Ocorrência
bergapteno (10)	<i>P. dulce</i> [Ca] <sup>1</sup>
4(2,3-dihidrogeraniloxi)-5(4(2,3-dihidrogeraniloxi)fenil-bergapteno (11)	<i>P. dulce</i> [Ca] <sup>1</sup>

1-KATEKHAYE e LADDHA, 2015.

[Ca]- cascas.

**Quadro 2.** Estruturas das cumarinas relacionadas no gênero *Pithecellobium*.



Outros metabólitos identificados no gênero são derivados glicosilados de saponinas triterpênicas com esqueleto tipo oleanano, conforme mostra a Tabela 3 (p. 23 - 24). A partir dos extratos alcoólicos das sementes em pó de *P. dulce* e das raízes de *P. lucidum*, foi possível a identificação de quinze saponinas (**12-26**) (Quadro 3).

**Tabela 3.** Saponinas isoladas e identificadas em *P. dulce* e *P. lucidum*.

Substância	Ocorrência
Pithedulosídeo B ( <b>13</b> )	<i>P. dulce</i> [Se] <sup>1,2,3</sup>
Pithedulosídeo C ( <b>14</b> )	<i>P. dulce</i> [Se] <sup>2,3</sup>
Pithedulosídeo D ( <b>15</b> )	<i>P. dulce</i> [Se] <sup>2,3</sup>
Pithedulosídeo E ( <b>16</b> )	<i>P. dulce</i> [Se] <sup>1,2</sup>
Pithedulosídeo F ( <b>17</b> )	<i>P. dulce</i> [Se] <sup>1,2</sup>
Pithedulosídeo G ( <b>18</b> )	<i>P. dulce</i> [Se] <sup>2</sup>
Pithecellosídeo ( <b>19</b> )	<i>P. dulce</i> [Se] <sup>3</sup>
3-O-[β-D-glucopiranosil-(1→2)-α-L- arabinopiranosil] 28-O [α-L-ramnopiranosil-(1→4)-β-D-glucopiranosil-(1→4)-β-D-glucopiranosil ácido equinocístico ( <b>20</b> )	<i>P. dulce</i> [Se] <sup>4,5</sup>
Ácido oleanólico 3-O-β-D-glucopiranosil-(1→2)-α-L-arabinopiranosídeo ( <b>21</b> )	<i>P. dulce</i> [Se] <sup>6</sup>

Pithelucosídeo A (22)	<i>P. lucidum</i> [Ra] <sup>6</sup>
Pithelucosídeo B (23)	<i>P. lucidum</i> [Ra] <sup>6</sup>
Pithelucosídeo C (24)	<i>P. lucidum</i> [Ra] <sup>6</sup>
Prosapogenina-10 (25)	<i>P. lucidum</i> [Ra] <sup>6</sup>
Julibrosídeo J <sub>29</sub> (26)	<i>P. lucidum</i> [Ra] <sup>6</sup>

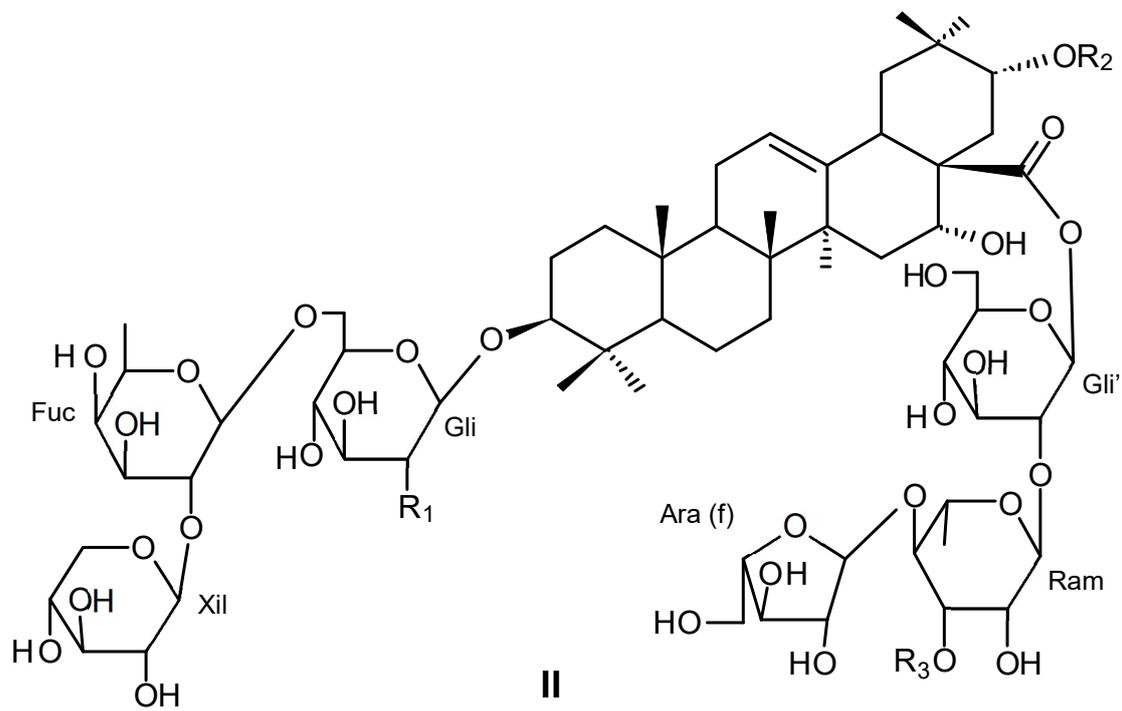
1- BARRERA-NECHA *et al.*, 2003; 2- YOSHIKAWA *et al.*, 1997; 3- SAHU *et al.*, 1999; 4- SAHU *et al.*, 1994; 5- SAXENA e SINGHAL, 1998; 6- MA *et al.*, 2007  
[Se]- sementes; [Ra]- raízes.

Obs.: Continuação da Tabela 3 (p. 23).

**Quadro 3.** Estruturas das saponinas identificadas no gênero *Pithecellobium*.

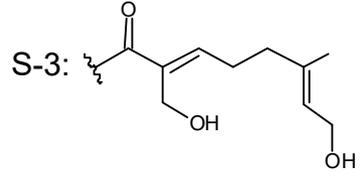
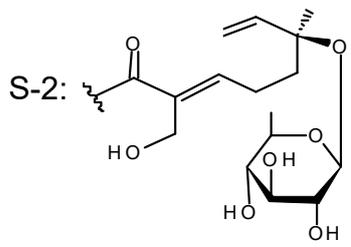
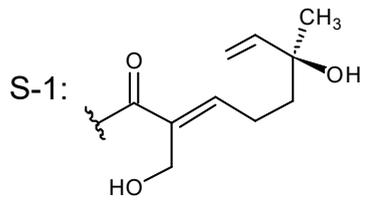
I

	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
12	α-ara <sup>1-6</sup> gli <sup>1-</sup>	OH	H
13	α-ara <sup>1-2</sup> ara <sup>1-6</sup> gli <sup>1-</sup>	H	H
14	α-xil <sup>1-2</sup> ara <sup>1-6</sup> gli <sup>1-</sup>	H	H
15	α-ara <sup>1-2</sup> ara <sup>1-6</sup> gli <sup>1-</sup>	OH	H
16	α-xil <sup>1-2</sup> ara <sup>1-6</sup> gli <sup>1-</sup>	OH	H
17	α-ara <sup>1-2</sup> ara <sup>1-6</sup> gli <sup>1-2</sup> gli <sup>1-</sup>	H	H
18	α-xil <sup>1-2</sup> ara <sup>1-6</sup> gli <sup>1-2</sup> gli <sup>1-</sup>	H	H
19	α-ara <sup>1-2</sup> ara <sup>1-6</sup> gli <sup>1-</sup>	OH	S-1
20	β-gli <sup>1-2</sup> ara <sup>1-</sup>	H	H
21	β-gli <sup>1-2</sup> ara <sup>1-</sup>	α-ram <sup>1-4</sup> gli <sup>1-4</sup> gli <sup>1-</sup>	H



II

	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
<b>22</b>	OH	S-2	β-quin <sup>1-3</sup>
<b>23</b>	OH	S-1	β-gli <sup>1-3</sup>
<b>24</b>	OH	S-3	β-gli <sup>1-3</sup>
<b>25</b>	OH	S-2	β-gli <sup>1-3</sup>
<b>26</b>	NHAc	S-2	β-gli <sup>1-3</sup>



Obs.: Continuação do **Quadro 3**.

A literatura relata a ocorrência de vinte e três substâncias pertencentes à classe dos flavonoides encontradas em folhas e galhos (Tabela 4) (MIN-WON *et al.*, 1992; LI *et al.*, 2006; KANG *et al.*, 2014; YU-XI WANG *et al.*, 2017). Os flavonoides de *Pithecellobium* se dividem em cinco tipos de esqueletos principais: as flavan-3-ol, flavanas, flavonas, flavanonas, flavonóis e derivados de flavan-3-ol (Quadro 4).

Em relação à atividade biológica, as substâncias (-)-5,3',4',5'-tetrahidroxiflavan-7-galato (**37**) e (2*R*,3*R*)-7-*O*-galoilplumbocatequina A (**23**) apresentaram *in vitro*, efeitos inibitórios moderados contra a neuraminidase do vírus da influenza H1N1 (KANG *et al.*, 2014). A neuraminidase do vírus da gripe facilita a disseminação do vírus recém-sintetizado no hospedeiro e é um alvo importante para o controle fase inicial da infecção (XU *et al.*, 2008).

**Tabela 4.** Classes de flavonoides identificados no gênero *Pithecellobium*.

Tipos	Substância	Ocorrência
<b>Flavan-3-ol</b>	(+)-Catequina ( <b>27</b> )	<i>P. lobatum</i> [Fo] <sup>1</sup> ; <i>P. clypearia</i> [Fo] <sup>4</sup> - [Ga] <sup>4</sup>
	Catequina-3'- <i>O</i> -galato ( <b>28</b> )	<i>P. lobatum</i> [Fo] <sup>1</sup>
	Catequina-4'- <i>O</i> -galato ( <b>29</b> )	<i>P. lobatum</i> [Fo] <sup>1</sup>
	Galocatequina-7,3'-di- <i>O</i> -galato ( <b>30</b> )	<i>P. lobatum</i> [Fo] <sup>1</sup>
	Galocatequina-7,4'-di- <i>O</i> -galato ( <b>31</b> )	<i>P. lobatum</i> [Fo] <sup>1</sup> ; <i>P. clypearia</i> [Fo] <sup>4</sup> e [Ga] <sup>4</sup>
	(2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> )-5,7,3'-trimetoxcatequina ( <b>32</b> )	<i>P. clypearia</i> [Fo] <sup>4</sup> e [Ga] <sup>4</sup>
	(2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> )-catequina-7-galato ( <b>33</b> )	<i>P. clypearia</i> [Fo] <sup>4</sup> e [Ga] <sup>4</sup>
	(-)-(2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> )-galocatequina-7-galato ( <b>34</b> )	<i>P. clypearia</i> [Fo] <sup>3,4</sup> e [Ga] <sup>4</sup>

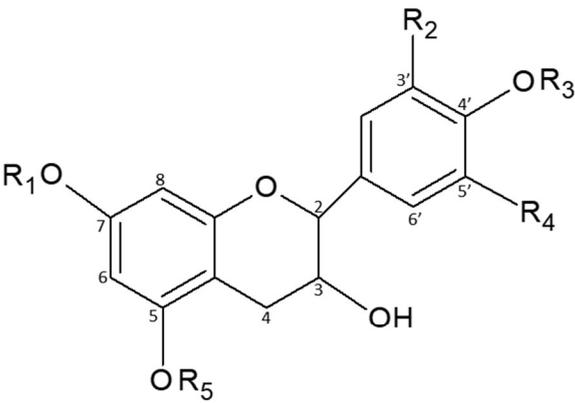
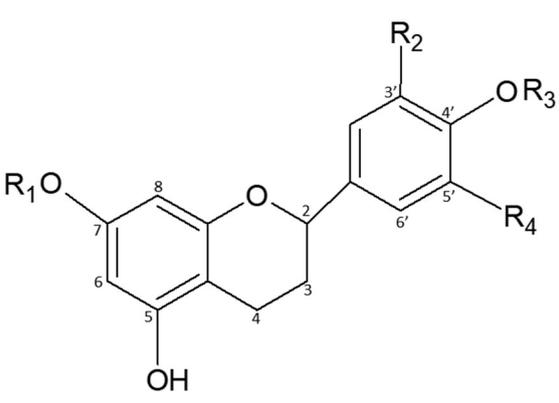
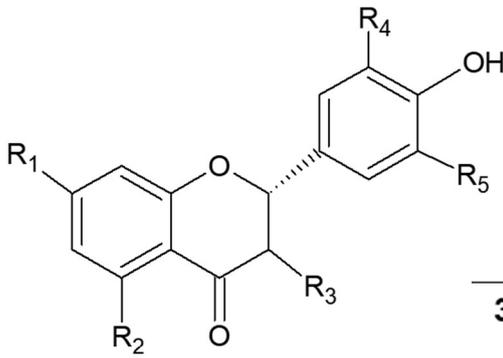
	(-)-(2S)-5,7,3',4',5'-pentahidroxi-flavan (35)	<i>P. clypearia</i> [Fo] <sup>4</sup> e [Ga] <sup>4</sup>
<b>Flavana</b>	(-)-5,3',4',5'-tetrahidroxi-flavan-7-galato (36)	<i>P. clypearia</i> [Fo] <sup>2</sup> ; <i>P. clypearia</i> [Fo] <sup>3</sup>
	7,4'-di-O-galoiltricetiflavan (37)	<i>P. clypearia</i> [Fo] <sup>2,3</sup>
	Thevetiaflavon (38)	<i>P. clypearia</i> [Fo] <sup>4</sup> e [Ga] <sup>4</sup>
	Éter luteolino-5,3'-dimetilico (39)	<i>P. clypearia</i> [Fo] <sup>4</sup> e [Ga] <sup>4</sup>
<b>Flavona</b>	Quercitrina (40)	<i>P. clypearia</i> [Fo] <sup>4</sup> e [Ga] <sup>4</sup>
	Mirricitrina (41)	<i>P. clypearia</i> [Fo] <sup>4</sup> e [Ga] <sup>4</sup>
	Luteolina (42)	<i>P. clypearia</i> [Fo] <sup>4</sup> e [Ga] <sup>4</sup>
	Quercetina (43)	<i>P. clypearia</i> [Fo] <sup>4</sup> e [Ga] <sup>4</sup>
<b>Flavononol</b>	(2R,3R)-7,8,3',4'-tetrahidroxi-dihidro-flavanol (44)	<i>P. clypearia</i> [Fo] <sup>4</sup> e [Ga] <sup>4</sup>
<b>Flavanona</b>	Naringenina (45)	<i>P. clypearia</i> [Fo] <sup>4</sup> e [Ga] <sup>4</sup>
	(2S)-5,7-dihidroxi-flavanona-7-O-β-D-glucopiranosídeo (46)	<i>P. clypearia</i> [Fo] <sup>4</sup> e [Ga] <sup>4</sup>
<b>Derivado de flavan-3-ol</b>	Epigalocatequina galato (47)	<i>P. clypearia</i> [Fo] <sup>3</sup>
	(2R,3R)-7-O-galoilplumbocatequina A (48)	<i>P. clypearia</i> [Fo] <sup>3</sup>

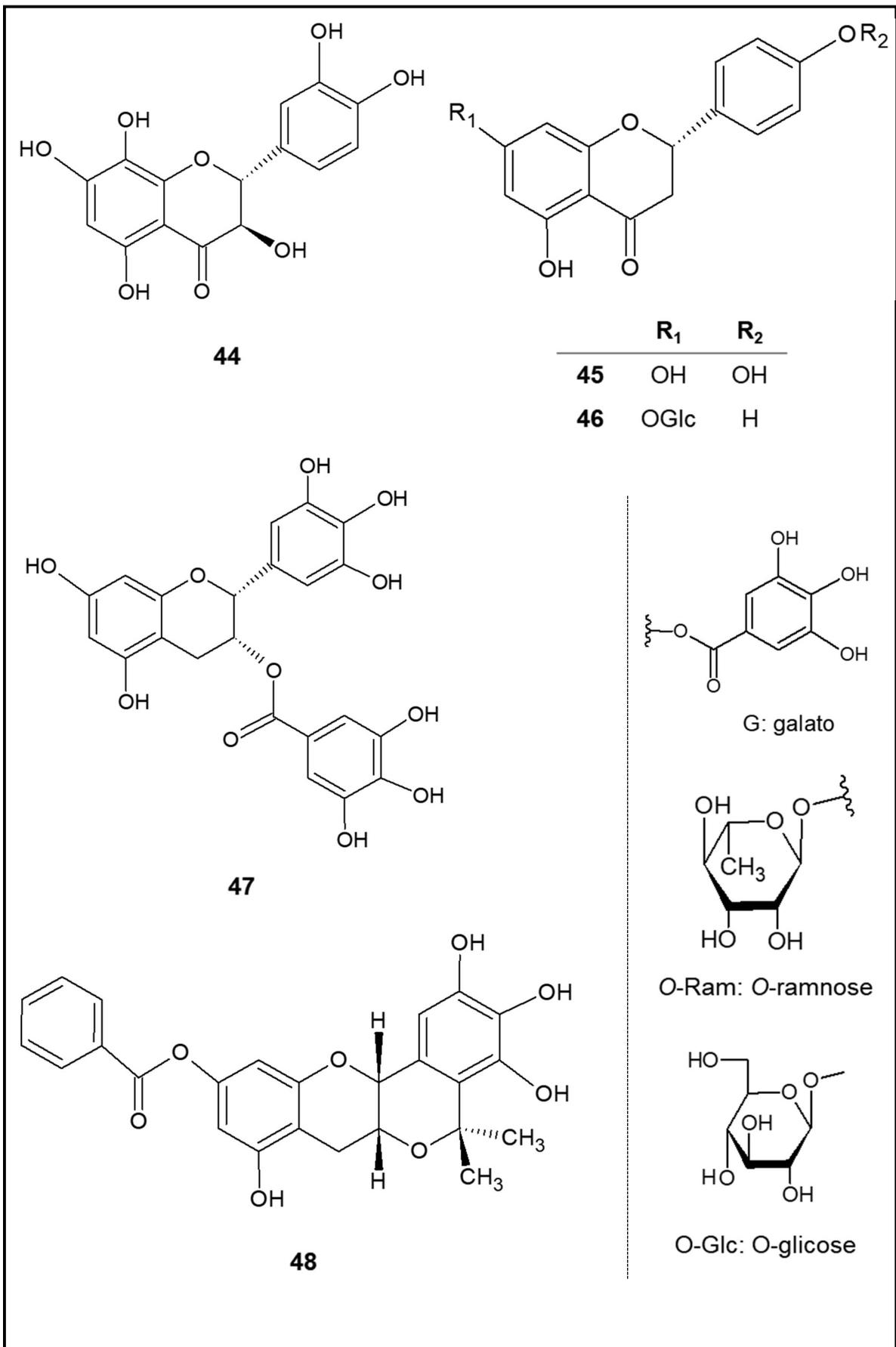
1-Min-Won *et al.*, 1992; 2-Li *et al.*, 2006; 3-Kang *et al.*, 2014; 4-Yu-Xi Wang *et al.*, 2017.

[Fo]- folhas; [Ga]- galhos.

Obs.: Continuação da **Tabela 5**.

**Quadro 4.** Flavonoides relatados no gênero *Pithecellobium*.

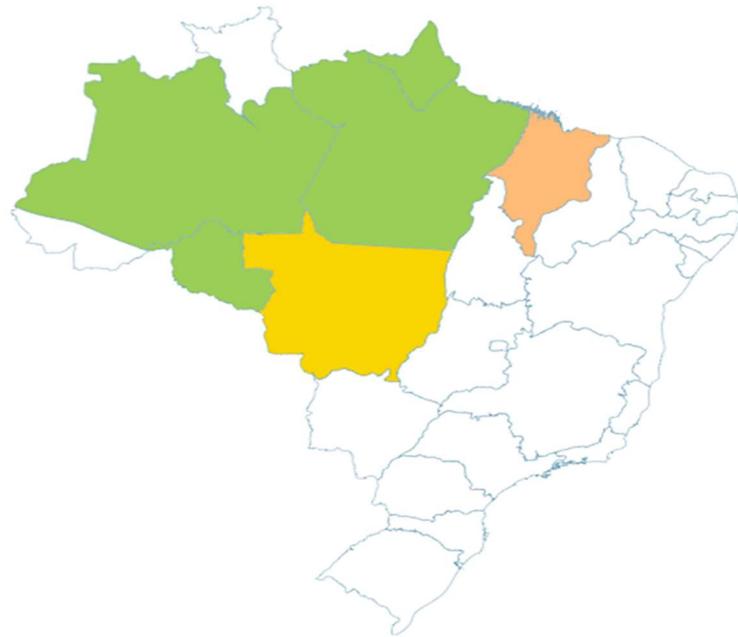
										
	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>	<b>R<sub>3</sub></b>	<b>R<sub>4</sub></b>	<b>R<sub>5</sub></b>		<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>	<b>R<sub>3</sub></b>	<b>R<sub>4</sub></b>
<b>27</b>	H	H	H	H	H	<b>35</b>	H	OH	H	OH
<b>28</b>	H	G	H	H	H	<b>36</b>	G	OH	H	OH
<b>29</b>	H	H	G	H	H	<b>37</b>	G	OH	G	OH
<b>30</b>	G	G	H	H	H					
<b>31</b>	G	H	G	H	H					
<b>32</b>	CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	H	CH <sub>3</sub>					
<b>33</b>	G	OH	H	H	H					
<b>34</b>	G	OH	H	OH	H					
						<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>	<b>R<sub>3</sub></b>	<b>R<sub>4</sub></b>	<b>R<sub>5</sub></b>
<b>38</b>	OH	OCH <sub>3</sub>	H	H	H					
<b>39</b>	OH	OCH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>	H					
<b>40</b>	OH	OH	ORam	H	OH					
<b>41</b>	OH	OH	ORam	OH	OH					
<b>42</b>	OH	OH	H	OH	H					
<b>43</b>	OH	OH	OH	OH	H					



Obs.: Continuação do **Quadro 5**.

#### 1.4 Espécie *Pithecellobium racemosum* Ducke

A espécie *Pithecellobium racemosum* Ducke, é conhecida popularmente como angelim-rajado, angelim-bordado, Chico-pires, ingarana e sucupira, e é uma das maiores árvores da Amazônia podendo chegar de 50 a 60 metros de altura. É nativa da Amazônia, com ocorrências confirmadas na região norte (Amazonas, Amapá, Pará e Rondônia), nordeste (Maranhão) e centro-oeste (Mato Grosso). Abundante nos tipos de vegetação como: campinarana e floresta de terra firme (REFLORA, 2018).



Fonte: <http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/listaBrasil/PrincipalUC/PrincipalUC.do#CondicaoTaxonCP>.

**Figura 2.** Ocorrência da *P. racemosum* nas regiões brasileiras.

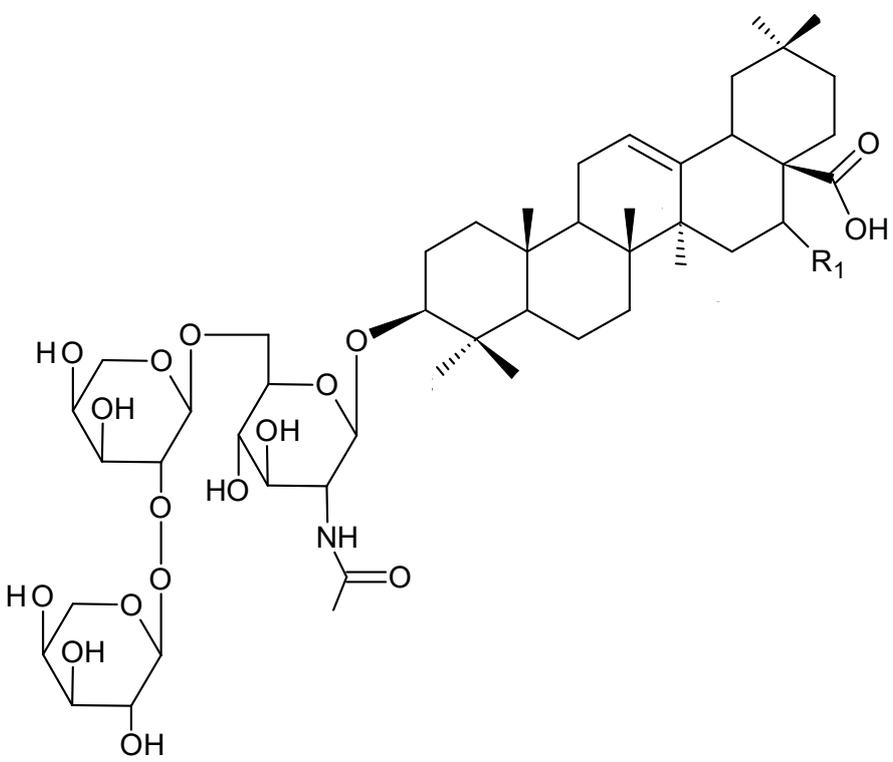
Segundo dados do MOBOT (2018) e REFLORA (2018), a espécie apresenta três sinonímias botânicas (Lista 1).

#### **Lista 1.** Sinonímias da espécie *Pithecellobium racemosum*.

Sinonímias
<i>Abarema racemosa</i> (Ducke) Kleinhoonte
<i>Marmaroxylon racemosum</i> (Ducke) Killip ex Record
<i>Zygia racemosa</i> (Ducke) Barneby & J.W. Grimes

Com relação aos estudos fitoquímicos, tem-se apenas o trabalho realizado por Khan e seus colaboradores (1997), os quais relatam o estudo fitoquímico do extrato etanólico da casca do caule de um espécime coletado em Manaus, onde descrevem o isolamento e a identificação de duas substâncias derivadas de saponina contendo três açúcares, 3-O-[ $\alpha$ -L-arabinopiranosil (1-2)] [ $\alpha$ -L-arabinopiranosil (1-6)]-2-acetoamido-2-desoxi- $\beta$ -D-glucopiranosil oleanólico (**49**) e 3-O-[ $\alpha$ -L-arabinopiranosil (1-2)]-[ $\alpha$ -L-arabinopiranosil (1-6)]-2-acetamido-2-desoxi- $\beta$ -D-glucopiranosil ácido equinocístico (**50**) (Quadro 6).

**Quadro 5.** Metabólitos secundários identificados em *P. racemosum*.

	
Substância	Substituinte R <sub>1</sub>
3-O-[ $\alpha$ -L-arabinopiranosil (1-2)] [ $\alpha$ -L-arabinopiranosil (1-6)]-2-acetoamido-2-desoxi- $\beta$ -D-glucopiranosil oleanólico ( <b>49</b> )	H
3-O-[ $\alpha$ -L-arabinopiranosil (1-2)]-[ $\alpha$ -L-arabinopiranosil (1-6)]-2-acetamido-2-desoxi- $\beta$ -D-glucopiranosil ácido equinocístico ( <b>50</b> )	OH

## 1.1 Atividade biológica

O aumento da prevalência da resistência antimicrobiana frente a patógenos, está se tornando um problema cada vez mais sério decorrente da utilização descomedida de antibióticos. Uma das medidas para combater essa problemática seria desenvolver novos antimicrobianos a partir de estudos de metabólitos secundários provenientes das plantas (BAKAR et al., 2012; KUMAR et al., 2012).

As plantas são uma importante fonte de substâncias biologicamente ativas, muitas das quais são utilizadas para o desenvolvimento de novos produtos a serem comercializados mundialmente. O potencial antimicrobiano das plantas está diretamente relacionado à diversidade estrutural de seus metabólitos. Muitos centros de pesquisas vêm desenvolvendo estudos sobre o potencial antimicrobiano de produtos naturais (ROZATTO, 2012; ELOFF, 1998).

Há muitos relatos sobre estudos de metabólitos secundários procedentes de partes vegetativas das plantas que apresentam atividades antimicrobianas. Dentre estudos descritos na literatura, encontram-se estudos com as espécies do gênero *Pithecellobium*. Segundo os estudos de Bakar e colaboradores (2012), os extratos metanólicos de folhas, vagens e sementes de *P. jiringa* apresentaram atividades antibacterianas contra *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Bacillus subtilis*, porém o extrato de folhas apresentou concentração inibitória mínima notável em relação aos extratos de vagens e sementes.

O estudo realizado com *P. dulce* forneceu uma análise fitoquímica preliminar dos extratos brutos que exibiram um grau variável de atividade antimicrobiana contra cinco Gram positivos (*Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*), sete Gram negativos (*Aeromonas hydrophila*, *Alcaligenes faecalis*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella typhimurium*). De acordo com esse estudo, os autores verificaram que as análises fitoquímicas preliminares de diferentes extratos revelaram a presença de flavonoides, taninos, terpenos e entre outros (KUMAR et al., 2012).

Desse modo, levando em consideração a grande importância de se avaliar o potencial antimicrobiano para os metabólitos secundários, têm-se a necessidade de buscar substâncias que sejam mais efetivas no combate às diversas enfermidades que acometem os seres humanos. Portanto, considerando os estudos realizados com espécies do gênero *Pithecellobium* apresentarem atividades contra vários tipos de patógenos, há a necessidade de investigar a atividade antibacteriana das substâncias isoladas provenientes dos resíduos madeireiros *P. racemosum* contra micro-organismo teste.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

✓ Realizar estudos fitoquímicos dos resíduos madeireiros de *Pithecellobium racemosum* (Fabaceae), buscando isolar substâncias e avaliar as atividades antibacterianas.

### **2.2 Objetivos específicos**

✓ Realizar os fracionamentos cromatográficos dos extratos hexânico, metanólico e hidrometanólico da espécie;

✓ Identificar e/ou elucidar as estruturas químicas das substâncias isoladas por meio de técnicas espectroscópicas e espectrométricas;

✓ Realizar ensaio de atividade antibacteriana com as substâncias isoladas;

✓ Avaliar as propriedades tecnológicas da madeira dos resíduos madeireiros de *P. racemosum*.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1 Materiais utilizados

**Solventes:** Nas análises cromatográficas, utilizaram-se solventes comerciais (hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol) destilados no LQPN-INPA. Para os experimentos de RMN foram empregados solventes deuterados (Sigma- Aldrich).

**Cromatografia em Camada Delgada (CCD):** Utilizaram-se cromatofolhas de alumínio com sílica gel 60 (Merck), com indicador de fluorescência F<sub>254</sub>. Os reveladores empregados foram radiação ultravioleta (254 e 365 nm), vanilina sulfúrica e vapores de iodo.

**Cromatografia em coluna (CC):** Foram utilizadas colunas de vidro de diversas alturas e diâmetros, dependendo da quantidade de amostra a serem fracionadas.

**Fases Estacionárias para Cromatografia em Coluna:** Sílica gel 60 (230-400 mesh) da Merck; Sephadex LH-20 da Sigma-Aldrich e celulose microcristalina Avicel (Merck).

#### 3.2 Equipamentos

**Evaporador rotativo:** Yamato, modelo RE500, equipado com banho Yamato BM 200.

**Balança analítica:** marca Shimadzu, com capacidade de até 320 g.

**Moinho:** marca Marconi, modelo MA-340.

**Chapa de aquecimento:** marca Fisaton, modelo 753A.

**Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectroscopia de Massas (CLAE/EM):** Os espectros de massas de alta resolução foram obtidos em um espectrômetro MicroTOF-QII (Bruker Daltonics), fonte de ionização ESI e o cromatógrafo utilizado foi o Prominence UFLC (Shimadzu) equipado com detector de arranjo de diodos (DAD) SPDM-20A e injetor automático SIL-20A, com coluna Shim-pack XR-ODS (2 µm x 50 µm) da Central Analítica do Laboratório Temático de Química de Produtos Naturais (CA-LTQPN) do INPA.

**Espectrômetro de Massa (EM):** os experimentos espectrométricos foram realizados no Laboratório de Espectrometria de Massas na Central Analítica da UFAM. No desenvolvimento das análises foi utilizado um espectrômetro de massas LQC Fleet (Thermo Scientific, CA, EUA), usando fonte de ionização eletrospray (ESI) no modo positivo, com faixa de detecção de 100-1000 Da. Os espectros de massas foram processados através do programa através do Xcalibur 2.1. As amostras foram preparadas na concentração de 1 mg/mL em metanol (grau CLAE da marca TÉDIA) e 20 µL foram retirados e diluídos em 980 µL de metanol. As condições típicas do equipamento foram as seguintes: voltagem do capilar em 30 V, voltagem de pulverização de 5,0 kV, temperatura do capilar a 275 °C, gás de revestimento nitrogênio (N<sub>2</sub>).

**Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN):** os espectros de RMN foram obtidos por meio de espectrômetros da Bruker, Fourier-300 (300 MHz – <sup>1</sup>H e 75 MHz – <sup>13</sup>C) da CA – LTCPN do INPA.

### **3.3 Material botânico**

#### **3.3.1 Coleta e identificação**

Os resíduos madeireiros foram fornecidos pelo Laboratório de Tecnologia da Madeira (LTM) do INPA. O espécime foi previamente identificado com base na Xiloteca do Laboratório de Tecnologia da Madeira (COTI-INPA), tendo como responsável Jorge Alves de Freitas, pesquisador e anatomista de madeira.

Na identificação macroscópica foram observadas características gerais e anatômicas. No estudo das características gerais foi analisado cor, brilho, odor, grã, textura, densidade, dureza e desenho, utilizando-se madeira seca. As análises das características anatômicas foram realizadas através de um corpo de prova, o qual foi observado a simples vista e complementada pelas observações dos tecidos lenhosos com o auxílio de uma lupa 10 x de aumento.

#### **3.3.2 Determinação das propriedades físicas**

As propriedades físicas foram fornecidas pelo Laboratório de Tecnologia da Madeira (LTM) do INPA. As propriedades físicas determinadas foram a densidade básica e a estabilidade dimensional. No disco de cada amostra de resíduo foram obtidos corpos de prova orientados nas dimensões de 2 cm x 2 cm x 3 cm considerando a distribuição dos raios (R).

### 3.3.2.1 Determinação da Densidade básica

A densidade básica é um importante parâmetro para avaliação da qualidade da madeira. É a relação entre a massa seca (g) pelo volume saturado (cm<sup>3</sup>) de uma amostra, como é demonstrado pela fórmula a seguir:

$$\varphi_{bas} = \frac{m_s}{v_{sat}} \text{ (g/cm}^3\text{)}$$

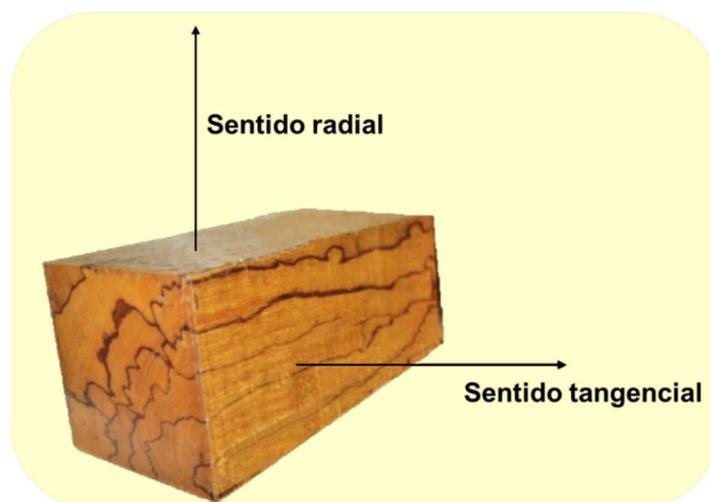
Onde:

$\varphi_{bas}$  = densidade básica;  $m_s$  = massa seca;  $v_{sat}$  = volume saturado.

A saturação da amostra foi realizada em água por um período até a saturação do volume verde, a densidade foi determinada pelo método de deslocamento de líquido com imersão em água (método de medição indireta) com o corpo de prova fixado em um suporte, em seguida foi realizada a secagem em estufa a uma temperatura de  $\pm 90$  °C até atingir o peso constante, para obtenção do peso seco utilizando-se uma balança semi-analítica com precisão de 0,01 g.

### 3.3.2.2 Determinação da Estabilidade dimensional

A estabilidade dimensional da madeira pode ser caracterizada pela contração ou inchamento da madeira, quando em contato com a água. Desse modo, a estabilidade dimensional foi determinada através dos mesmos corpos de prova que foram obtidos na determinação da densidade. Os corpos de prova foram medidos com um paquímetro digital com duas medições em cada face (tangencial e radial).



Fonte: arquivo pessoal (2019).

**Figura 3.** Sentido radial e tangencial da madeira.

Assim, determinou-se e calculou-se as contrações tangencial e radial através das equações a seguir:

$$Rt = \frac{Dt_{sat} - Dt_{sec}}{Dt_{sat}} * 100$$

Onde:

Rt = retratibilidade tangencial (%);  $Dt_{sat}$  = dimensão na direção tangencial, na condição saturada (mm);  $Dt_{sec}$  = dimensão na direção tangencial, na condição seca (mm).

$$Rr = \frac{Dr_{sat} - Dr_{sec}}{Dr_{sat}} * 100$$

Onde:

Rr = retratibilidade radial (%);  $Dr_{sat}$  = dimensão na direção radial, na condição saturada (mm);  $Dr_{sec}$  = dimensão na direção radial, na condição seca (mm).

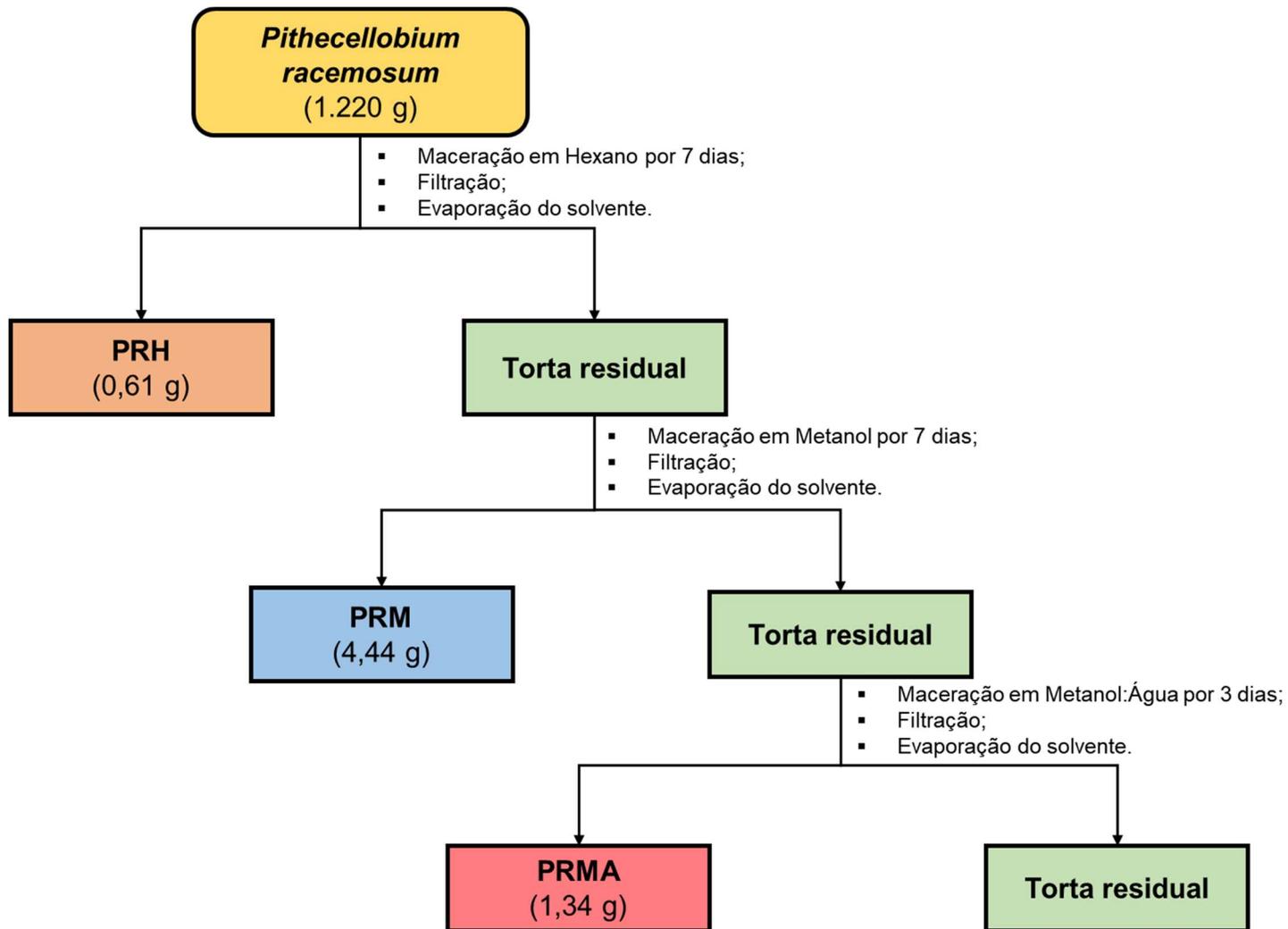
### 3.3.3 Obtenção dos extratos vegetais

Após a coleta e identificação do material vegetal (Figura 4), realizou-se a trituração do material por meio do moinho de 4 facas e posteriormente, pesou-se e submeteu-se o material a uma maceração à frio com solventes orgânicos por ordem crescente de polaridade em hexano e metanol durante 7 dias em cada solvente, e em metanol:água (1:1) por 3 dias, conforme demonstra o Esquema 1 (p. 39).



Fonte: arquivo pessoal (2017).

**Figura 4.** Material vegetal concedido pelo Laboratório de Tecnologia da Madeira (COTI-INPA).



**Esquema 1.** Obtenção dos extratos da amostra de *Pithecellobium racemosum*.

### 3.4 Extratos de *Pithecellobium racemosum*: Análises em CCD e fracionamentos cromatográficos

Nas análises prévias dos extratos de *P. racemosum* por Cromatografia em Camada Delgada (CCD), o extrato hexânico apresentou um perfil cromatográfico promissor devido a predominância de uma substância com fluorescência em luz ultravioleta de comprimento 254 nm. Sendo assim, iniciou-se o fracionamento cromatográfico pelo extrato hexânico.

#### 3.5 Extrato hexânico de *Pithecellobium racemosum* (PRH)

##### 3.5.1 Fracionamento cromatográfico do extrato hexânico

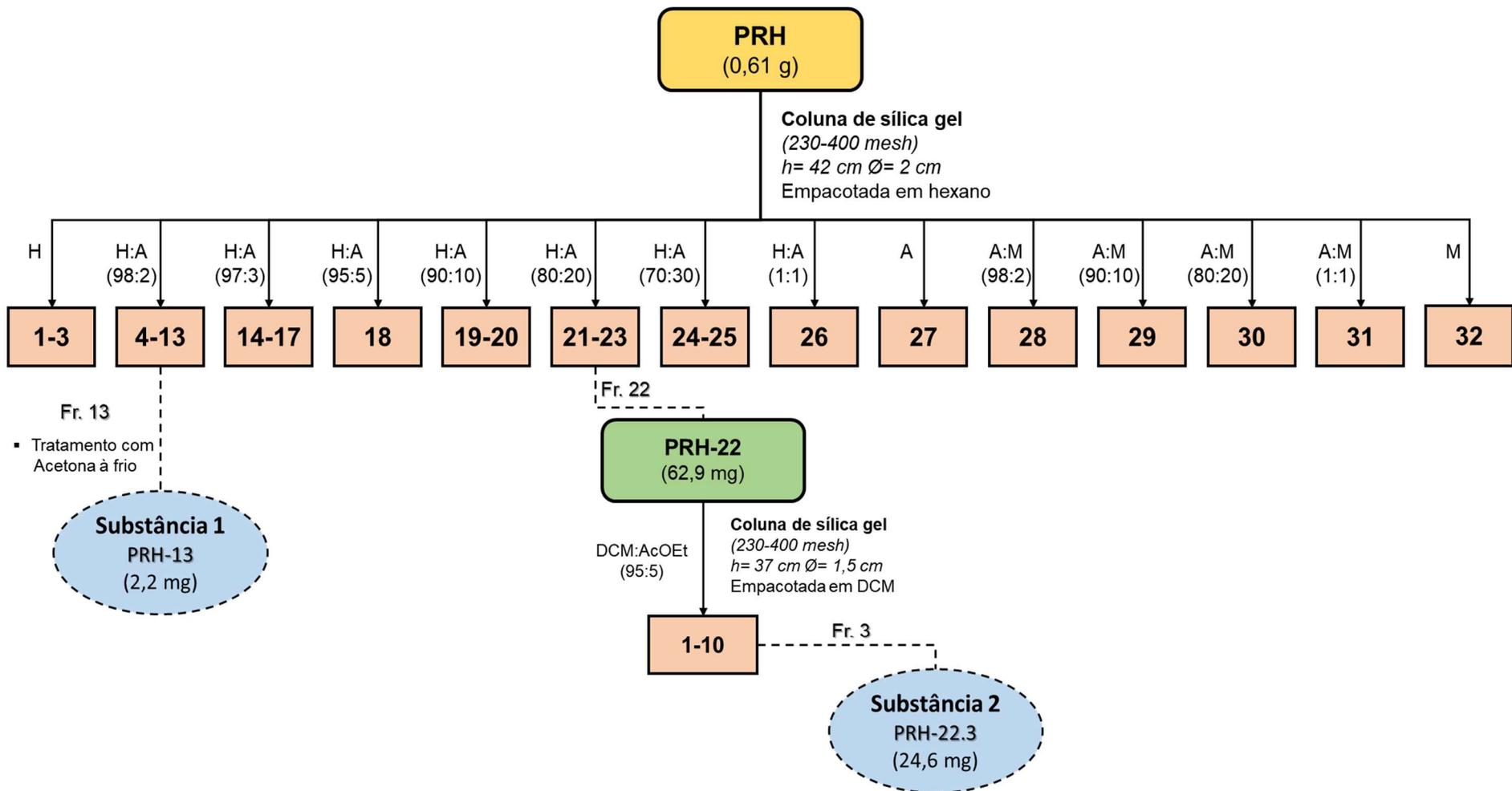
O extrato hexânico obtido foi fracionado em coluna de sílica gel (230-400 mesh) e eluída em hexano, acetato de etila e metanol em gradientes crescentes de polaridade (Esquema 2, p. 41), fornecendo 32 frações que foram reunidas de acordo com as análises realizadas por Cromatografia em Camada Delgada (CCD). Posteriormente, as frações foram pesadas e codificadas, como apresentado na Tabela 6 (p. 42).

As frações 13 (PRH-13) e 22 (PRH-22) foram as mais promissoras nas análises em CCD. A fração 13 foi submetida a um tratamento em acetona à frio, o que permitiu a obtenção de um sólido, o qual mostrou-se purificado após análise por CCD e foi codificado como **PRH-13** (2,2 mg) – **substância 1** (Esquema 2, p. 41). A fração 22 (PRH-22) foi fracionada em coluna de sílica gel (230-400 mesh), eluída em sistema isocrático com DCM:AcOEt (95:5), resultando em 10 frações que foram reunidas por similaridade de perfil cromatográfico através da avaliação em CCD em 6 novas frações (Tabela 5).

**Tabela 5.** Reunião das frações de PRH-22.

Frações reunidas	Códigos	Massa (mg)
1	PRH-22.1	14,6
2	PRH-22.2	21,2
<b>3</b>	<b>PRH-22.3</b>	<b>24,6</b>
4	PRH-22.4	3,2
5-6	PRH-22.5	1,4
7-10	PRH-22.7	16,7

A subfração 3 após análise de CCD, constatou-se a presença de uma mancha majoritária, sendo codificada como **PRH-22.3** (24,6 mg) – **substância 2** (Esquema 2, p. 41).



**Legenda:** h = Altura, Ø = Diâmetro,  
H = Hexano, A = Acetato de Etila, M = Metanol

**Esquema 2.** Fracionamento cromatográfico de PRH.

**Tabela 6.** Reunião das frações de PRH.

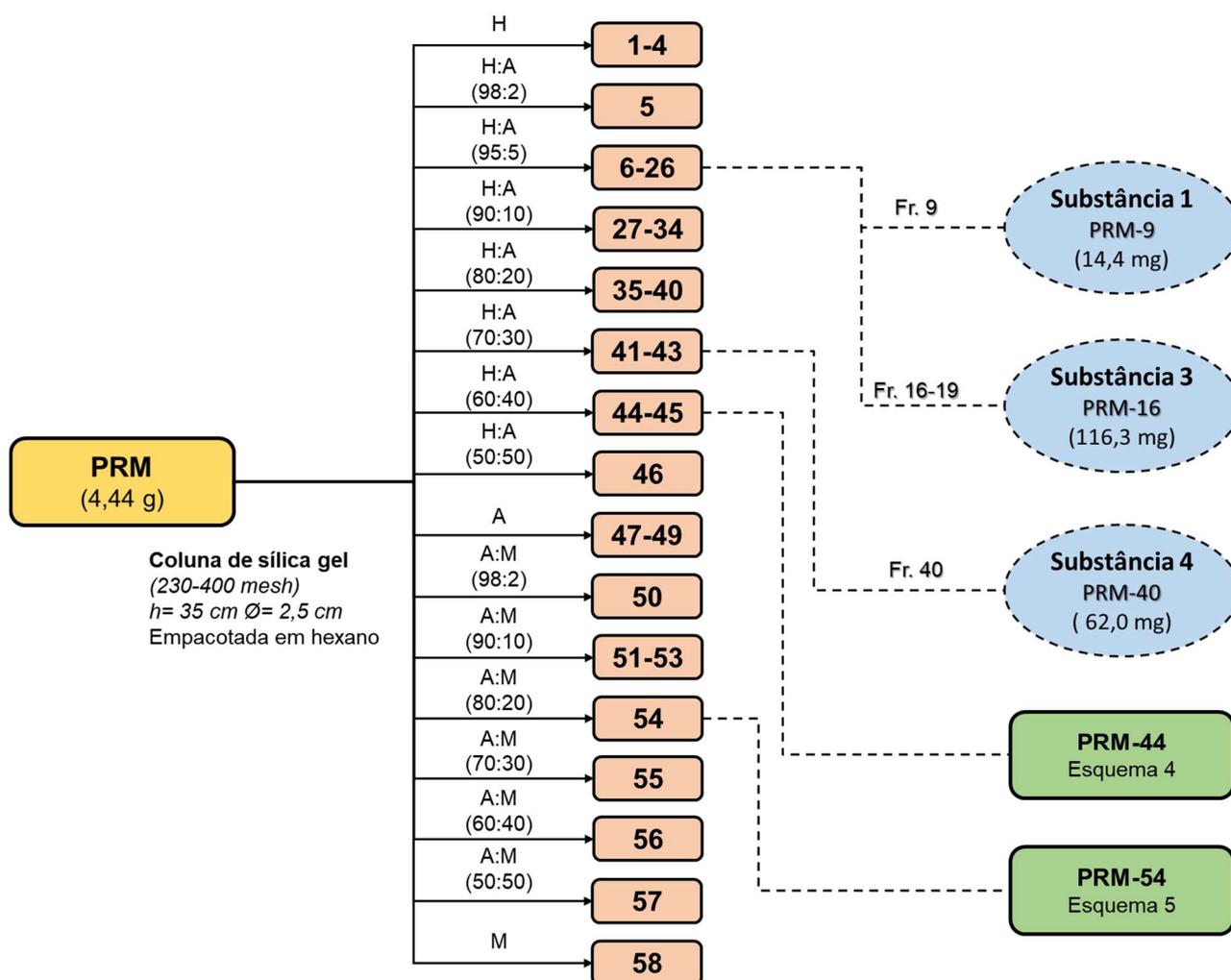
<b>Frações reunidas</b>	<b>Códigos</b>	<b>Massa (mg)</b>
1	PRH-1	34,9
2	PRH-2	33,7
3	PRH-3	6,1
4	PRH-4	2,7
5	PRH-5	0,8
6	PRH-6	0,7
7	PRH-7	0,5
8	PRH-8	0,5
9	PRH-9	6,9
10-12	PRH-10	7,6
<b>13</b>	<b>PRH-13</b>	<b>2,2</b>
14	PRH-14	4,4
15	PRH-15	4,9
16	PRH-16	1,2
17	PRH-17	5,7
18	PRH-18	6,5
19	PRH-19	10,8
20	PRH-20	20,9
21	PRH-21	6,4
<b>22</b>	<b>PRH-22</b>	<b>62,9</b>
23	PRH-23	44,2
24-32	PRH-24	141,5

Obs.: Descrição da Tabela (p. 40).

### 3.6 Extrato metanólico de *Pithecellobium racemosum* (PRM)

#### 3.6.1 Fracionamento cromatográfico do extrato metanólico

O extrato metanólico (PRM) foi fracionado em uma coluna de sílica gel (230-400 mesh) e eluída em hexano, acetato de etila e metanol em gradientes crescentes de polaridade (Esquema 3), fornecendo 58 frações que foram analisadas por CCD. Para a observação das fluorescências presentes, as placas cromatográficas foram visualizadas por meio da luz ultravioleta (254 e 365 nm) e empregou-se vanilina sulfúrica para revelação das manchas.



Legenda: h = Altura, Ø = Diâmetro, l = Largura, H = Hexano, A = Acetato de Etila, M = Metanol

Esquema 3. Fracionamento cromatográfico de PRM.

Assim, 58 frações foram analisadas e posteriormente reunidas de acordo com as análises realizadas por Cromatografia em Camada Delgada (CCD). Estas frações foram pesadas e codificadas, como apresentado na Tabela 7.

**Tabela 7.** Reunião das frações de PRM.

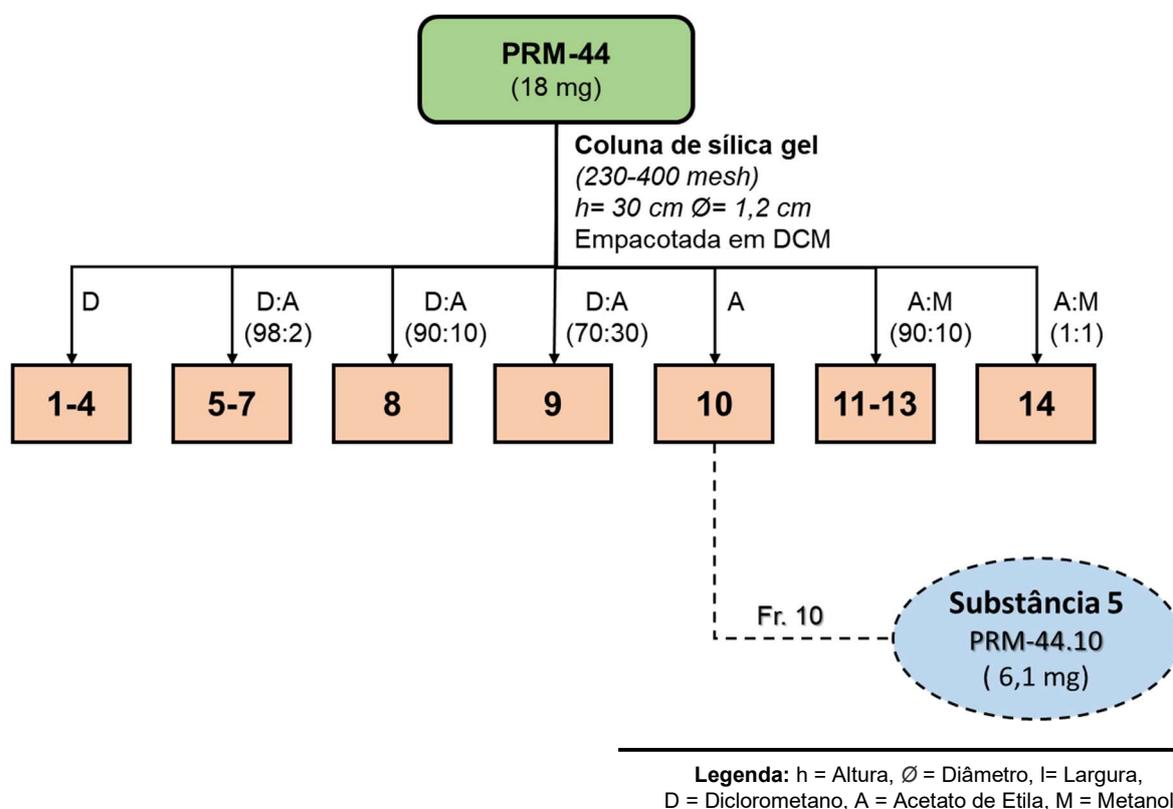
Frações reunidas	Códigos	Massa (mg)
1	PRM-1	20,2
2	PRM-2	10,6
3	PRM-3	8,6
4	PRM-4	6,0
5-8	PRM-5	17,8
<b>9</b>	<b>PRM-9</b>	<b>14,4</b>
10	PRM-10	14,6
11	PRM-11	7,8
12-13	PRM-12	27,9
14	PRM-14	21,3
15	PRM-15	34,8
<b>16-19</b>	<b>PRM-16</b>	<b>116,3</b>
20-22	PRM-20	24,2
23	PRM-23	7,1
24-26	PRM-24	9,1
27	PRM-27	15,2
28	PRM-28	6,4
29-30	PRM-29	19,1
31-35	PRM-31	22,5
36-38	PRM-36	28,9
39	PRM-39	10,9
<b>40</b>	<b>PRM-40</b>	<b>62,0</b>
41	PRM-41	39,3
42	PRM-42	18,5
43	PRM-43	19,2
<b>44</b>	<b>PRM-44</b>	<b>18,0</b>
45	PRM-45	159,8
46	PRM-46	338,0
47	PRM-47	81,0
48	PRM-48	217,1
49-53	PRM-49	900,0
<b>54-55</b>	<b>PRM-54</b>	<b>677,8</b>
57	PRM-57	338,0
58	PRM-58	666,2

A fração **PRM-9** (Esquema 3, p. 43) contendo sólido de cor branca, mostrou-se pura após análise por CCD e apresentou as mesmas características do sólido **PRH-13 (Substância 1)** isolado anteriormente.

Nas frações 16-19, observou-se a presença de material sólido branco que analisadas por CCD apresentaram uma mancha majoritária, sendo codificado como **PRM-16** (116,3 mg) – **substância 3** (Esquema 3, p. 43).

A fração 40 contendo material sólido e coloração branca, mostrou-se pura após análise por CCD e foi codificado como **PRH-40** (62,0 mg) – **substância 4** (Esquema 3, p. 43).

A fração 44 foi submetida a um fracionamento em coluna de sílica gel (230-400 mesh), eluída em diclorometano, acetato de etila e metanol em gradientes crescente de polaridade, resultando em 14 frações que foram analisadas por CCD e reunidas por similaridade de perfil cromatográfico em 7 novas frações (Tabela 8, p. 46), das quais a subfração 10 apresentou-se purificada após avaliação em CCD, sendo codificada como **PRM-44.10** (6,1 mg) – **substância 5** (Esquema 4).



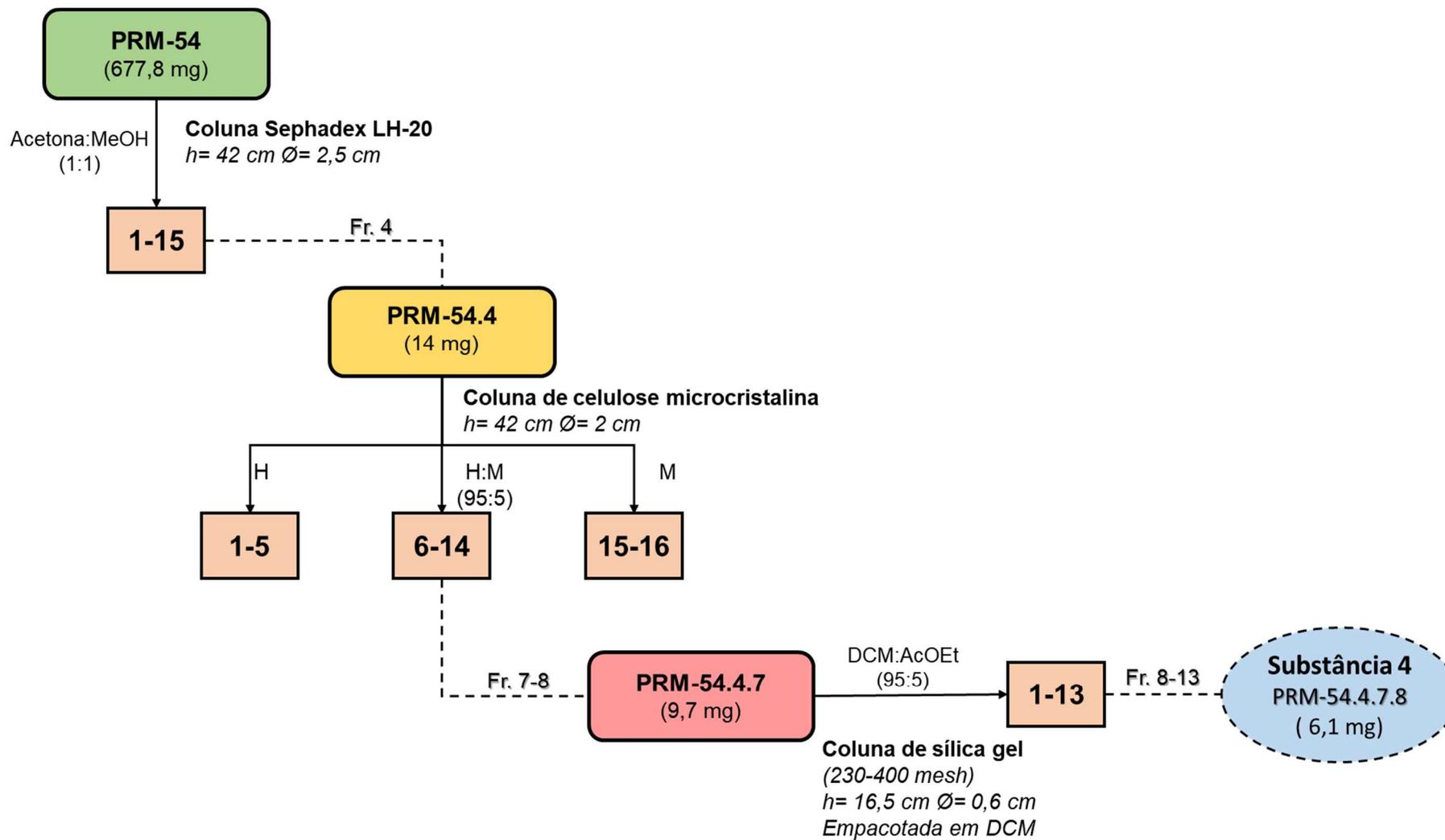
**Esquema 4.** Fracionamento cromatográfico de PRM-44.

**Tabela 8.** Reunião das frações de PRM-44.

Frações reunidas	Códigos	Massa (mg)
1	PRM-44.1	0,3
2	PRM-44.2	0,9
3-4	PRM-44.3	2,1
5-7	PRM-44.5	1,6
8	PRM-44.8	2,1
9	PRM-44.9	1,9
<b>10</b>	<b>PRM-44.10</b>	<b>6,1</b>
11-13	PRM-44.11	1,0
14	PRM-44.14	2,0

**Obs.:** Descrição da Tabela vide a página 45.

A fração PRM-54 foi submetida à cromatografia de exclusão em Sephadex LH-20 eluída em acetona e metanol (1:1), da qual obteve-se 15 frações (Esquema 5, p. 47). A subfração PRM-54.4 apresentou-se como sólido de coloração laranja escuro, o qual foi submetido à coluna de celulose microcristalina eluída em hexano e gradiente de hexano e metanol, gerando 16 frações (Esquema 5, p. 47). A subfração PRM-54.4.7, contendo material sólido foi submetido à coluna de sílica em gel (230-400 mesh), eluída em um sistema isocrático de diclorometano:acetato de etila (95:5) resultando em 13 frações (Tabela 9, p. 48). Conforme demonstra o Esquema 5 (p. 47), a subfração **PRM-54.4.7.8** (6,1 mg) apresentou-se como material sólido branco e após análise por CCD, constatou-se as mesmas características do sólido **PRM-40 (Substância 4)** isolado anteriormente.



**Legenda:** h = Altura, Ø = Diâmetro, l = Largura,  
D = Diclorometano, A = Acetato de Etila, M = Metanol

**Esquema 5.** Fracionamento cromatográfico de PRM-54.4.7.8.

**Tabela 9.** Reunião das frações de PRM-54.4.7.

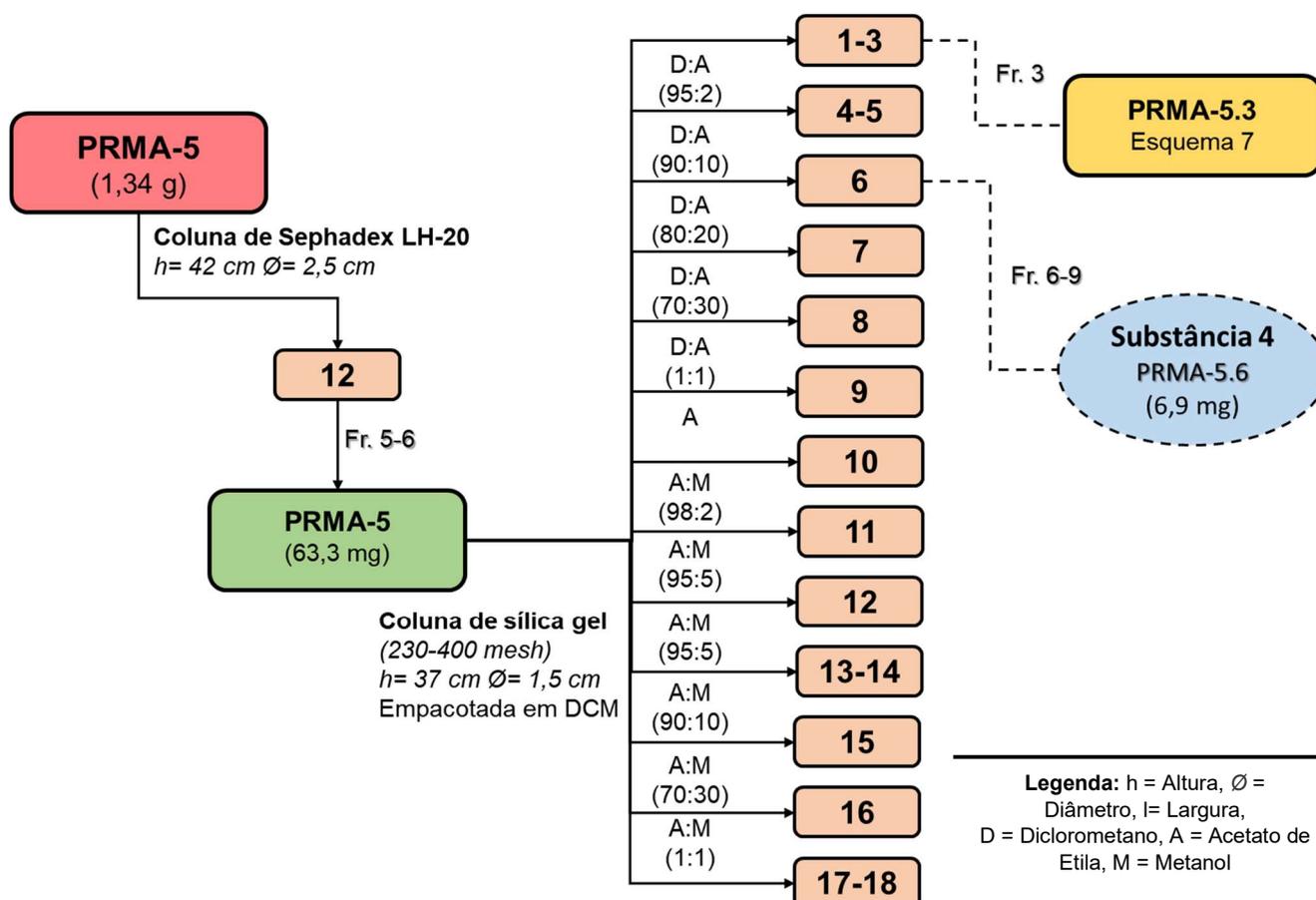
Frações reunidas	Códigos	Massa (mg)
1	PRM-54.4.7.1	0,3
2	PRM-54.4.7.2	0,2
3	PRM-54.4.7.3	0,4
4	PRM-54.4.7.4	1,0
5	PRM-54.4.7.5	0,5
6	PRM-54.4.7.6	0,1
7	PRM-54.4.7.7	1,1
<b>8-13</b>	<b>PRM-54.4.7.8</b>	<b>6,1</b>

Obs.: Descrição da Tabela vide a página 41.

### 3.7 Extrato hidroalcoólico de *Pithecellobium racemosum* (PRMA)

#### 3.7.1 Fracionamento cromatográfico do extrato hidroalcoólico

O extrato hidroalcoólico (PRMA) foi fracionada em uma coluna de Sephadex LH-20 e eluída em hexano e gradientes de hexano:metanol (Esquema 6), fornecendo 12 frações reunidas por CCD, pesadas e codificadas, como apresentado na Tabela 10 (p. 49).



**Esquema 6.** Fracionamento cromatográfico de PRMA.

**Tabela 10.** Reunião das frações obtidas de PRMA.

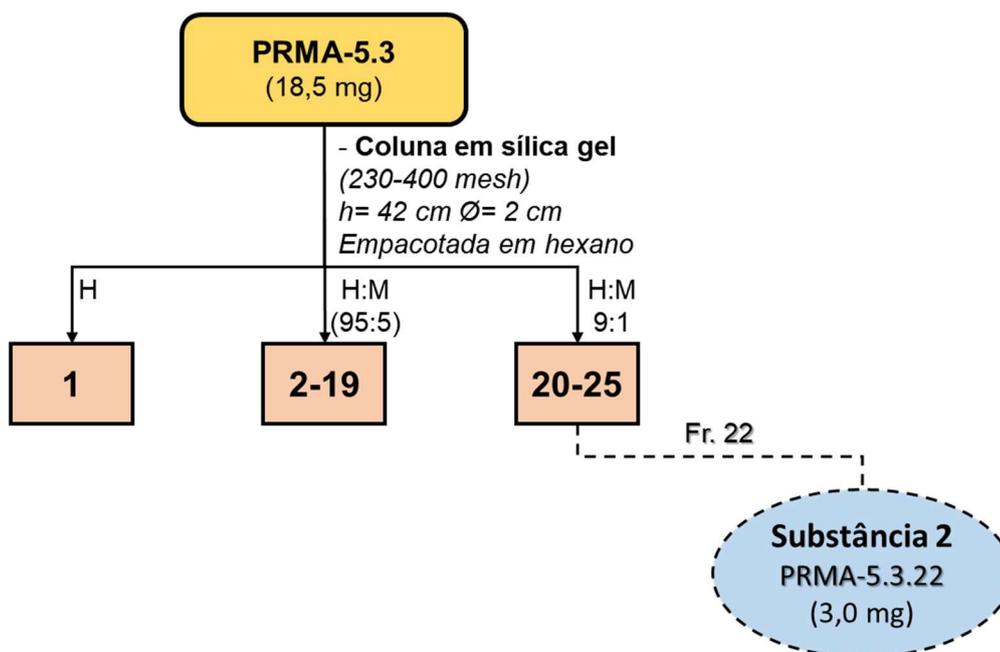
Frações reunidas	Códigos	Massa (mg)
1-4	PRMA-1	12,1
<b>5-6</b>	<b>PRMA-5</b>	<b>63,3</b>
7	PRMA-7	11,0
8	PRMA-8	58,9
9	PRMA-9	43,2
10	PRMA-10	232,7
11	PRMA-11	209,3
12	PRMA-12	135,0

A fração **PRMA-5** foi submetido à uma coluna de sílica gel (230-400 mesh), eluída em diclorometano, acetato de etila e metanol em gradientes crescente de polaridade originando 18 frações (Esquema 6, p. 48), reunidas com base em análise de CCD (Tabela 11). As frações 6-9 reunidas e codificadas em **PRMA-5.6**, se apresentou como um sólido branco e após análise de CCD, verificou-se que se tratava do mesmo sólido do **PRM-40 (Substância 4)** .

**Tabela 11.** Reunião das frações obtidas de PRMA-5.

Frações reunidas	Códigos	Massa (mg)
1-4	PRMA-5.1	27,2
<b>6-9</b>	<b>PRMA-5.6</b>	<b>6,9</b>
10-11	PRMA-5.10	8,4
12-18	PRMA-12	20,8

A subfração 3 codificada como **PRMA-5.3** foi considerada promissora, sendo submetida a um novo fracionamento em coluna de sílica gel (230-400 mesh), eluída hexano e metanol em gradientes crescente de polaridade, fornecendo 22 frações (Esquema 7 e Tabela 11). A **PRMA-5.3.22** contendo material sólido foi analisada por CCD e verificou-se que apresentava o mesmo perfil cromatográfico que a **PRH-22.3 (Substância 2)** isolado previamente.



**Esquema 7.** Fracionamento cromatográfico de PRMA-5.3.

**Tabela 12.** Reunião das frações obtidas de PRMA-5.3.

Frações reunidas	Códigos	Massa (mg)
1-4	PRMA-5.3.1	3,8
5-12	PRMA-5.3.5	2,9
13-15	PRMA-5.3.13	2,1
16	PRMA-5.3.16	1,0
17-20	PRMA-5.3.20	2,1
21	PRMA-5.3.21	0,7
<b>22</b>	<b>PRMA-5.3.22</b>	<b>3,0</b>
23	PRMA-5.3.23	1,3
14-15	PRMA-5.3.14	1,6

#### 4. Ensaios biológicos

##### 4.1 Ensaio antibacteriano - Teste de difusão em ágar

O ensaio antibacteriano foi realizado em colaboração com a plataforma de Bioensaios do Instituto Leônidas e Maria Deane – FIOCRUZ Amazônia, sob a coordenação da Profa. Dra. Patrícia Puccinelli Orlandi Nogueira. As amostras PRH-22.3, PRM-40 e PRM-16 foram submetidas à avaliação de atividade antibacteriana cepas padrões de 10 bactérias gram-positivas na concentração inicial da amostra de 1 mg/mL no poço (Tabela 13).

**Tabela 13.** Lista das cepas bacterianas gram-positivas.

Bactérias Gram-Positivas	Cepas
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> (CT)	ATCC 6051
<i>Enterococcus faecalis</i> ( <i>streptococcus faecalis</i> )	ATCC 4083
<i>Streptococcus pyogenis</i>	ATCC 19615
<i>Streptococcus mutans</i> (CT)-INCQS:00446	ATCC 25175
<i>Listeria innocua</i>	ATCC 33090
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 15313
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	ATCC 7953
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 80958
<i>Staphylococcus sumulans</i>	ATCC 27851
<i>Staphylococcus</i> resistente a meticilina	ATCC 33591

As linhagens foram cultivadas previamente em caldo Brain Heart Infusion (BHI) (HIMEDIA). As culturas microbianas foram, então, diluídas em meio de cultura conforme a escala de 0,5 de McFarland ( $1,5 \times 10^8$  UFC mL). Todos os ensaios foram feitos em triplicata.

A determinação da atividade antibacteriana foi realizada pelo método de difusão em ágar, pela técnica do poço, segundo Grove e Randall (1955), com modificações. Nesse meio de cultura solúvel em DMSO, utilizou-se 10% de diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) para auxiliar na solubilização das amostras testadas. Utilizou-se o meio de cultura Ágar Müeller Hinton (AMH) (HIMEDIA) para a realização dos testes. Como controle positivo foram utilizadas as drogas TIENAM (imipenem + cilastatina sódica) na concentração de 500  $\mu\text{g/mL}$ . As placas foram

incubadas a 37 °C por 24 horas, e então foi adicionado às placas uma solução corante de cloreto de trifetil tetrazólio (CTT) a 0,01% acrescido de 0,1% de ágar bacteriológico, ocorrendo uma reincubação por 30 minutos. Após a conversão de coloração na sobrecamada foi feita a medição dos halos de inibição.

A determinação da atividade antimicrobiana a presença de halo de inibição igual ou superior a 5 milímetros (Tabela 15).

**Tabela 14.** Critério de avaliação da atividade antimicrobiana, pelo método de difusão em ágar.

<b>Diâmetro (mm)</b>	<b>Resultado</b>
Acima 20	Boa atividade
Entre 15 a 20 mm	Moderada atividade
Entre 5 a 15mm	Pouco atividade
Ausência do halo	Inativo

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Identificação científica da espécie

A identificação botânica da espécie madeireira foi efetuada com base nas técnicas específicas aplicada na identificação macroscópica. Esse trabalho de identificação anatômica gerou um laudo técnico (Nº 04/2018), que confirma que a espécie madeireira é *Pithecellobium racemosum* Ducke.

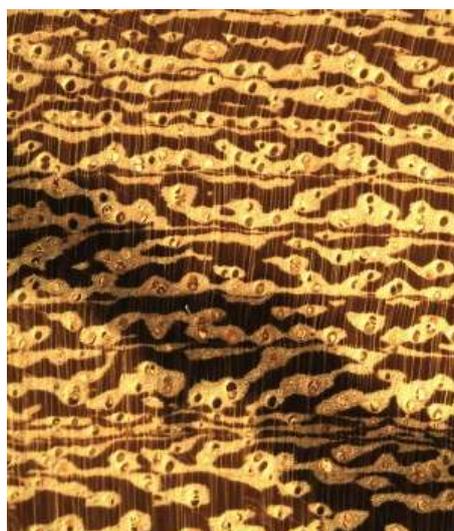
**Nome Científico:** *Pithecellobium racemosum* Ducke.

= *Zygia racemosa* (Ducke) Barneby & Grimes.

A espécie *Pithecellobium racemosum* Ducke pertence à subfamília Mimosoideae, apresenta dentre outros o nome vulgar de angelim, angelim-bordado; angelim-pintado, angelim-rajado, chico-pires, sucupira etc.

A espécie madeireira possui coloração amarelo claro a marrom-alaranjado, coberto por estrias castanho escuras que conferem uma beleza distinta. O brilho da madeira é de baixo a médio, e não possui nenhum odor ou sabor. A madeira é muito pesada e dura, sendo difícil de trabalhar com ferramentas manuais devido a sua densidade alta.

A descrição macroscópica para a espécie estudada é de parênquima axial paratraqueal, predominantemente vasicêntrico, aliforme, com confluências curtas e oblíquas, ocasionalmente em finas linhas terminais. Parênquima radial em disposição irregular. Poros pequenos à médios, predominantemente solitários, múltiplos de 2-3, obstruídos por resina da cor do lenho (Figura 5).



**Figura 5.** Macrofotografia do plano Transversal (10 X) de *Pithecellobium racemosum* Ducke.

## 5.2. Propriedades Tecnológicas

A espécie *Pithecellobium racemosum* apresentou densidade básica igual a 0,81 g/cm<sup>3</sup>, que é considerada uma densidade básica alta. Assim, a espécie *P. racemosum* é classificada como madeira de alta densidade.

De acordo com Moreschi (2012), a densidade básica serve como referência para o conhecimento sobre qualidade e classificação de uma madeira, sendo assim é uma das propriedades mais importantes, pois tendo conhecimento sobre esse parâmetro, a madeira pode ter utilidade como matéria-prima industrial ou para o consumo energético. Como a espécie *P. racemosum* possui uma densidade básica alta e suas características tecnológicas bem conhecidas, esta foi amplamente utilizada como matéria-prima industrial com demandas específicas a ser utilizada na confecção de assoalhos, construção civil, laminados, faqueados, marcenaria de luxo, carpintaria, cabo de talheres, bengalas, dormentes etc (INPA/CPPF, 1991).

**Quadro 6.** Propriedades tecnológicas de *Pithecellobium racemosum*.

Espécie	Propriedades físicas			
	Densidade básica (g/cm <sup>3</sup> )	Contração tangencial (%)	Contração radial (%)	Fator anisotrópico
<i>Pithecellobium racemosum</i>	0,81	12,4	6,54	1,90

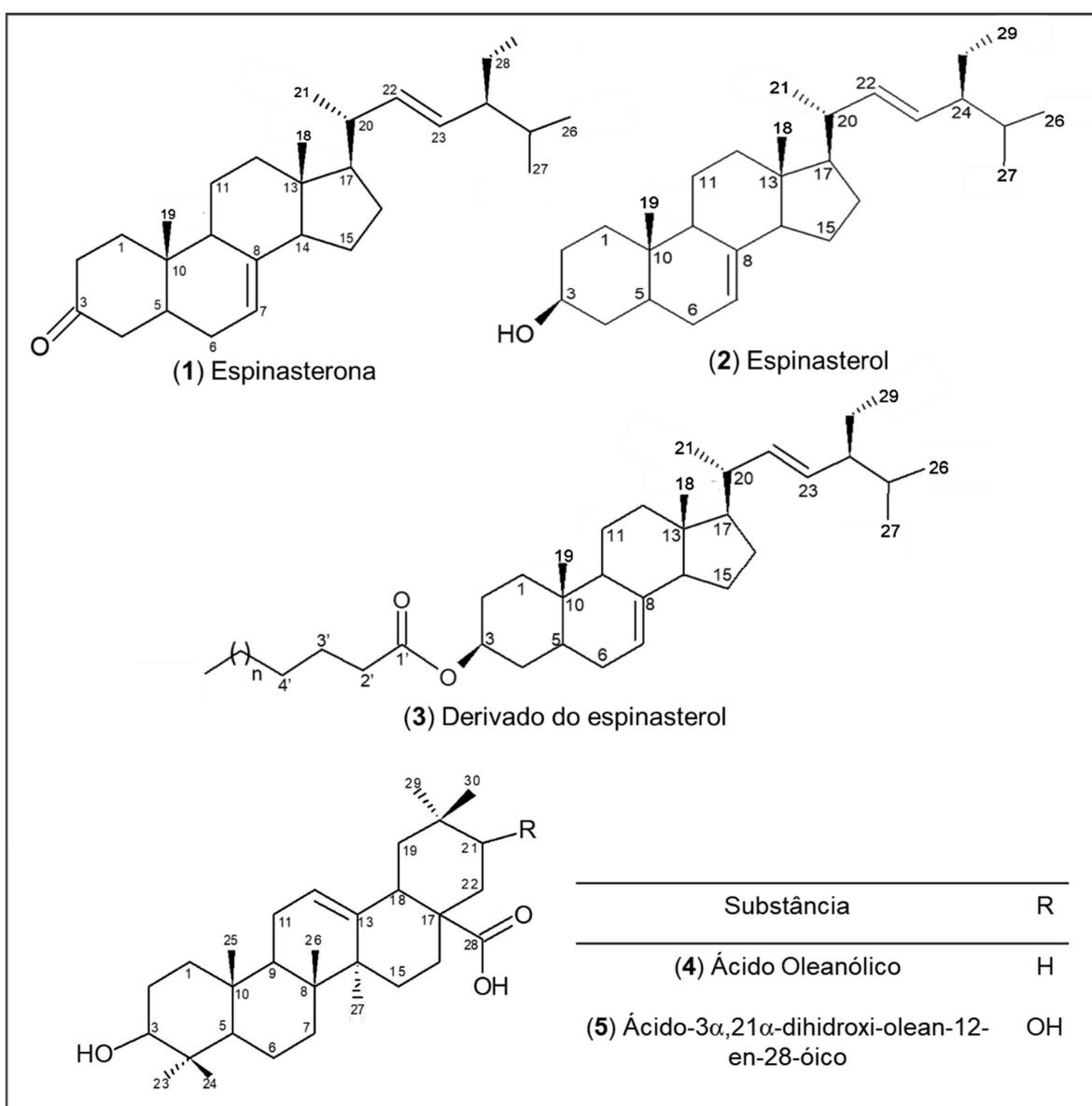
Dentre as propriedades físicas mais importantes a serem analisadas, é o fator anisotrópico, que é definido pela relação direta das contrações tangencial e radial (T/R) (SILVA *et al.*, 2006). O fator anisotrópico de *P. racemosum* foi 1,90, o que significa que a referida espécie é de excelente qualidade, pois quanto maior o coeficiente de anisotropia, menor é a resistência mecânica aos defeitos de secagem como empenamento da madeira.

### 5.3. Estruturas das substâncias identificadas

Os estudos fitoquímicos com os resíduos de *P. racemosum* resultaram no isolamento e na identificação de cinco substâncias (Quadro 7), sendo as substâncias **1** e **2** isoladas a partir do extrato hexânico, as substâncias **3-5** oriundas do extrato metanólico. O extrato hidroalcoólico também forneceu **2** e **4**.

A determinação estrutural dessas substâncias foi realizada com base nas técnicas de RMN unidimensionais ( $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ) e/ou bidimensionais (HSQC e HMBC), aliada à espectrometria de massas de alta resolução (EMAR).

**Quadro 7.** Metabólitos secundários identificados em *P. racemosum*.



#### 5.4. Rendimentos dos extratos de *P. racemosum*

Os rendimentos dos extratos hexânico, metanólico e hidroalcoólico estão descritos de acordo com a tabela abaixo, e através de análise do perfil cromatográfico decidiu-se estudá-las, pois demonstraram-se promissoras.

**Tabela 15.** Códigos e massas dos extratos madeireiros de *P. racemosum*.

Massa da amostra (g)	Extratos		Rendimento (%)
	Código	Massa (g)	
1.220	PRH	0,61	0,05
	PRM	4,44	0,36
	PRMA	1,34	0,08

#### 5.5. Identificação da substância 1

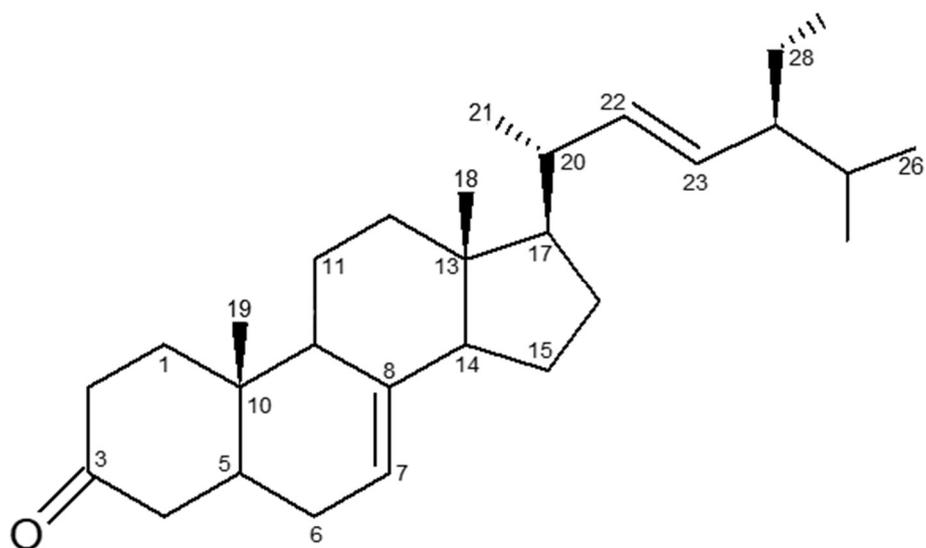
A substância 1 (Figura 6) foi isolada do extrato hexânico e metanólico [Esquemas 2 (p. 36) e 3 (p. 38)], apresentou-se como um sólido branco amorfo e solúvel em diclorometano. Na análise em CCD foi possível detectar apenas uma absorção no UV 254 nm, e após revelação em vanilina sulfúrica uma mancha de cor amarela e com  $R_f = 0,53$  quando eluída em Hex:AcOEt (8:2).

Esta substância foi identificada com base no espectro de unidimensionais (RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ) e bidimensional (HSQC e HMBC). Através dos dados obtidos com os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 7), é possível verificar um perfil típico de esteroide, onde foi possível verificar, os valores correspondentes à seis metilas com sinais nas regiões entre  $\delta$  1,05-0,58 e sinais de hidrogênios olefínicos em  $\delta$  5,20 (1H, *dd*;  $J = 15,2$  Hz;  $J = 8,7$  Hz), 5,19 (1H, *m*) e 5,07 (1H, *dd*;  $J = 15,2$  Hz;  $J = 8,8$  Hz).

Os sinais dos carbonos foram todos observados pelos mapas de correlação HSQC (Figura 7) e HMBC (Figura 8), sendo os deslocamentos em  $\delta$  117,00 (C-7), 138,08 (C-22) e 129,52 (C-23) característico de carbonos com hibridização  $sp^2$ . O mapa de contornos HSQC mostra as correlações entre o hidrogênio em  $\delta$  5,19 com o carbono em  $\delta$  117,2 (C-7), além das correlações entre os hidrogênios em  $\delta$  5,20 e 5,07 com os carbonos em  $\delta$  138,08 (C-22) e 129,52 (C-

23), respectivamente. No HMBC verificou-se as correlações entre o sinal do hidrogênio em  $\delta$  1,05 (H-21) com o deslocamento do carbono em  $\delta$  40,85 (C-20).

Os dados espectrais obtidos para a substância **1** foram semelhantes aos apresentados por Thuy e colaboradores (2008) (Tabela 16, p. 58) permitindo assim, identificar **1** como Espinasterona ( $24\alpha(S)$ -etil- $5\alpha$ -colesta-7, $trans$ -22-dien-3-ona), sendo este seu primeiro relato no gênero de *Pithecellobium*.



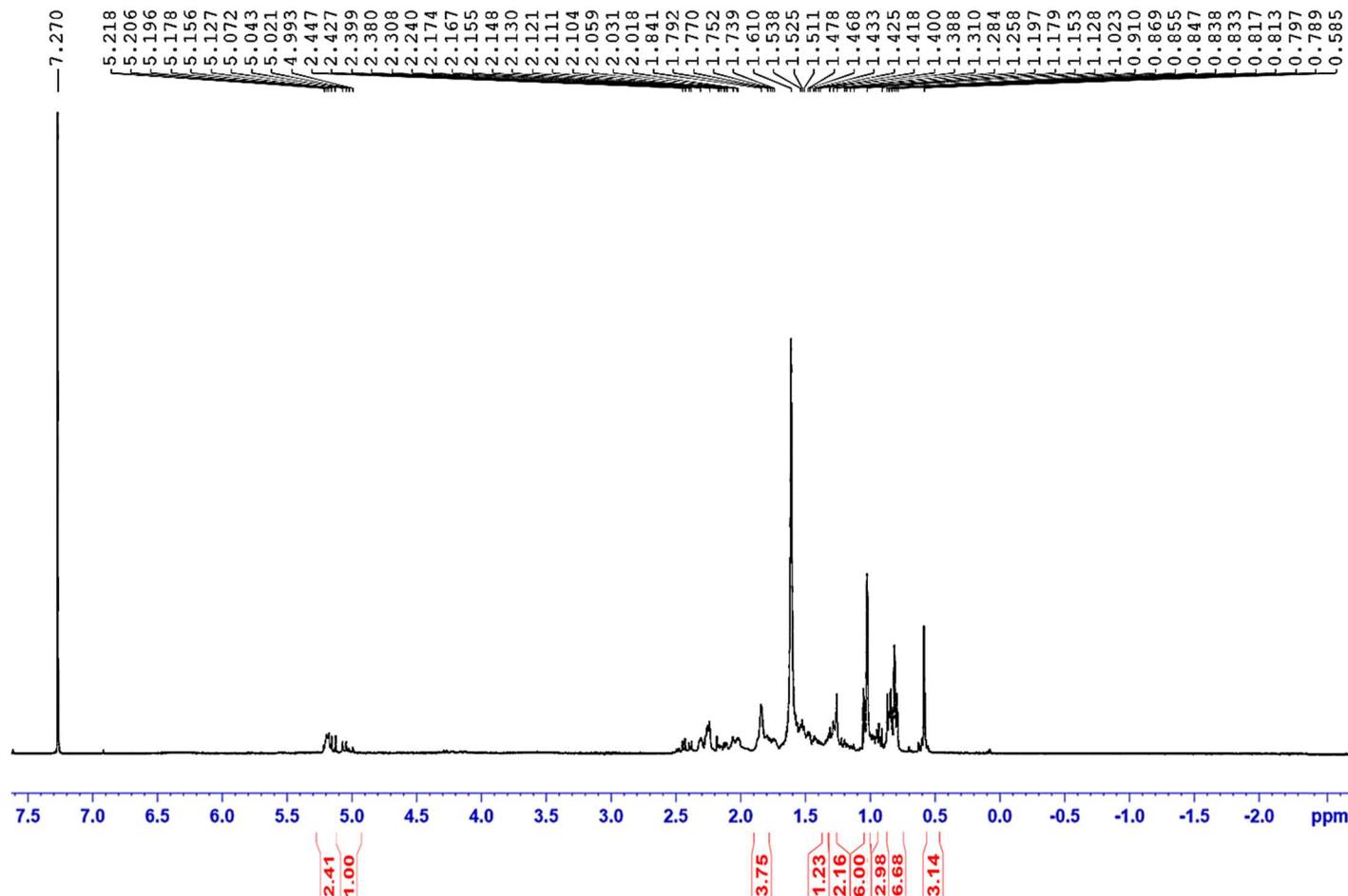
**Figura 6.** Estrutura da Espinasterona.

**Tabela 16.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e HMBC da espinaisterona.

Nº	$^1\text{H}$ $\delta$ (ppm); mult. J (Hz) <sup>1*</sup>	$^{13}\text{C}$ $\delta$ (ppm) <sup>2*</sup>	HMBC <sup>3*</sup>	$^{13}\text{C}$ $\delta$ (ppm) <sup>4*</sup>
	Substância 1			Thuy <i>et al.</i> (2008)
1	1,46 (m) 2,14 (ddd; 13,1; 5,7; 2,1)	38,8		38,79
2	2,30 (m) 2,37 (dd; 14,4; 6,1)	38,1		38,15
3	----	212,1		211,68
4	2,23 (m)	44,3		44,3
5	1,84 (s) 1H	42,9		42,88
6	1,84 (s) 2H	30,1		30,10
7	5,19 (t; 5,3) 1H	117,0		116,88
8	----	139,5		139,33
9	1,79-1,73 (m)	48,8		48,85
10	----	34,4		34,44
11	1,61 (s)	21,7		21,76
12	1,31 (s) 2,05-2,01 (m)	39,3		39,35
13	----	43,3		43,37
14	1,84 (s) 1H	55,0		55,02
15	1,53-1,46 (m)	23,0		23,02
16	1,25 (s)	29,7		28,55
17	1,28 (s)	55,9		55,85
18	0,58 (s)	12,1	C-12, C-13, C-17	11,98
19	1,02 (sl) 3H	12,3	C-8, C-9, C-10, C-12, C-13, C-14	12,34
20	2,03-2,01 (m)	40,8		40,86
21	1,02 (sl) 3H	21,4		21,76
22	5,20 (dd; 15,2; 8,7)	138,1		137,92
23	5,07 (dd; 15,2; 8,8)	129,5		129,37
24	1,52 (m)	51,2		51,25
25	1,52 (m)	31,9		31,91
26	0,84 (d; 6,2)	19,0	C-27, C-28	19,06
27	0,86 (d; 6,4)	21,1	C-24, C-25, C-26	21,45
28	1,19-1,12 (m) 1,43-1,19 (m)	25,4		25,45
29	0,84 (t; 7,3)	12,5		12,34

1\* 75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ; 2\* 300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ; 3\* 100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ; 4\* 400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ .

PRH-13 (1H; CDCl<sub>3</sub>; 2,2 mg)  
 07/06/2018  
 Op. Sabrina



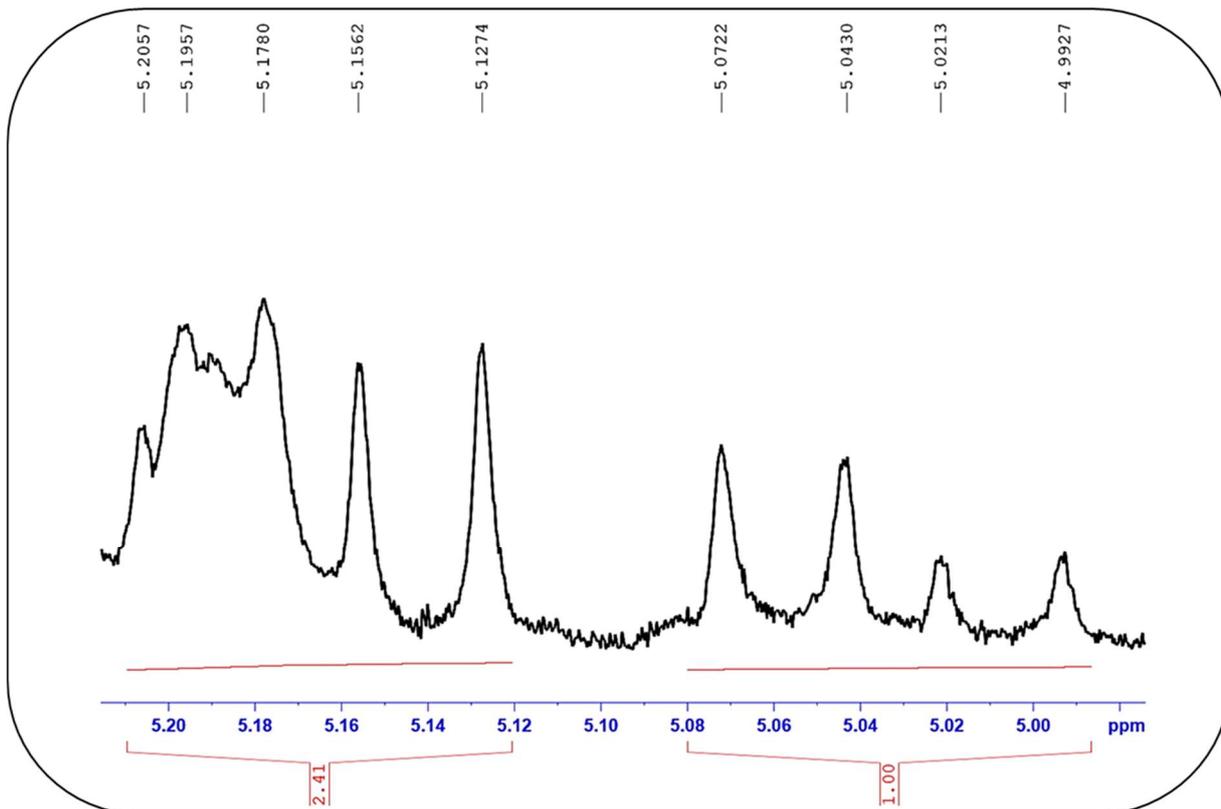
Current Data Parameters  
 NAME PRH\_13  
 EXPNO 1  
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters  
 Date\_ 20180607  
 Time\_ 15.51  
 INSTRUM FOURIER300  
 PROBHD 5 mm DUL 13C-1  
 PULPROG zg  
 TD 65536  
 SOLVENT CDCl<sub>3</sub>  
 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 292.4 K  
 D1 1.00000000 sec  
 TD0 1

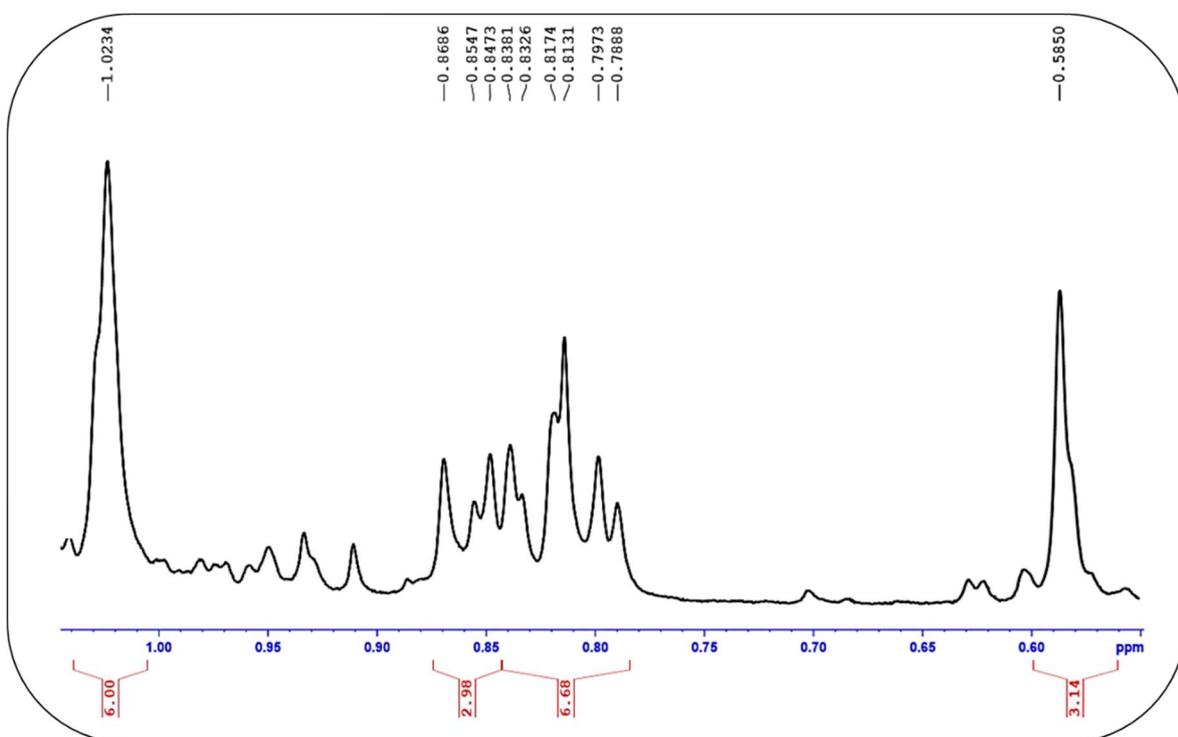
==== CHANNEL f1 =====  
 SFO1 300.2019513 MHz  
 NUC1 1H  
 P1 7.88 usec  
 PLW1 20.00000000 W

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

Figura 7. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de PRH-13.



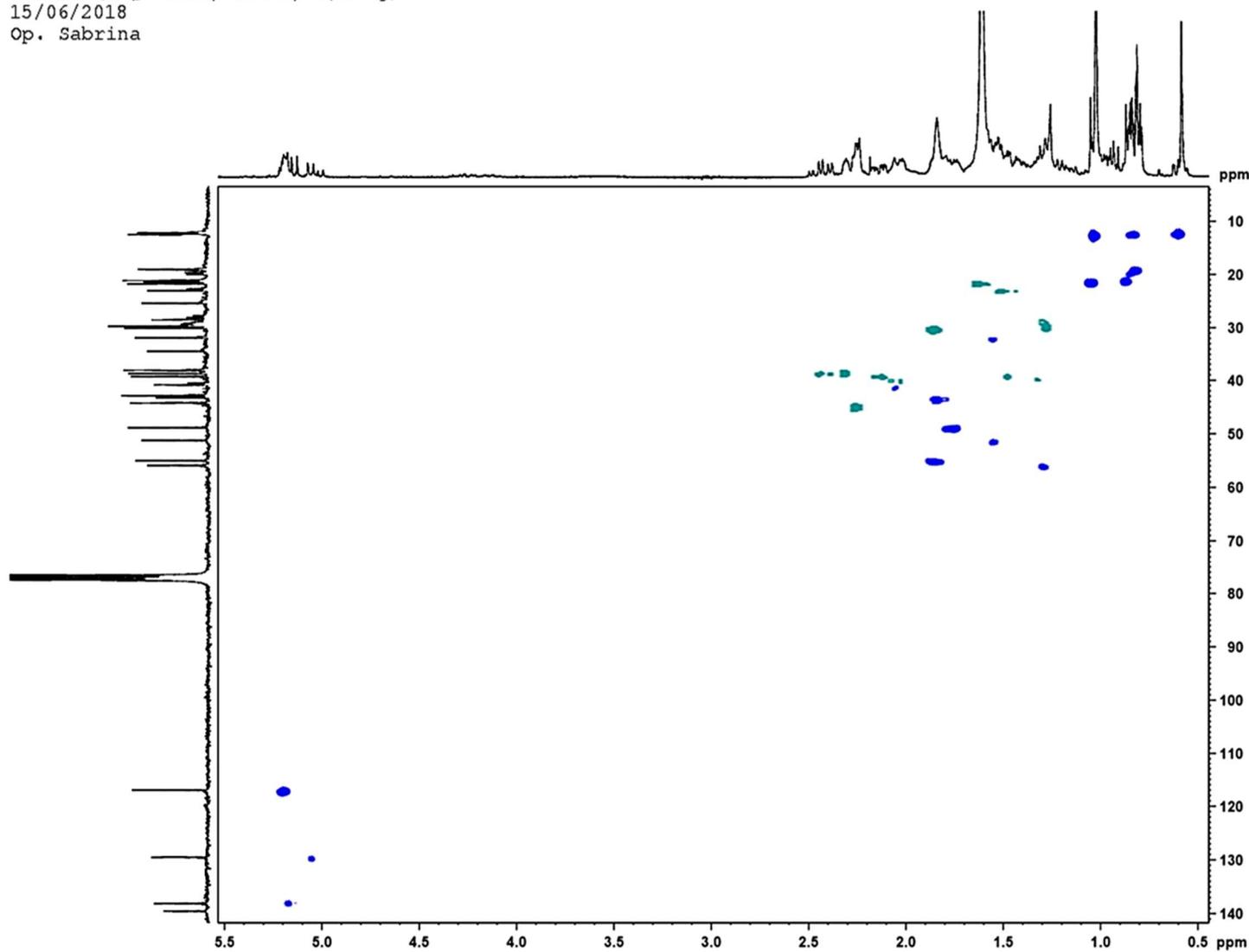
**Figura 8.** Ampliação dos sinais de RMN de  $^1\text{H}$  de PRH-13 na região de hidrogênios olefínicos.



**Figura 9.** Ampliação dos sinais de RMN de  $^1\text{H}$  de PRH-13 na região de hidrogênios metílicos.



PRH-13 (HSQC-edit; CDCl3; 2,2 mg)  
15/06/2018  
Op. Sabrina



Current Data Parameters  
NAME PRH\_13  
EXPNO 2  
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters  
Date\_ 20190131  
Time 15.26  
INSTRUM FOURIER300  
PROBHD 5 mm DUL 13C-1  
PULPROG zgpg30  
TD 32768  
SOLVENT CDCl3  
NS 71680  
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 293.8 K  
D1 0.10000000 sec  
D11 0.03000000 sec  
D31 0.00000875 sec  
D40 0.03084430 sec  
L4 20  
L5 2  
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  
CPDPRG[2] waltz16  
PCPD2 90.00 usec  
PLW2 20.00000000 W  
PLW12 0.16806000 W  
PLW13 0.13613001 W

F2 - Processing parameters  
SI 32768  
SF 75.4853500 MHz  
WDW EM  
SSB 0  
LB 3.00 Hz  
GB 0  
PC 1.40

Figura 11. Mapa de correlações de HSQC editado de PRH-13.

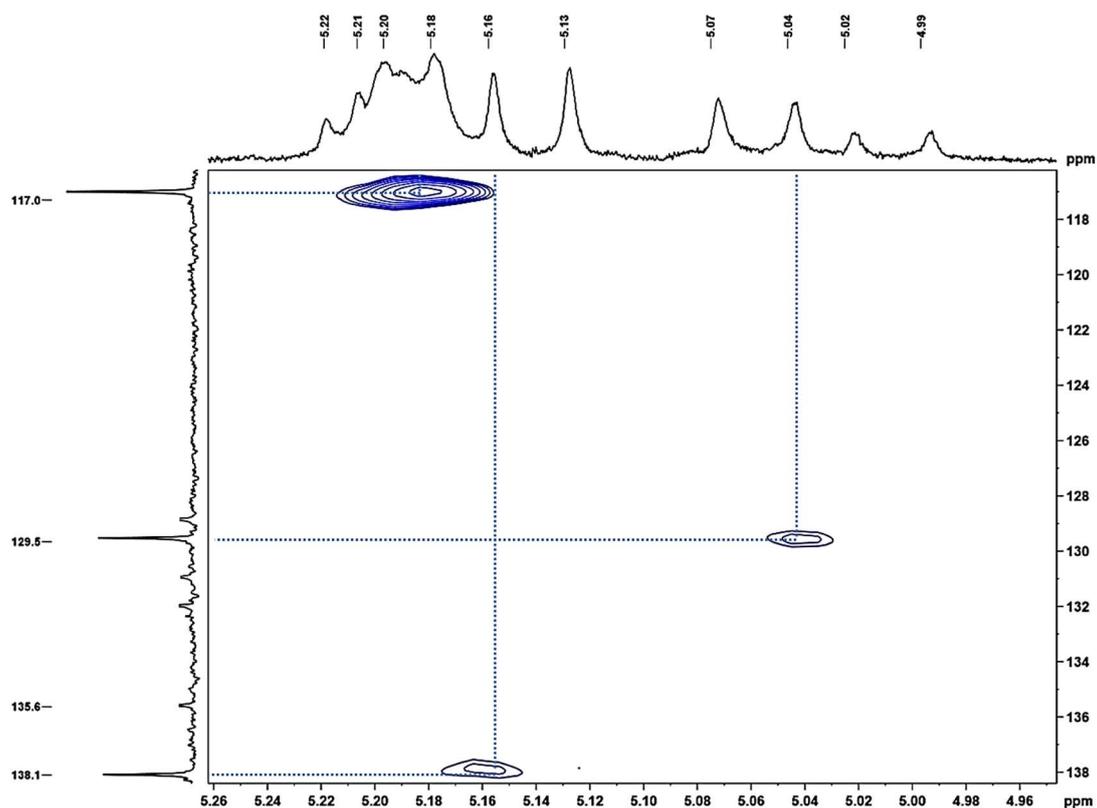


Figura 13. Ampliação da região de hidrogênios olefínicos do mapa de correlação de HSQC-edit de PRH-13.

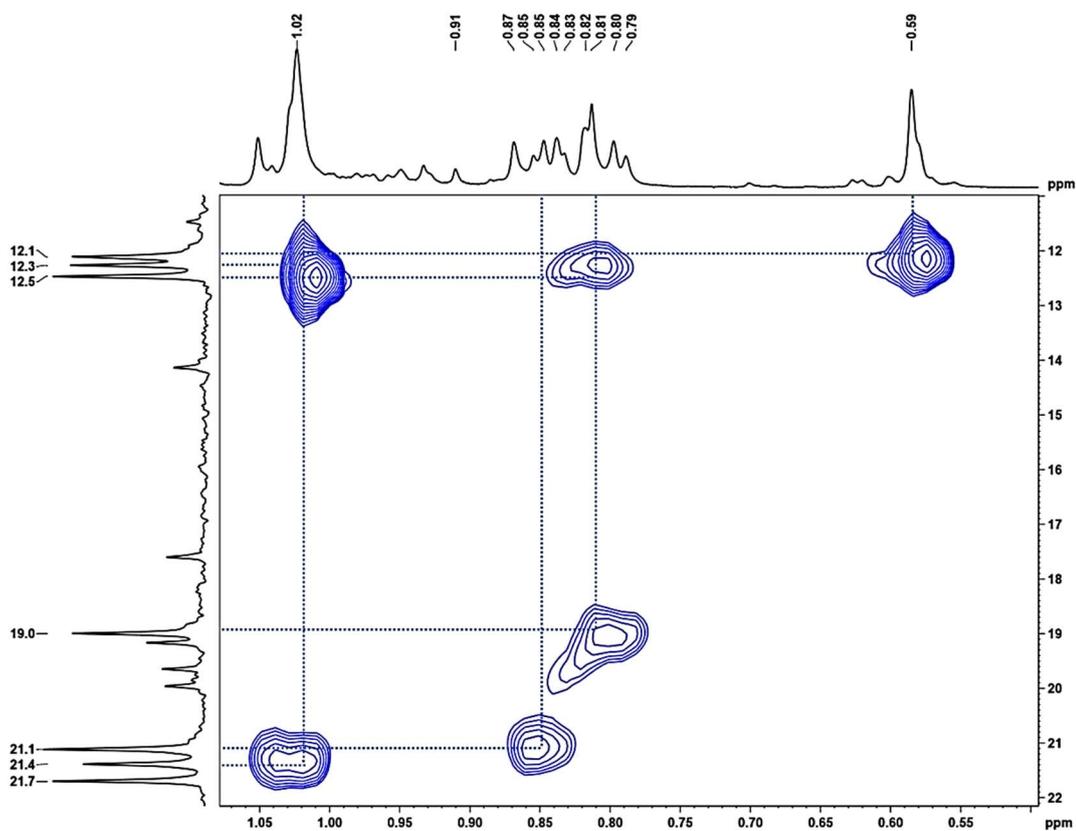


Figura 12. Ampliação da região de hidrogênios metílicos do mapa de correlação de HSQC-edit de PRH-13.

PRH-13 (HMBC; CDCl3; 2,2 mg)  
 16/06/2018  
 Op. Sabrina

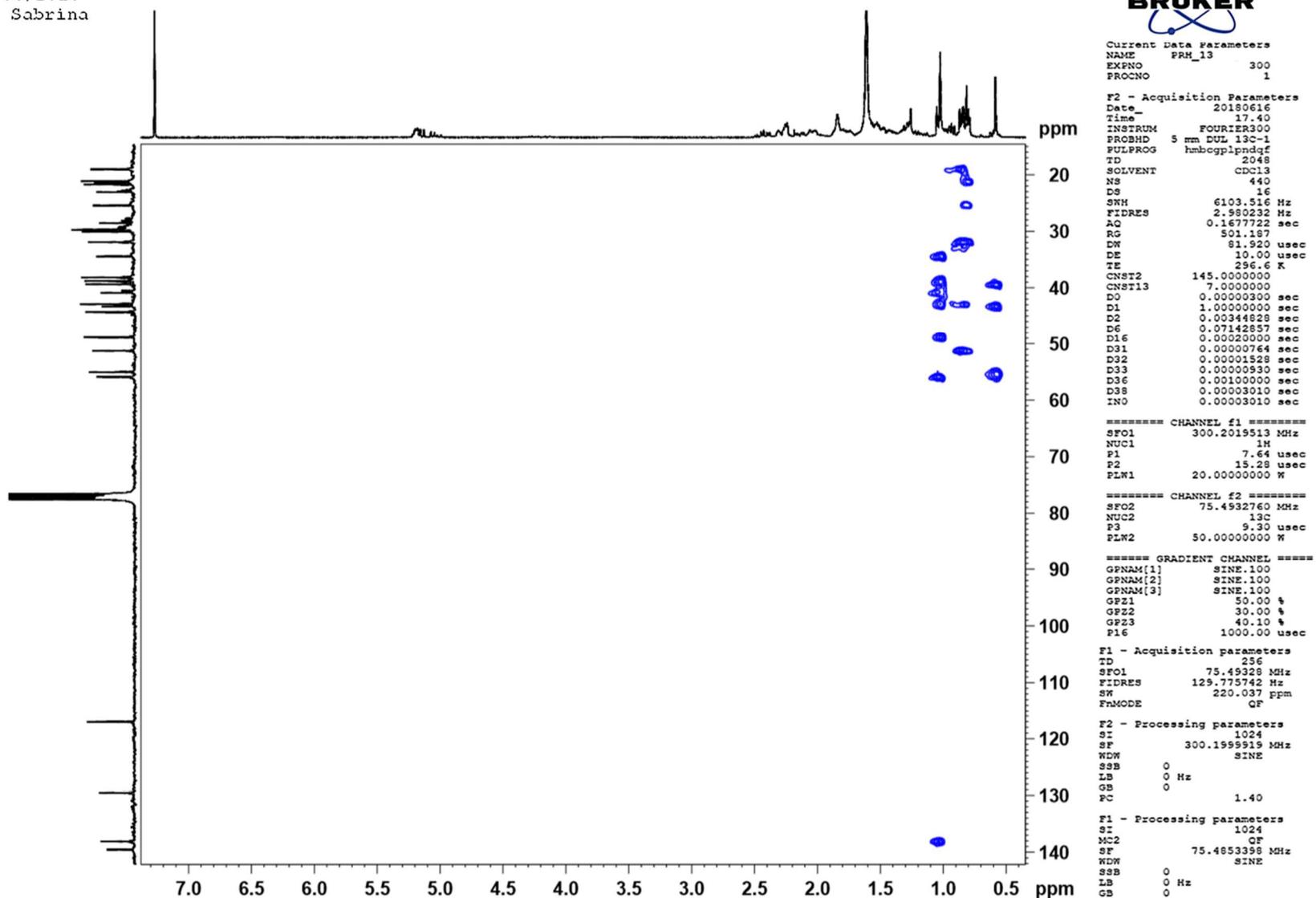
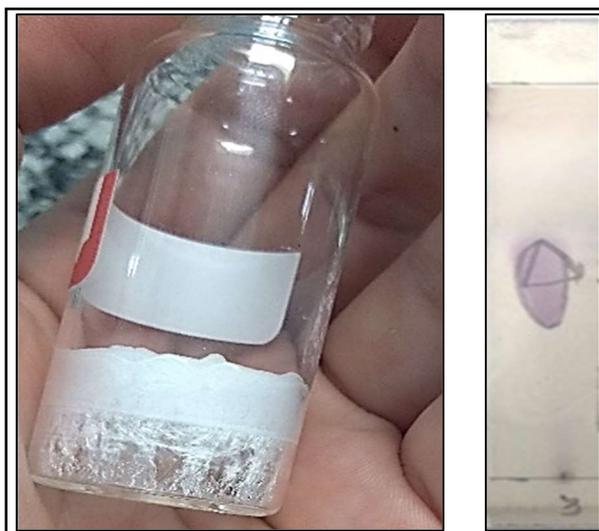


Figura 14. Mapa de correlações de HMBC de PRH-13.

## 5.6 Identificação da substância 2

A substância **2** (Figura 16) foi isolada do extrato hexânico e hidroalcoólico [Esquemas 2 (p. 36) e 7 (p. 45)], e apresentou-se como sólido branco, em CCD apresenta uma mancha roxa com  $R_f = 0,5$  (Figura 15) quando eluída em diclorometano e revelada em vanilina sulfúrica e fluorescência em luz UV 365 azul.



Fonte: arquivo pessoal (2018).

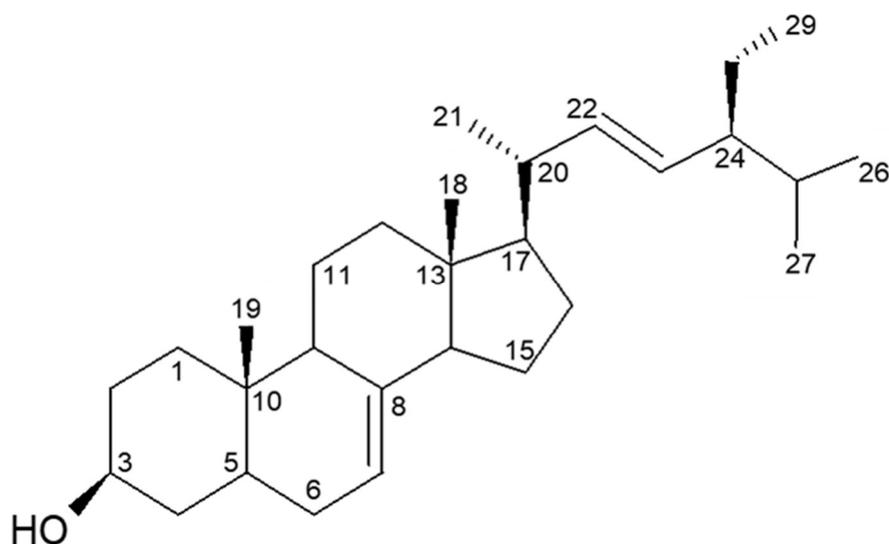
**Figura 15.** Sólido branco da subfração 3 (PRH-22.3) e CCD.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 17) da **substância 2** apresentou perfil típico de esteroide, pois apresentou sinais característicos de metilas nas regiões entre  $\delta$  1,03-0,55 e dois sinais nas regiões de hidrogênios olefínicos em  $\delta$  5,06 (1H, *dd*,  $J = 15,1$  Hz,  $J = 8,5$  Hz), 5,19 (*dd*;  $J = 15,1$ ,  $J = 8,6$ ) e 5,16 (*m*). Além dos sinais característicos de esteroides, esta substância apresentou um multiplete em  $\delta$  3,65 característico de hidrogênio oximetínico da posição-3, o que permitiu diferenciá-la do esteroide identificado anteriormente neste trabalho (substância 1).

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  apresentou sinais de 29 átomos de carbono dos quais quatro sinais são característicos de carbonos olefínicos sugerindo a presença de duas insaturações em C-7 e C-8 ( $\delta$  117,5 e 138,2) e a outra entre C-22 e C-23 ( $\delta$  129,4 e 139,6). O sinal do carbono carbinólico do esteroide foi verificado em  $\delta$  71,1 (C-3).

Os dados de espectrometria de massas de alta resolução (modo positivo de ionização) sugeriram a fórmula molecular  $C_{29}H_{47}O$  para a substância 2, com o pico do íon molecular  $[M+H]^+$  de  $m/z$  411,3618 (Figura 21).

A partir dos dados espectrais e espectrométricos obtidos de PRH-22.3 em comparação com os deslocamentos químicos de RMN de  $^1H$  e  $^{13}C$  registrados por Ragasa e Lima (2005) (Tabela 17, p. 67), foi possível identificar e propor a estrutura do Espinasterol ((22*E*)-estigmasta-7,22-dien-3 $\beta$ -ol) (Figura 16), esteroide que já havia sido previamente relatado no gênero de *Pithecellobium* pelos trabalhos de Nigam e colaboradores (1968) e Gunasekera e colaboradores (1982).



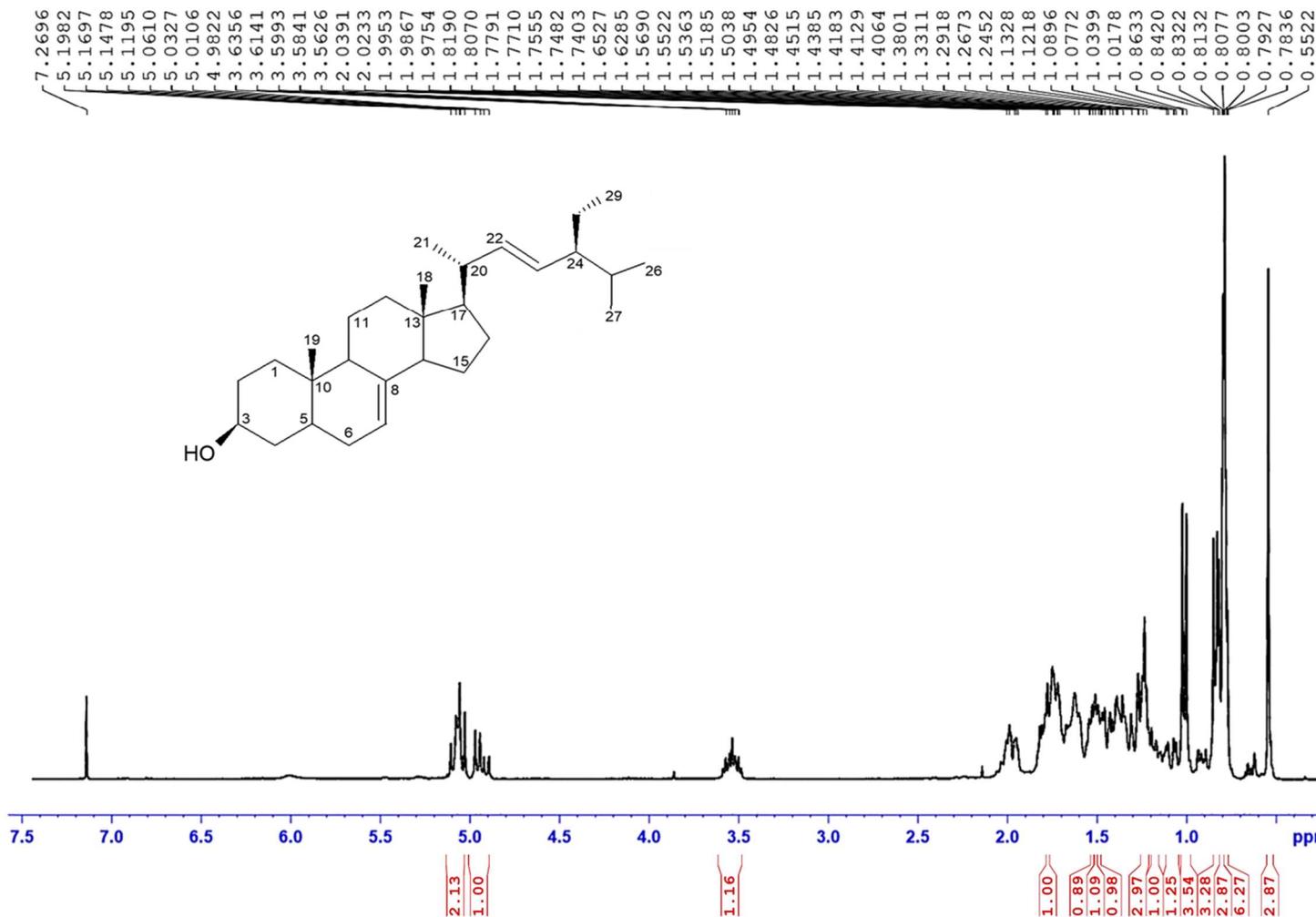
**Figura 16.** Estrutura do Espinasterol.

**Tabela 17.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  do espinasterol.

N <sup>o</sup>	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$
	$\delta$ (ppm) <sup>1*</sup>	$\delta$ (ppm); mult. J (Hz) <sup>2*</sup>	$\delta$ (ppm) <sup>3*</sup>	$\delta$ (ppm); mult. J (Hz) <sup>4*</sup>
Substância 2		Ragasa e Lima (2005)		
1	37,1	1,09; 1,80	37,2	1,09; 1,82
2	31,4	1,38; 1,77 ( <i>m</i> )	31,5	1,39; 1,77
3	71,0	3,65 ( <i>m</i> )	71,1	3,59
4	37,9	1,38; 1,70	38,0	1,27; 1,77
5	40,2	1,41 ( <i>m</i> )	40,3	1,40
6	29,6	1,21; 1,74 ( <i>m</i> )	29,7	1,22; 1,74
7	117,4	5,16 ( <i>m</i> )	117,5	5,15
8	139,5	----	139,6	----
9	49,4	1,65 ( <i>m</i> )	49,5	1,65
10	34,2	----	34,2	----
11	21,5	1,48 ( <i>m</i> )	21,6	1,48
12	39,4	1,24; 2,02	39,6	1,23; 2,02
13	43,2	----	43,3	----
14	55,1	1,80 ( <i>s</i> )	55,1	1,81
15	23,0	1,41; 1,52	23,0	1,40; 1,52
16	28,5	1,25 (2H)	28,5	1,25 (2H)
17	55,8	1,25	55,9	1,25
18	12,0	0,55 ( <i>s</i> )	12,0	0,55 ( <i>s</i> )
19	13,0	0,80 ( <i>s</i> )	13,0	0,80 ( <i>s</i> )
20	40,8	2,03 ( <i>m</i> )	40,8	2,05
21	21,3	1,03 ( <i>d</i> ; 6,60)	21,4	1,03 ( <i>d</i> ; 6,8)
22	138,1	5,19 ( <i>dd</i> ; 15,1; 8,6)	138,1	5,16 ( <i>dd</i> ; 15,2; 8,8)
23	129,4	5,06 ( <i>dd</i> ; 15,1; 8,5)	129,5	5,02 ( <i>dd</i> ; 15,2; 8,4)
24	51,2	1,55 ( <i>m</i> )	51,2	1,55
25	31,8	1,53 ( <i>m</i> )	31,9	1,55
26	21,1	0,85 ( <i>d</i> ; 6,4)	21,1	0,85 ( <i>d</i> ; 6,4)
27	18,9	0,82 ( <i>d</i> ; 5,7)	19,0	0,84 ( <i>d</i> ; 6,0)
28	25,4	1,16; 1,42 ( <i>m</i> )	25,4	1,18; 1,42
29	12,2	0,80 ( <i>t</i> ; 7,3)	12,2	0,81 ( <i>t</i> ; 7,2)

1\* 75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ; 2\* 300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ; 3\* 100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ; 4\* 400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ .

PRH-22.3 (1H; CDCl<sub>3</sub>; 24,6 mg)  
 13/07/2018  
 Op.: Sabrina



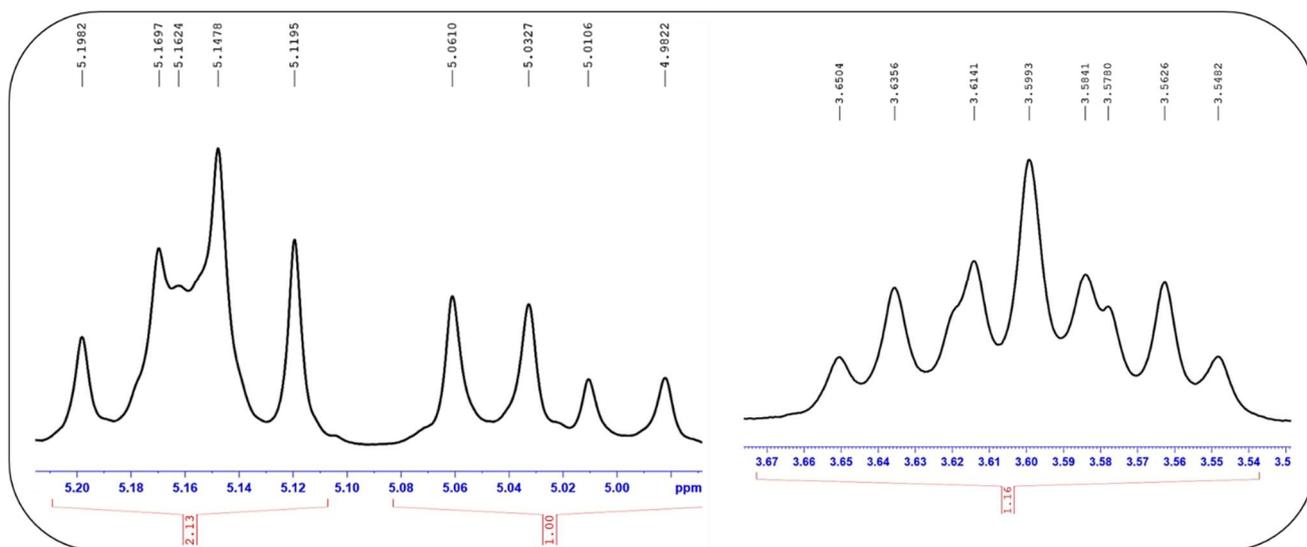
Current Data Parameters  
 NAME PRH\_22\_3  
 EXPNO 1  
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters  
 Date\_ 20180713  
 Time 8.19  
 INSTRUM FOURIER300  
 PROBHD 5 mm DUL 13C-1  
 PULPROG zg  
 TD 65536  
 SOLVENT CDCl<sub>3</sub>  
 NS 32  
 DS 0  
 SWH 6103.516 Hz  
 FIDRES 0.093132 Hz  
 AQ 5.3687091 sec  
 RG 3.22351  
 DW 81.920 usec  
 DE 10.00 usec  
 TE 1018.3 K  
 D1 1.00000000 sec  
 TDO 1

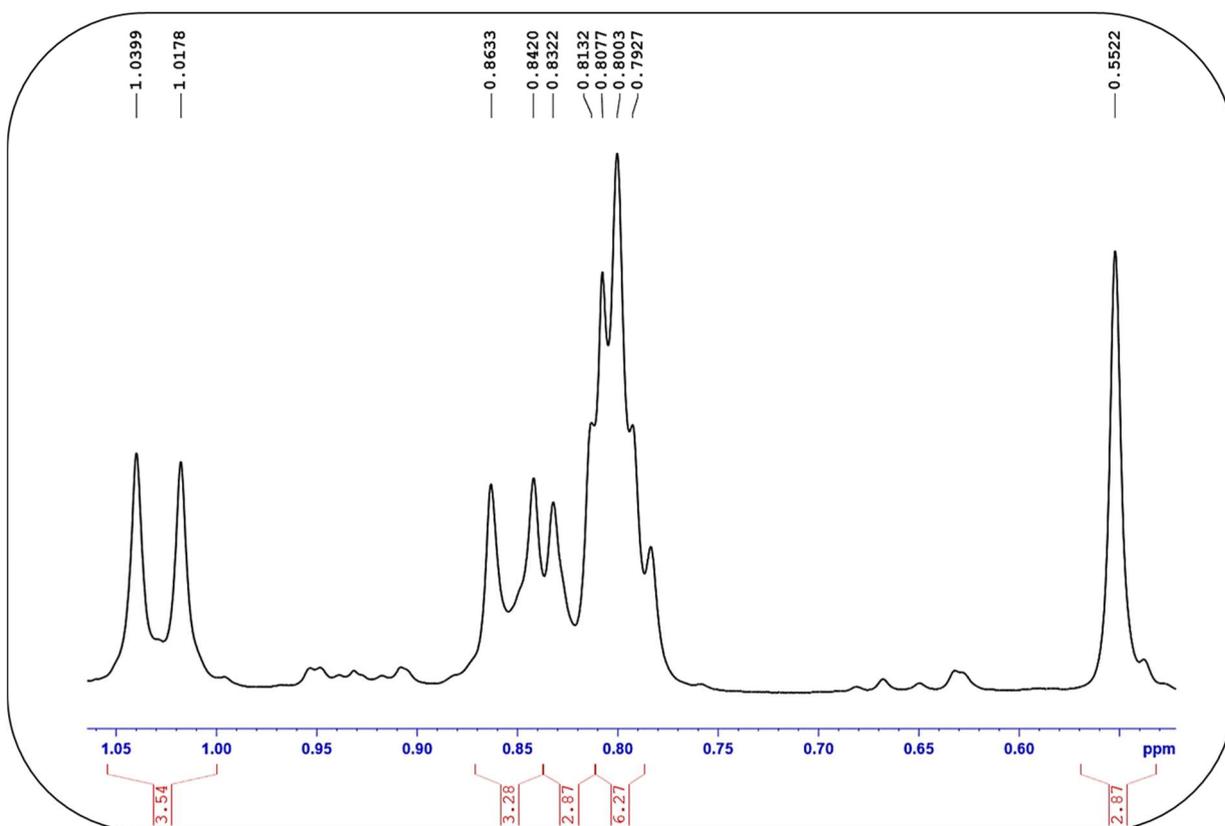
==== CHANNEL f1 =====  
 SF01 300.2019513 MHz  
 NUC1 1H  
 P1 7.88 usec  
 PLW1 20.00000000 W

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

Figura 17. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de PRH-22.3.



**Figura 18.** Ampliação dos sinais de RMN de  $^1\text{H}$  de PRH-22.3 na região de hidrogênios olefínicos e oximético.



**Figura 19.** Ampliação dos sinais de RMN de  $^1\text{H}$  de PRH-22.3 na região de hidrogênios metílicos.

PRH-22.3 (13C; CDC13; 24,6 mg)  
 13/07/2018  
 Op.: Sabrina

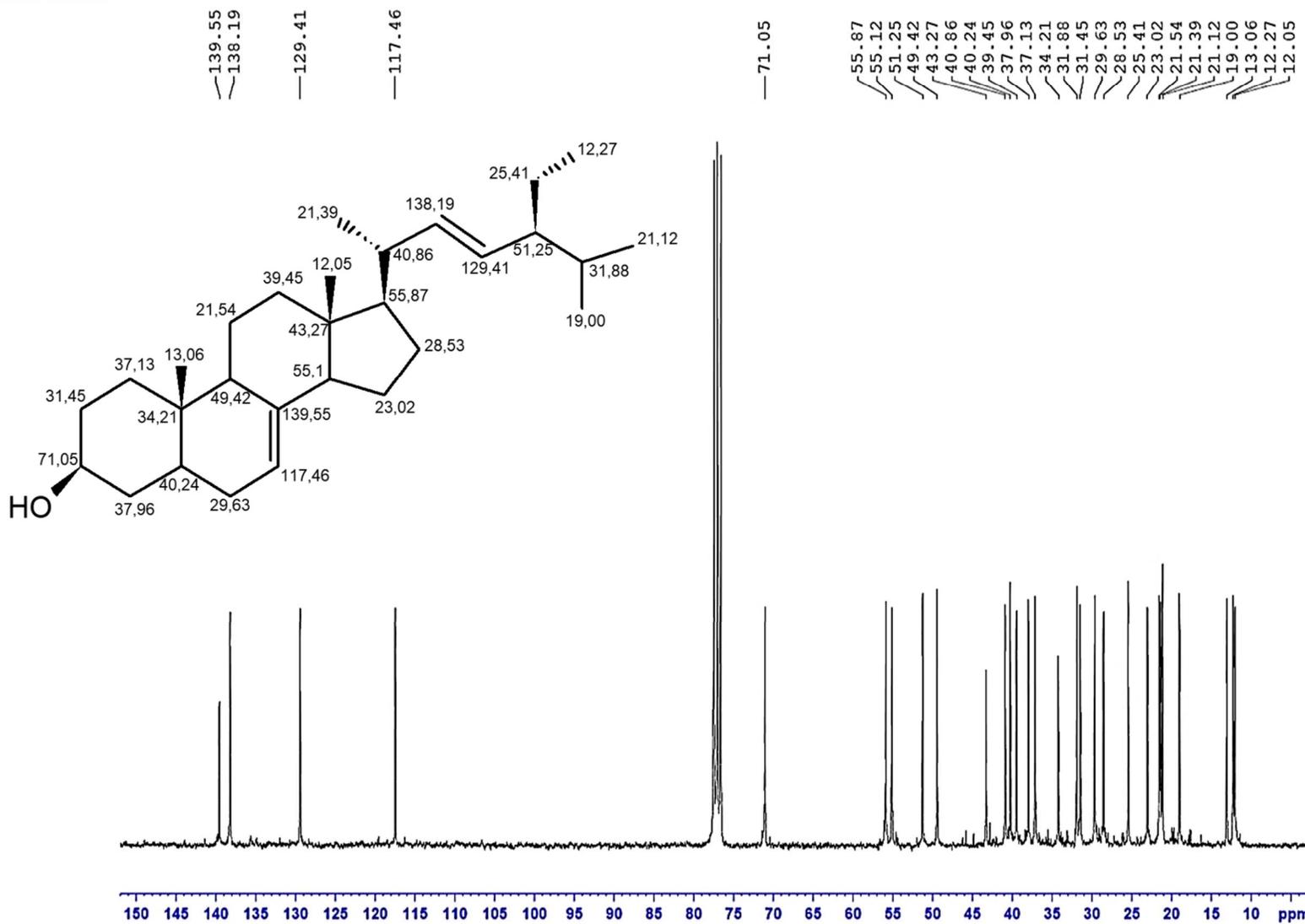
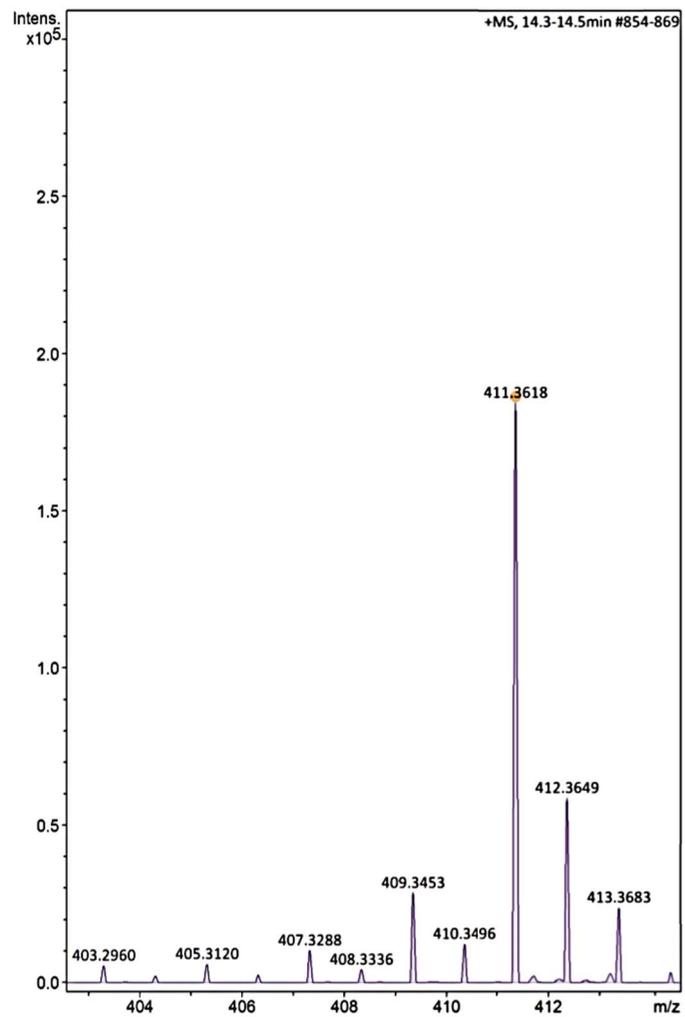


Figura 20. Espectro de RMN <sup>13</sup>C de PRH-22.3 (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



**Figura 21.** Espectro de Massas de Alta Resolução de PRH-22.3 (ESI, modo positivo).

### 5.7 Identificação da substância 3

A substância **3** (Figura 22) apresentou-se como sólido branco amorfo e foi isolada do extrato metanólico, conforme o Esquema 2 (p. 41). Em CCD apresenta uma mancha de coloração roxa com  $R_f = 0,3$  quando eluída em Hex:AcOEt (9:1).

A identificação desta substância foi realizada mediante às análises de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , HSQC-edit, HMBC, DEPT e espectrometria de massas. A partir do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 24) surgiu a hipótese de que a fração PRM-16 se tratava de outro esteroide. Pois, foi possível destacar através do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 23), entre outros sinais, um multipeto em  $\delta$  3,66 (1H, *m*) característico de hidrogênio oximetínico. E sinais referentes as regiões de metilas em  $\delta$  1,04-0,55 e sinais referente aos três hidrogênios olefínicos em  $\delta$  5,06 (*dd*,  $J = 15,1$  Hz,  $J = 8,5$  Hz), 5,19 (*dd*;  $J = 15,1$  Hz; 8,5 Hz) e 5,16 (*m*).

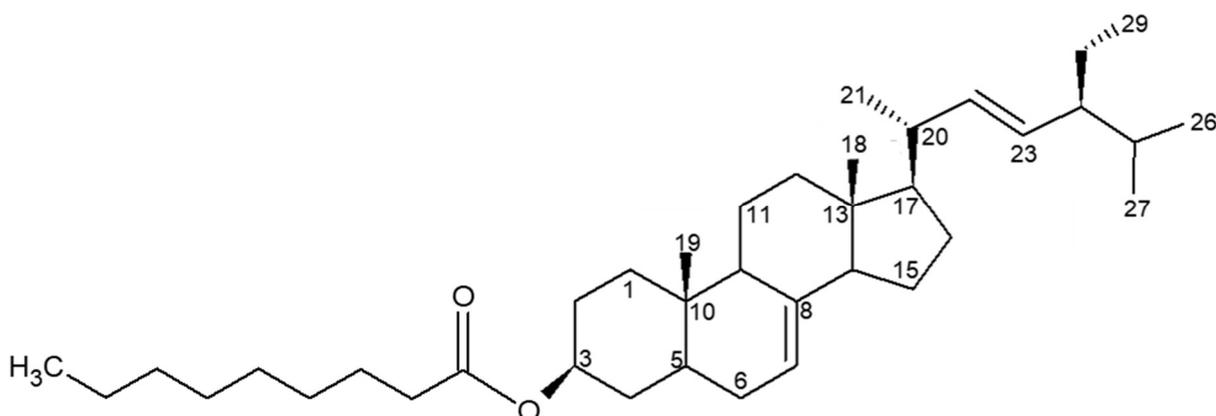
O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 24) apresenta sinais de carbonos olefínicos com insaturações em C-7 e C-8 ( $\delta$  117,5 e 139,6) e entre C-22 e C-23 ( $\delta$  129,4 e 138,2). Além desses sinais, o espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  apresentou sinal em  $\delta$  71,1 característico de carbono carbinólico em C-3 de esteroides. Através do mapa de contorno de HSQC editado, verificou-se a correlação do hidrogênio em  $\delta$  3,66 com o carbono carbinólico (C-3), e como o espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  também forneceu um sinal em  $\delta$  179,3 que indica um deslocamento característico de carbonila de éster, foi sugerido a possibilidade de uma cadeia lateral presente na estrutura.

Com o experimento de HMBC, foi possível verificar correlações importantes para a confirmação da cadeia lateral. O sinal em  $\delta$  2,35 (H-2') apresenta correlação com o sinal em  $\delta$  179,3 (C-1'), 29,7 (C-n') e 24,7 (C8') (Figura 28).

No experimento DEPT não foi possível quantificar o número de metilenos, devido a sobreposição de sinais, assim para determinação do tamanho da cadeia lateral foi necessário a análise por espectrometria de massas. A substância **3** (PRM-16) quando analisada por espectrometria de massas no modo positivo utilizando fonte de ionização eletrospray (ESI), produziu o íon molecular em  $m/z$  553 ( $[\text{M}+1]^+$ ) e os fragmentos em  $m/z$  413 ( $[\text{M}+\text{X}]^+$ ), correspondente a massa molecular do esteroide protonado, 395 ( $[\text{M}-\text{X}-\text{H}_2\text{O}]^+$ ) e 327 ( $[\text{M}-\text{X}-\text{C}_6\text{H}_{13}]^+$ ),

conforme no esquema 8. Com base nos dados da espectrometria de massas, é possível propor a fórmula molecular da substância 3 em  $C_{38}H_{64}O_2$ . O pico do íon molecular em  $m/z$  553 ( $[M+1]^+$ ) e o fragmento em  $m/z$  413 ( $[M+2]^+$ ), indica a perda de  $C_9H_{17}O$  referente a cadeia lateral do derivado de espinaesterol (Esquema 8, p. 81).

A partir dos dados espectrométricos e espectroscópicos obtidos com posterior comparação com dados de Ragasa e Lima (2005) (Tabela 18, p. 74), foi possível identificar o  $3\beta$ -nonanoato de espinaesterol (Figura 22).



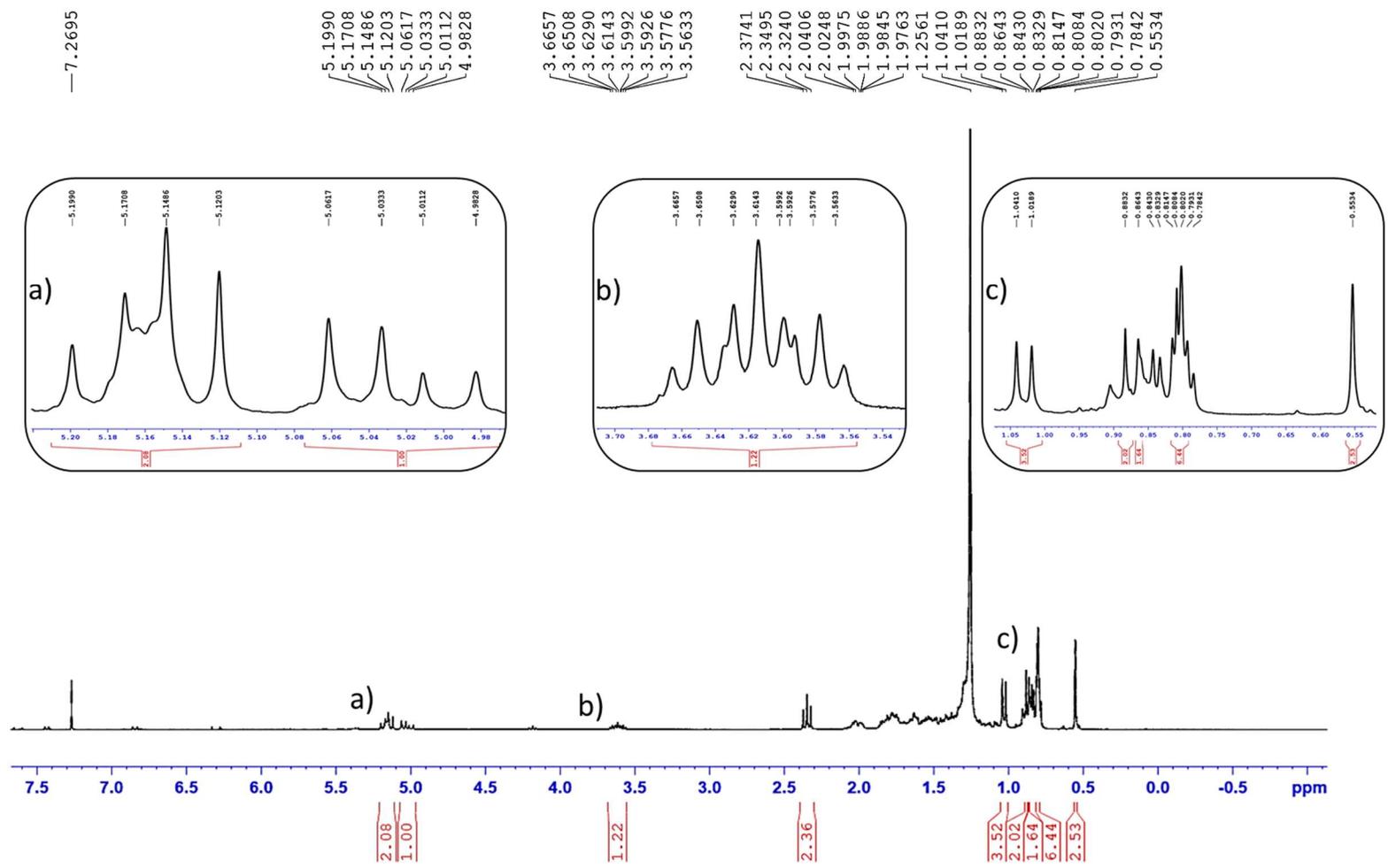
**Figura 22.** Estrutura do  $3\beta$ -nonanoato de espinaesterol.

**Tabela 18.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  do  $3\beta$ -nonanoato de espinasterol.

Nº	$^{13}\text{C}$ $\delta$ (ppm) <sup>1*</sup>	$^1\text{H}$ $\delta$ (ppm); mult. J (Hz) <sup>2*</sup>	HMBC <sup>3*</sup>	$^{13}\text{C}$ $\delta$ (ppm) <sup>4*</sup>
	Substância 4			Ragasa e Lima (2005)
1	37,10	1,85-1,81 ( <i>m</i> )		37,2
2	31,94	1,25; 1,54 ( <i>m</i> )		31,5
3	71,12	3,66 ( <i>m</i> )		71,1
4	37,89	1,25; 1,75 ( <i>m</i> )		38,0
5	40,22	1,38 ( <i>m</i> )		40,3
6	29,71	1,27; 1,77		29,7
7	117,48	5,17 ( <i>m</i> )		117,5
8	139,56	----		139,6
9	49,40	1,63 ( <i>m</i> )		49,5
10	34,19	----		34,2
11	21,53	1,55 ( <i>m</i> )		21,6
12	39,43	2,02-1,98 ( <i>m</i> )		39,6
13	43,27	----		43,3
14	55,11	1,79 ( <i>m</i> )		55,1
15	23,01	1,49; 1,43 ( <i>m</i> )		23,0
16	28,54	1,25 ( <i>s</i> )		28,5
17	55,84	1,25 ( <i>s</i> )		55,9
18	12,28	0,55 ( <i>s</i> )	C-20, C-13; C-14	12,0
19	13,07	0,80 ( <i>m</i> )	C-1, C-5, C-6, C-9, C-10, C-11	13,0
20	40,88	2,04 ( <i>m</i> )		40,8
21	21,38	1,04 ( <i>d</i> ; 6,68)	C-22, C-17, C-20	21,4
22	138,20	5,16 ( <i>dd</i> ; 15,11; 8,46)		138,1
23	129,42	5,02 ( <i>dd</i> ; 15,19; 8,54)		129,5
24	51,24	1,53 ( <i>m</i> )		51,2
25	31,88	1,53 ( <i>m</i> )	C-24	31,9
26	18,99	0,81 ( <i>d</i> ; 6,4)		21,1
27	18,99	0,81 ( <i>d</i> ; 6,4)		19,00
28	25,42	1,41; 1,16 ( <i>m</i> )		25,4
29	14,16	0,88 ( <i>t</i> ; 6,5)	C-24, C-25, C-26	12,2
1'	179,25	----		----
2'	33,96	2,35 ( <i>t</i> ; 7,37)	C-1', C-2', C-4'	----
3'	24,70	1,65-1,60 ( <i>m</i> )		----
4' - 6'	29,71	1,25 ( <i>s</i> )		----
7'	21,13	0,86 ( <i>m</i> )		----

1\* 75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ; 2\* 300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ; 3\* 100 MHz,  $\text{CDCl}_3$  4\* 400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ .

PRM-16 (1H; CDCl<sub>3</sub>; 13,7 mg)  
 19/10/2018  
 Op. Sabrina



Current Data Parameters  
 NAME PRM-16  
 EXPNO 1  
 PROCNO 1

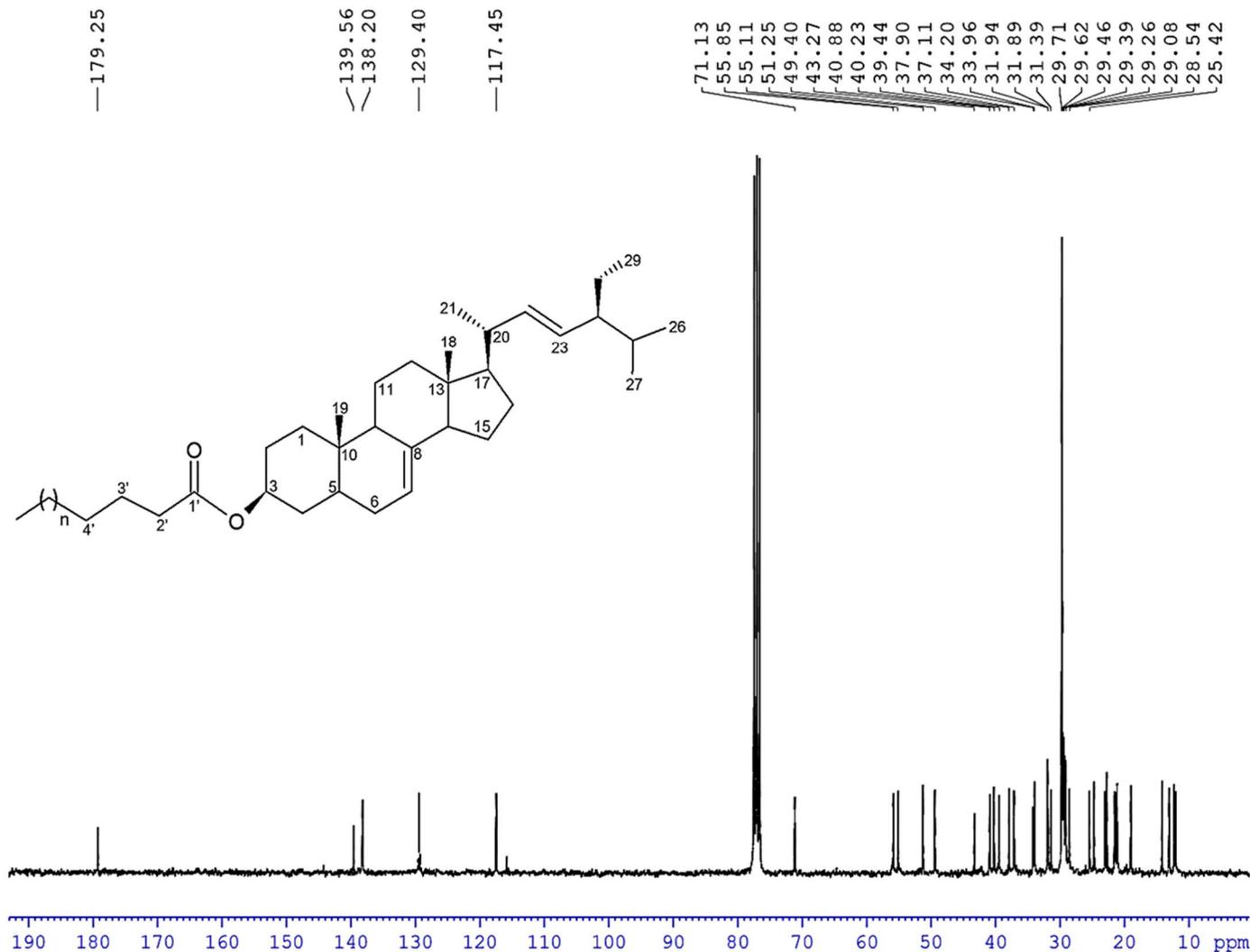
F2 - Acquisition Parameters  
 Date\_ 20181019  
 Time\_ 11.05  
 INSTRUM FOURIER300  
 PROBHD 5 mm DUL 13C-1  
 PULPROG zg  
 TD 65536  
 SOLVENT CDCl<sub>3</sub>  
 NS 32  
 DS 0  
 SWH 6103.516 Hz  
 FIDRES 0.093132 Hz  
 AQ 5.3687091 sec  
 RG 5.46376  
 DW 81.920 usec  
 DE 10.00 usec  
 TE 291.6 K  
 D1 1.00000000 sec  
 TD0 1

==== CHANNEL f1 =====  
 SF01 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 23. Espectro de RMN <sup>1</sup>H de PRM-16 (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

PRM-16 (13C; CDCl3; 13,7 mg)  
23/10/2018  
Op. Sabrina



Current Data Parameters  
NAME PRM-16  
EXPNO 2  
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters  
Date 20181023  
Time 11.07  
INSTRUM FOURIER300  
PROBHD 5 mm DUL 13C-1  
PULPROG zgpg30  
TD 32768  
SOLVENT CDCl3  
NS 18688  
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 290.9 K  
D1 0.10000000 sec  
D11 0.03000000 sec  
D31 0.00000875 sec  
D40 0.03084430 sec  
L4 20  
L5 2  
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  
CPDPRG[2] waltz16  
PCPD2 90.00 usec  
PLW2 20.00000000 W  
PLW12 0.16806000 W  
PLW13 0.13613001 W

F2 - Processing parameters  
SI 32768  
SF 75.4853500 MHz  
WDW EM  
SSB 0  
LB 3.00 Hz  
GB 0  
PC 1.40

Figura 24. Espectro de RMN <sup>13</sup>C de PRM-16 (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

PRM-16 (DEPT135; CDCl<sub>3</sub>; 13,7 mg)  
 29/10/2018  
 Op. Sabrina



Current Data Parameters  
 NAME PRM-16  
 EXPNO 4  
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters  
 Date\_ 20181029  
 Time 9.38  
 INSTRUM FOURIER300  
 PROBHD 5 mm DUL 13C-1  
 PULPROG dept135  
 TD 65536  
 SOLVENT CDCl<sub>3</sub>  
 NS 6144  
 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 294.0 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  
 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

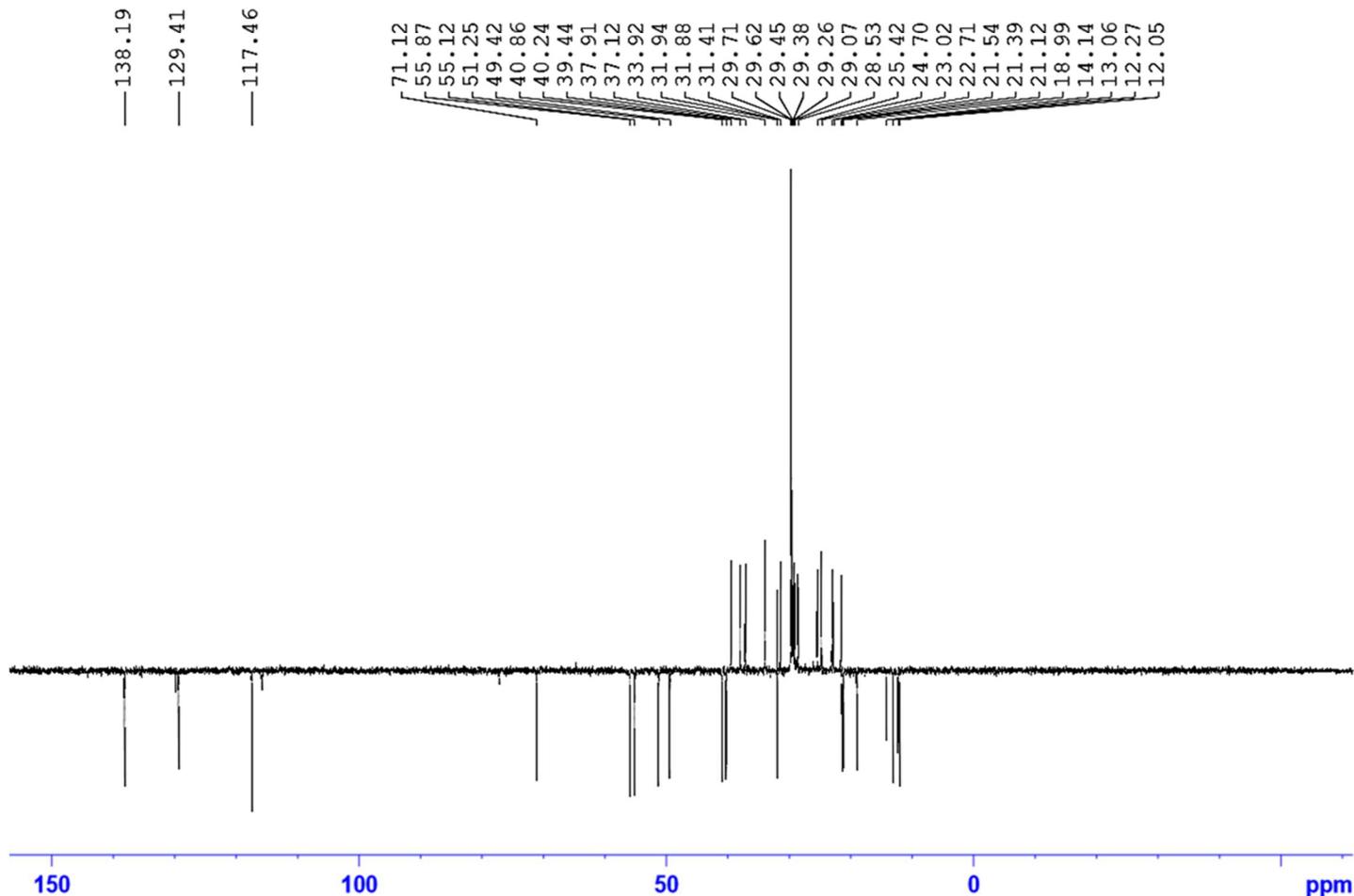
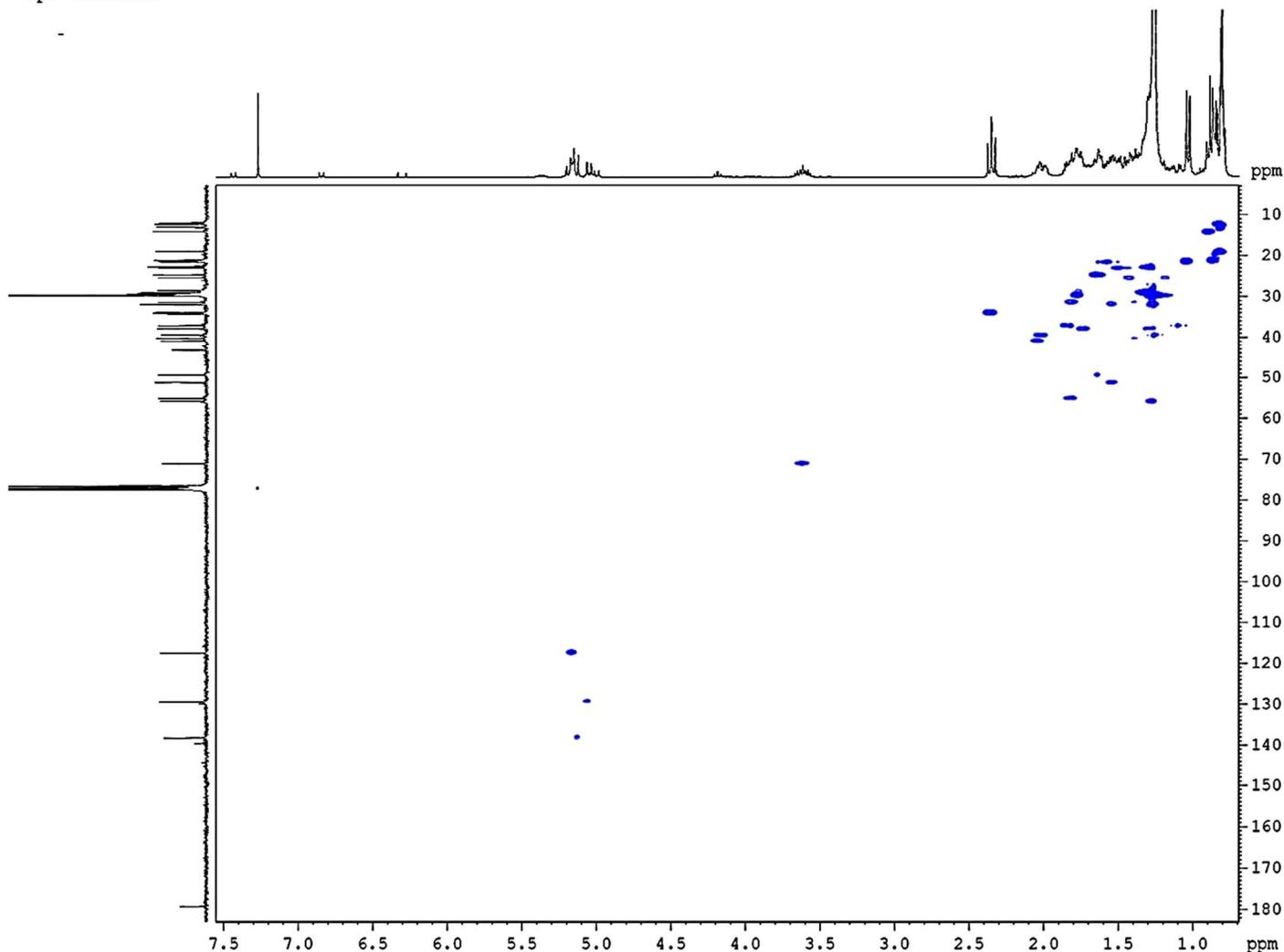


Figura 25. Espectro de DEPT-135° de PRM-16 (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

PRM-16 (HSQC; CDCl<sub>3</sub>; 13,7 mg)  
 06/02/2019  
 Op. Sabrina



```

Current Data Parameters
NAME      PRM-16
EXPNO    200
PROCNO   1

F2 - Acquisition Parameters
Date_    20190206
Time     8.44
INSTRUM  FOURIER300
PROBHD   5 mm DUL 13C-1
PULPROG  hsqcgpph
TD       2048
SOLVENT  CDCl3
NS       92
DS       16
SWH      6103.516 Hz
FIDRES   2.980232 Hz
AQ       0.167722 sec
RG       501.187
DW       81.920 usec
DE       10.00 usec
TE       296.1 K
CNST2    145.000000
DO       0.000000 sec
D1       1.0000000 sec
D4       0.00172414 sec
D11      0.03000000 sec
D13      0.0000400 sec
D16      0.00020000 sec
D31      0.00000764 sec
D32      0.00001528 sec
D33      0.00000930 sec
D34      0.00001860 sec
D36      0.00100000 sec
D37      0.00000083 sec
D38      0.00001745 sec
D42      0.00000166 sec
D43      0.00002128 sec
D44      0.00120000 sec
D45      0.00051614 sec
IN0      0.0003490 sec
L4       19
P35      75.00 usec

----- CHANNEL f1 -----
SFO1     300.2019513 MHz
NUC1     1H
P1       7.64 usec
P2       15.28 usec
PLW1     20.00000000 W

----- CHANNEL f2 -----
SFO2     75.4921437 MHz
NUC2     13C
CPDPRG2  garp
P3       9.30 usec
P4       18.60 usec
PCPD2    75.00 usec
PLW2     50.00000000 W
PLW12    0.80352998 W

----- GRADIENT CHANNEL -----
GPNAM[1] SINE.100
GPNAM[2] SINE.100
GPNAM[3] SINE.100
GPZ1     80.00 %
GPZ2     30.00 %
GPZ3     20.10 %
P16      1000.00 usec

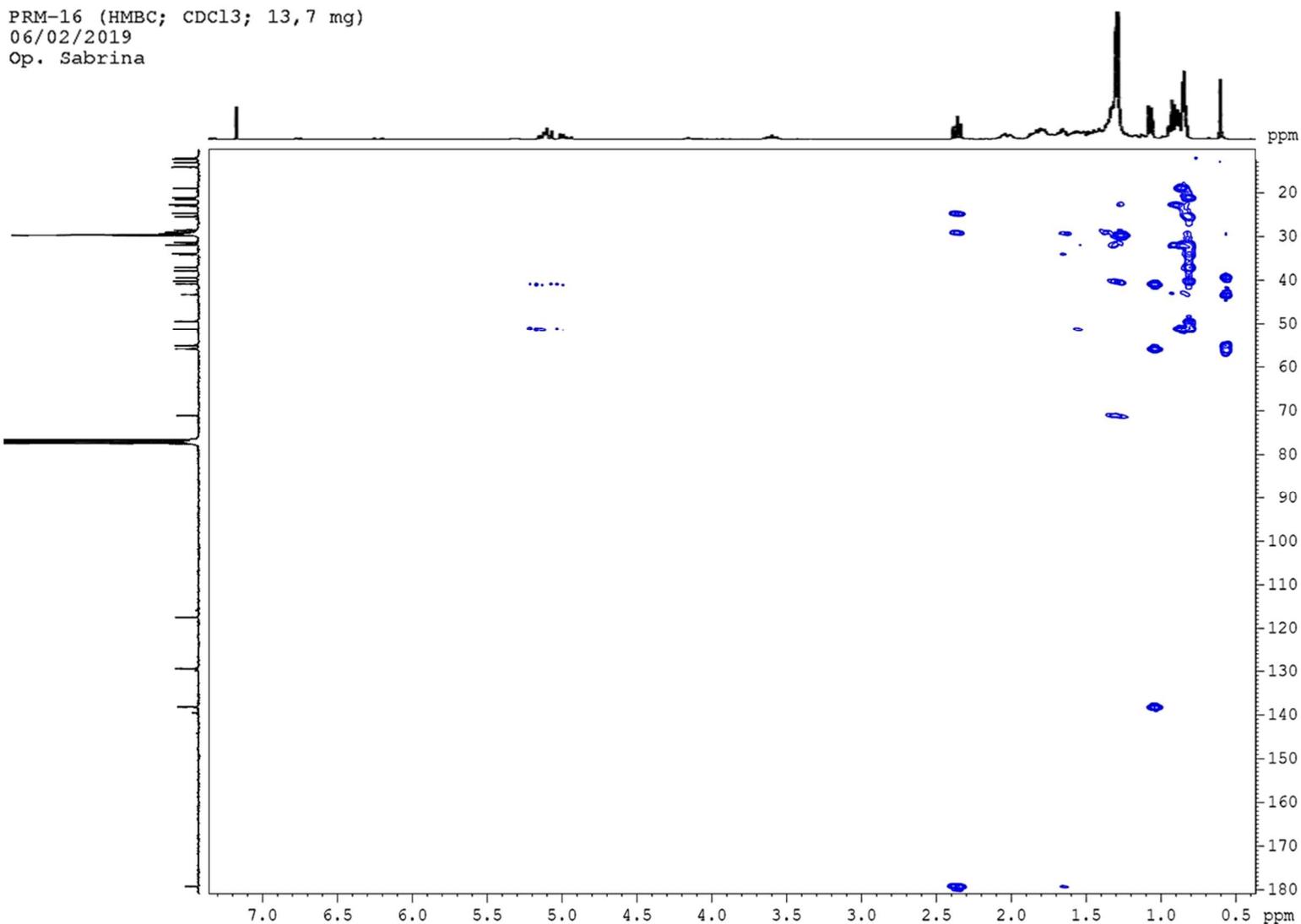
F1 - Acquisition parameters
TD       256
SFO1     75.49214 MHz
FIDRES   111.926533 Hz
SW       189.777 ppm
FnMODE   TPPI

F2 - Processing parameters
SI       1024
SF       300.2000000 MHz
WDW      QSINE
SSB      2
LB       0 Hz
GB       0
PC       1.40

F1 - Processing parameters
SI       1024
MC2      TPPI
SF       75.4853500 MHz
WDW      QSINE
SSB      2
LB       0 Hz
GB       0
  
```

Figura 26. Mapa de correlações de HSQC de PRM-16 (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

PRM-16 (HMBC; CDCl<sub>3</sub>; 13,7 mg)  
 06/02/2019  
 Op. Sabrina



```

Current Data Parameters
NAME      PRM-16      300
EXPNO     1
PROCNO    1

F2 - Acquisition Parameters
Date_     20190206
Time     16:34
INSTRUM   FOURIER300
PROBHD    5 mm DUL 13C-1
PULPROG   hmbcgp1pndqf
TD        2048
SOLVENT   CDCl3
NS        188
DS        16
SWH       6103.516 Hz
FIDRES    2.980232 Hz
AQ        0.167722 sec
RG        501.187
DW        81.920 usec
DE        10.00 usec
TE        296.2 K
CNST2    145.000000
CNST13   7.000000
DO        0.00000300 sec
D1        1.00000000 sec
D2        0.00344828 sec
D6        0.07142957 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
INO       0.00003010 sec

===== CHANNEL f1 =====
SFO1     300.2019513 MHz
NUC1      1H
P1        7.64 usec
P2       15.28 usec
PLW1     20.00000000 W

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

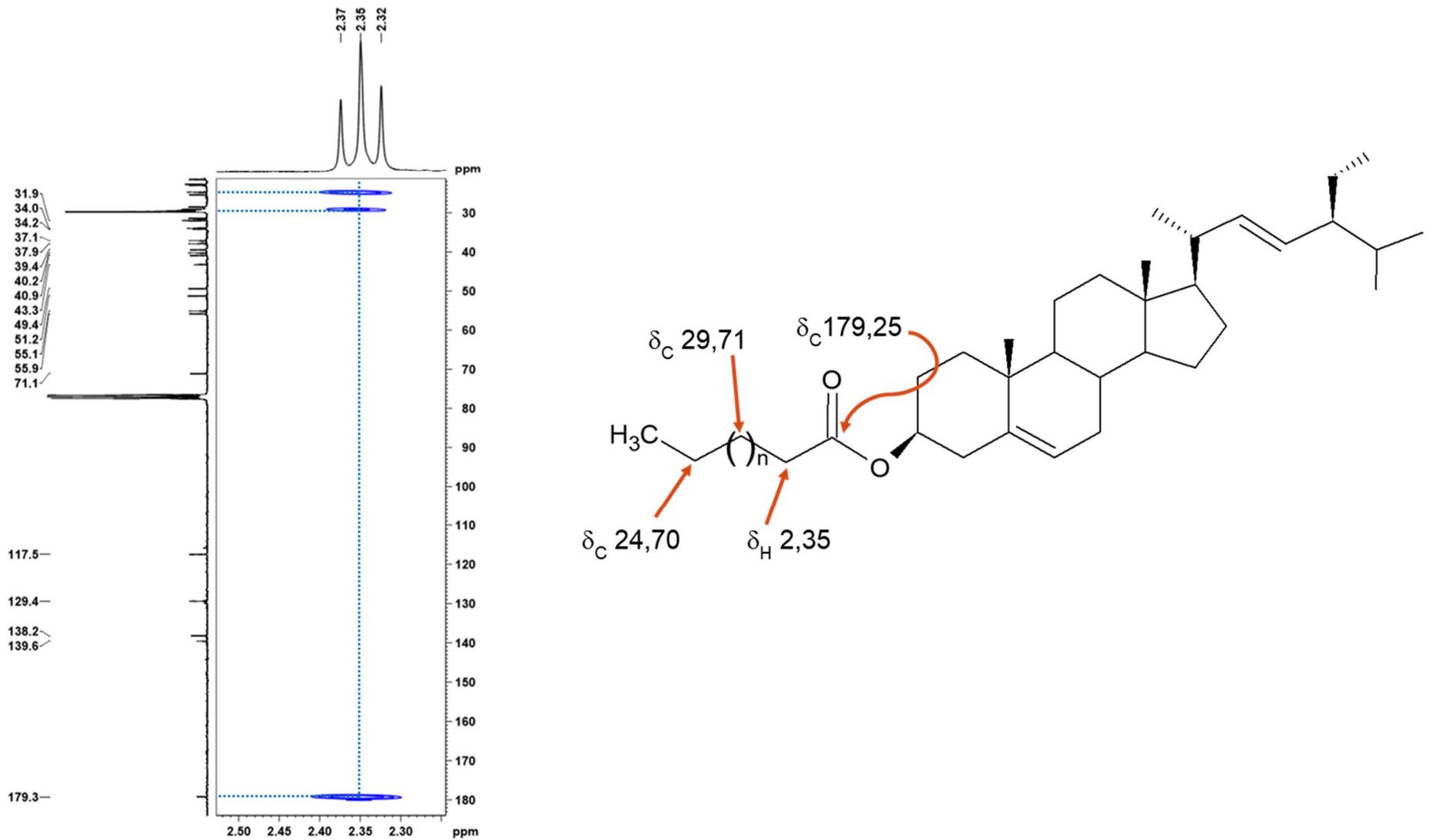
===== GRADIENT CHANNEL =====
GPNAM[1]  SINE.100
GPNAM[2]  SINE.100
GPNAM[3]  SINE.100
GPZ1      50.00 %
GPZ2      30.00 %
GPZ3      40.10 %
P16      1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters
TD        255
SFO1     75.49328 MHz
FIDRES    130.284668 Hz
SW        220.037 ppm
FnMODE    QF

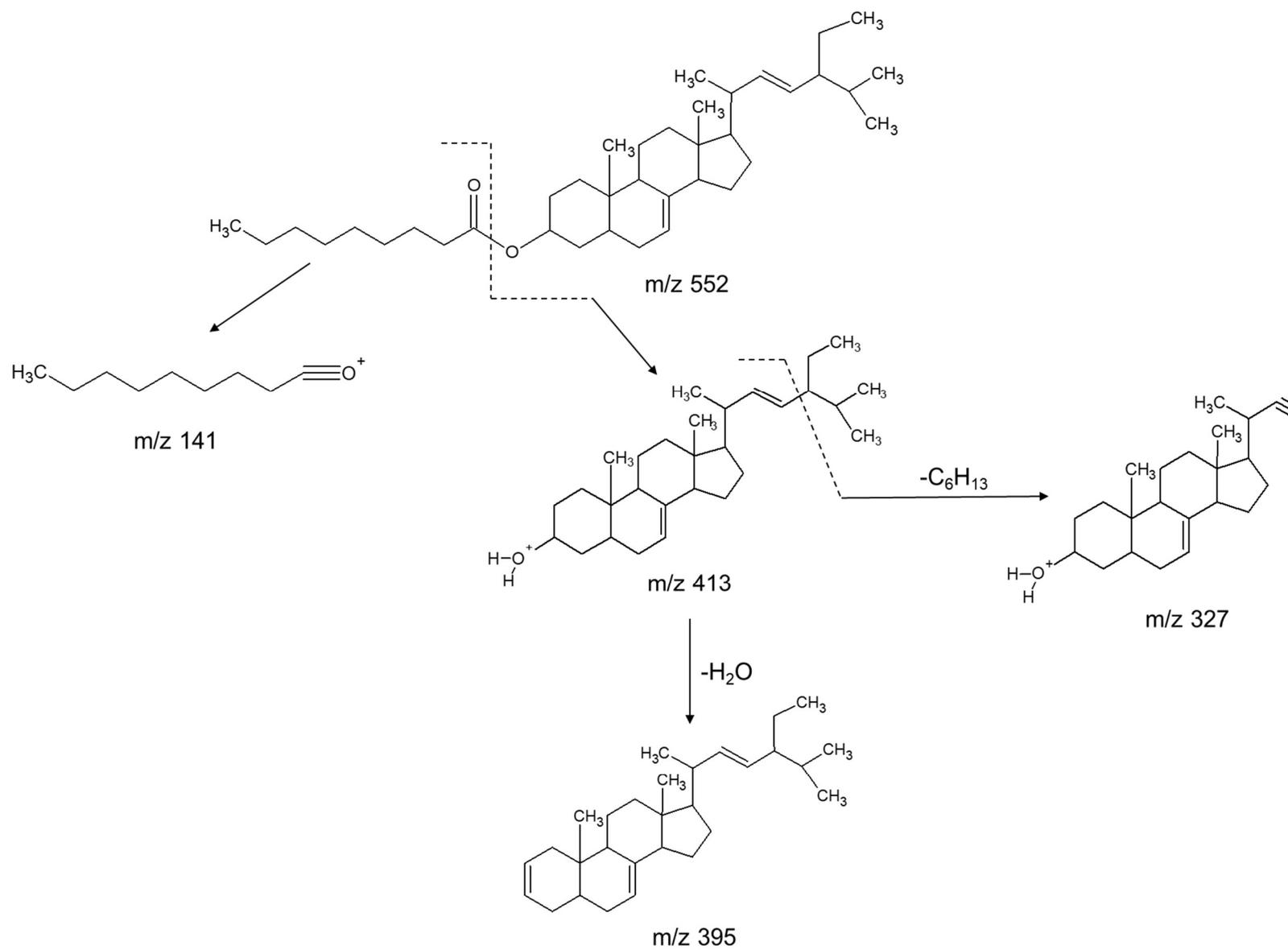
F2 - Processing parameters
SI        1024
SF        300.2000000 MHz
WDB       SINE
SSB       0
LB        0 Hz
GB        0
PC        1.40

F1 - Processing parameters
SI        1024
MC2       QF
SF        75.4853500 MHz
WDB       SINE
SSB       0
LB        0 Hz
GB        0
  
```

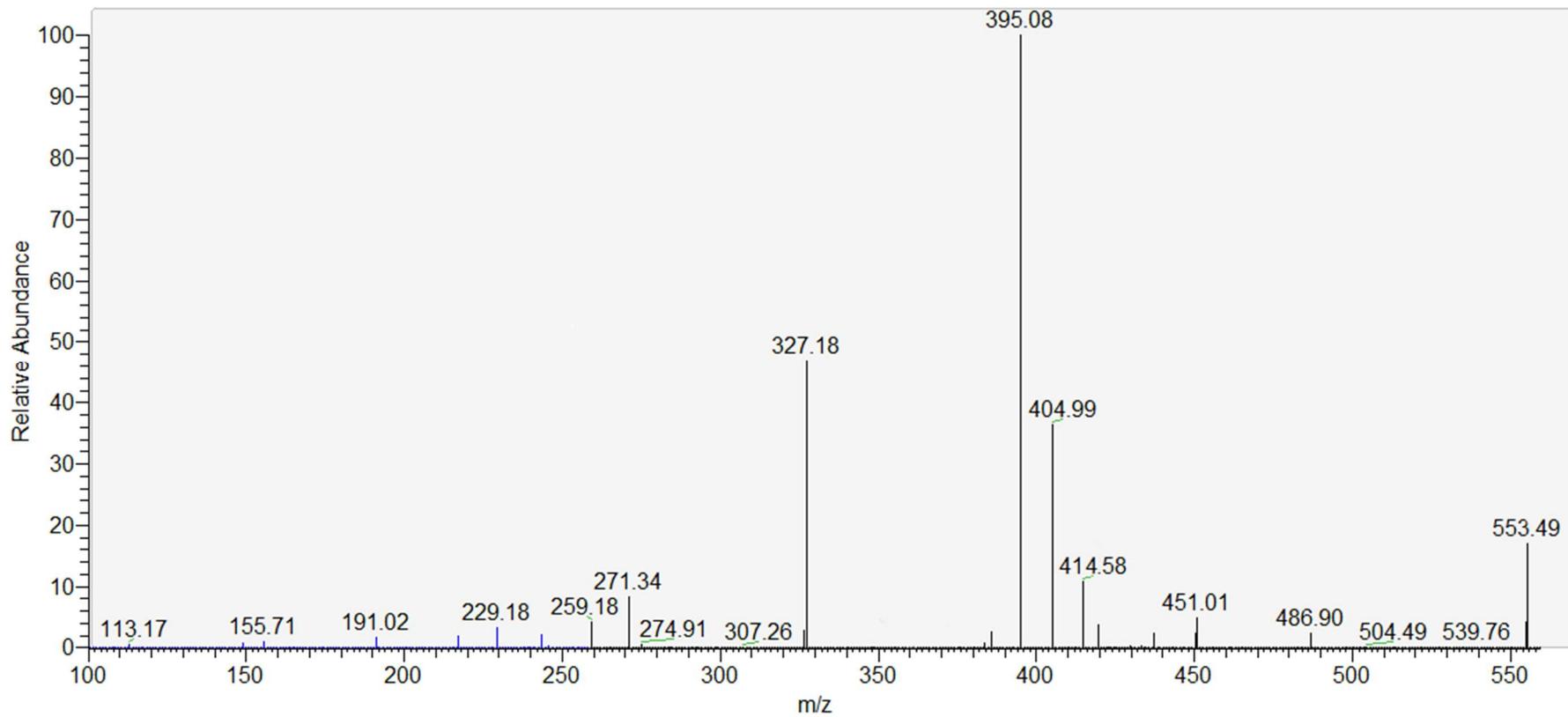
Figura 27. Mapa de correlações de HMBC de PRM-16 (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



**Figura 28.** Ampliação do mapa de contornos de HMBC de PRM-16.



**Esquema 8.** Proposta de fragmentação do 3β-nonanoato de spinasterol.



**Figura 29.** Espectro de Massas da substância 3 (ESI, modo positivo).

## 5.8 Identificação da substância 4 (PRM-40)

A substância 4 (Figura 30) foi obtida conforme o fracionamento cromatográfico do extrato metanólico e hidroalcoólico descrito pelos [Esquemas 3 (p. 43), 5 (p. 47) e 6 (p. 48)] e apresentou-se como um sólido branco e com solubilidade em piridina. Quando analisada em CCD detectou-se apenas uma absorção no UV 254 nm, e após revelação em vanilina sulfúrica uma mancha de cor roxa e com  $R_f = 0,55$  quando eluída em DCM:AcOEt (8:2).

A identificação da substância foi realizada com base na análise dos dados de RMN 1D [ $^1\text{H}$  (Figura 31) e  $^{13}\text{C}$  (figura 34)], 2D [HSQC (Figura 35), HMBC (Figura 36)], espectrometria de massas (Figura 37) e comparação com os dados relatados na literatura (Tabela 19, p. 85).

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  apresentou um tripleto em  $\delta$  5,48 ( $t$ ,  $J = 3,2$ ) referente ao H-12, que é um sinal característico de triterpeno com esqueleto olean-12-eno. Além do sinal em  $\delta$  3,31 ( $dd$ ;  $J = 13,7$  e  $3,9$  Hz) referente à H-18, que é vizinho a dois hidrogênios diastereotópicos (H-19a e H-19b), desse modo o H-18 acopla com os dois hidrogênios diastereotópicos resultando em um duplo dubleto. Esta substância apresentou também um multipletto em  $\delta$  3,45 que é característico de posição  $\beta$  para hidrogênio oximetínico da posição-3 e  $\alpha$  para a hidroxila ligada em C-3, pois quando o hidrogênio 3 está na posição  $\alpha$  seu deslocamento químico ocorre em  $\delta$  3,10 - 3,20 ppm (MAHATO e KUNDU, 1994). O espectro apresentou sinais entre  $\delta$  0,86 – 1,21 ppm referentes aos hidrogênios metílicos totalizando assim 7 metilas.

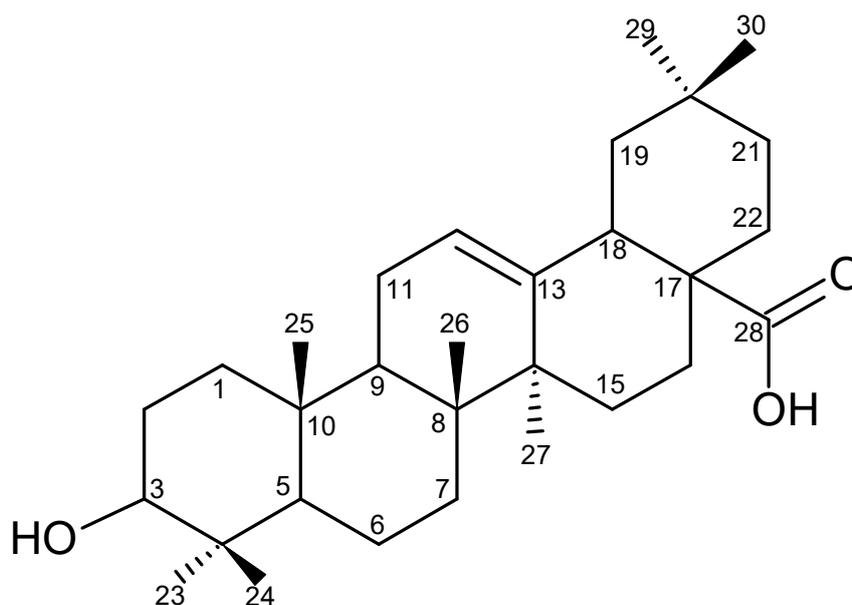
O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  apresentou um sinal referente ao carbono oxigenado em  $\delta$  77,82 (C-3), sete sinais de carbonos não hidrogenados, sete carbonos metílicos, cinco carbonos metínicos e dez carbonos metilênicos. Os sinais em  $\delta$  122,3 e 144,6 sugere a presença de uma dupla ligação entre os carbonos C-12 e C-13, que indica ser um triterpeno pentacíclico, pois a maioria dos triterpenos do tipo oleanano são mono-olefínicos por possuir a presença de dupla ligação nesta posição.

As atribuições dos deslocamentos químicos dos hidrogênios e carbonos foram confirmadas e realizadas mediante as análises das correlações observados no espectro HSQC. Com os dados das correlações do HMBC, foi possível verificar correlações importantes como o sinal em  $\delta$  3,29 (H-18) apresenta correlação com os

carbonos em  $\delta$  144,6 (C-13) e 46,4 (C-17), com os carbonos em  $\delta$  122,3 (C-12), 41,9 (C-14) e 180,0 (C-28) e com o carbono em  $\delta$  23,4 (C-11).

A análise do espectro de massas de alta resolução (modo positivo de ionização) indicou pico do íon molecular em  $m/z$  457, e as fragmentações em  $m/z$  439, 411 e 393 que correspondem respectivamente, à perda de uma molécula de água ( $m/z$  439:  $[(M+H)-H_2O]^+$ ), à perda de HCOOH ( $m/z$  411:  $[(M+H)-HCOOH]^+$ ) e a perda de uma molécula de H<sub>2</sub>O e HCOOH ( $m/z$  393:  $[(M+H)-H_2O-HCOOH]^+$ ), sugerindo a fórmula molecular C<sub>30</sub>H<sub>49</sub>O<sub>3</sub> (Figura 37).

A partir das análises dos dados espectrais e espectrométricos em comparação com os descritos na literatura (SEEBACHER *et al.*, 2003), identificou-se PRM-40 como ácido oleanólico (ácido 3 $\beta$ -hidróxi-ole-12-em-28-óico), sendo este o primeiro relato desse triterpeno no gênero *Pithecellobium*.



**Figura 30.** Estrutura do ácido oleanólico.

**Tabela 19.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e HMBC do ácido oleanólico.

N <sup>o</sup>	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	HMBC <sup>3*</sup>	$^{13}\text{C}$
	$\delta$ (ppm) <sup>1*</sup>	$\delta$ (ppm); mult. J (Hz) <sup>2*</sup>		$\delta$ (ppm) <sup>4*</sup>
	Substância 4			Seebacher <i>et al</i> (2003)
1	38,7	1,57 (m)		39,0
2	27,9	1,81 (m)		28,1
3	77,8	3,43 (m)	C-24, C-23	78,2
4	39,1	----		39,4
5	55,6	0,82 (s)		55,9
6	18,5	1,31		18,8
7	33,9	1,43	C-15	33,4
8	39,5	----		39,8
9	47,9	1,66 (t; 9,12)	C-8, C-10, C-11, C-25, C-26	48,2
10	37,1	----		37,4
11	23,4	1,98		23,8
12	122,3	5,48 (t; 3,12)	C-9, C-14	122,6
13	144,6	----		144,8
14	41,9	----		42,2
15	28,1	1,22 (s)	C-28	28,4
16	23,4	1,93		23,8
17	46,4	----		46,7
18	41,8	3,29 (dd; 13,69; 3,97)	C-11, C-12, C-13, C-14, C-17, C-28	42,1
19	46,2	1,78	C-14, C-20, C-30	46,6
20	29,8	----		31,0
21	33,0	1,25 (s)		34,3
22	30,7	1,81		33,2
23	28,5	1,21 (s)	C-3, C-4, C-5, C-24	28,8
24	16,3	1,00 (s)	C-3, C-4, C-5, C-9, C-23	16,5
25	15,3	0,86 (s)	C-1, C-5, C-9, C-10	15,6
26	17,2	1,00 (s)		17,5
27	25,9	1,25 (s)	C-13, C-14, C-15	26,2
28	180,0	----		180,0
29	33,0	0,92 (s)	C-19, C-20, C-22, C-30	33,4
30	23,5	1,00 (s)		23,8

1\* 75 MHz, Piridina-d<sub>5</sub>; 2\* 300 MHz, Piridina-d<sub>5</sub>; 3\* 75 MHz, Piridina-d<sub>5</sub> 4\* 600 MHz, Piridina-d<sub>5</sub>.

PRM-40 (1H; Piridina; 10.2 mg) c/ sup. H2O  
 11/04/2019  
 Op. Zelina



```

Current Data Parameters
NAME      PRM-40
EXPNO     12
PROCNO    1

F2 - Acquisition Parameters
Date_     20190411
Time      10.19
INSTRUM   FOURIER300
PROBHD    5 mm DUL 13C-1
PULPROG   zgpgpr
TD         65536
SOLVENT   Pyridine
NS         64
DS         4
SWH        6103.516 Hz
FIDRES     0.093132 Hz
AQ         5.3687091 sec
RG         14.681
DW         81.920 usec
DE         10.00 usec
TE         292.4 K
D1         2.00000000 sec
D12        0.00002000 sec
P41        2000000.00 usec
TD0        1

===== CHANNEL f1 =====
SFO1      300.2015326 MHz
NUC1      1H
P1        7.64 usec
PLW1      20.00000000 W
PLW9      0.00004670 W

F2 - Processing parameters
SI         65536
SF         300.2000000 MHz
WDW        EM
SSB        0
LB         0.30 Hz
GB         0
PC         1.00
  
```

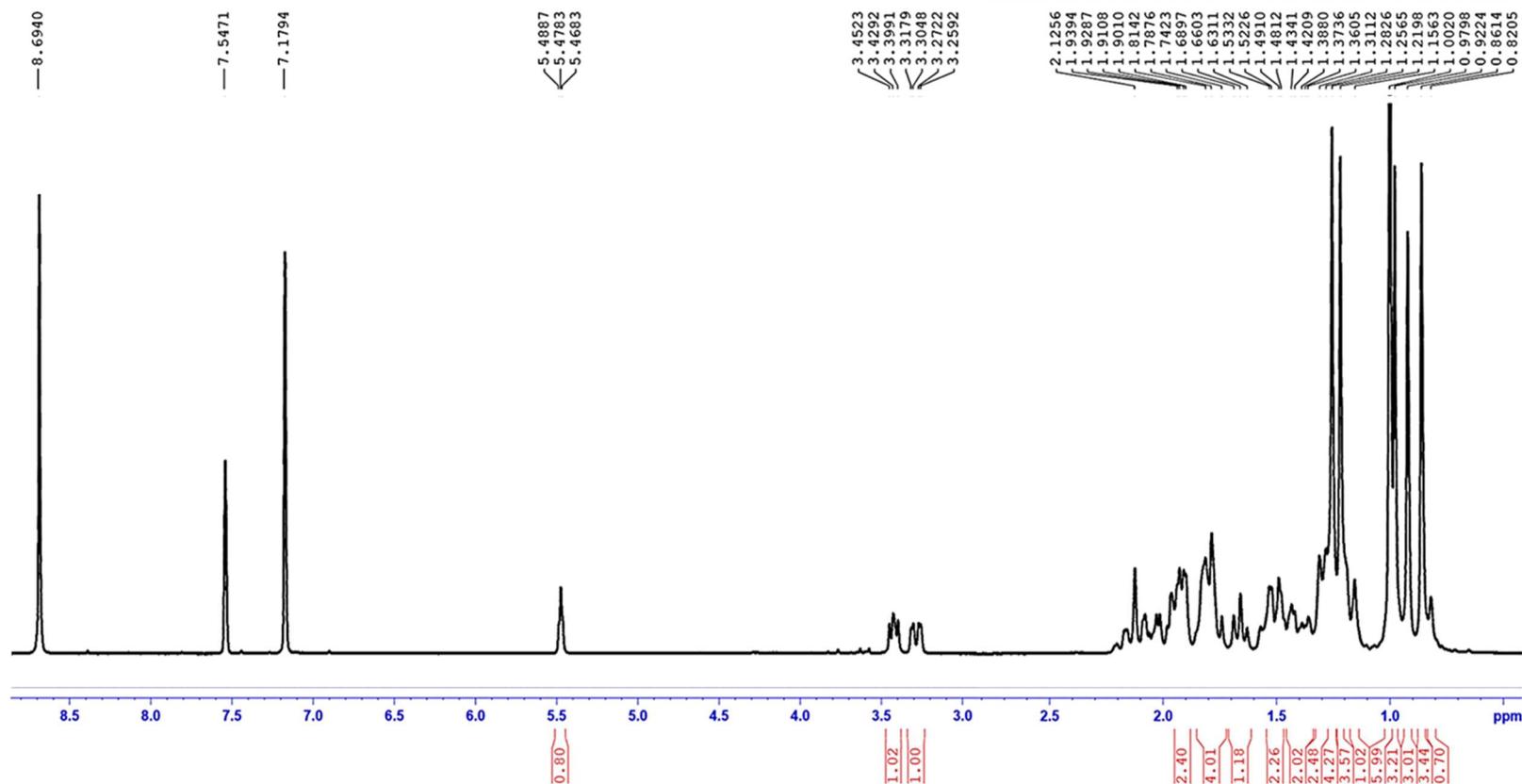
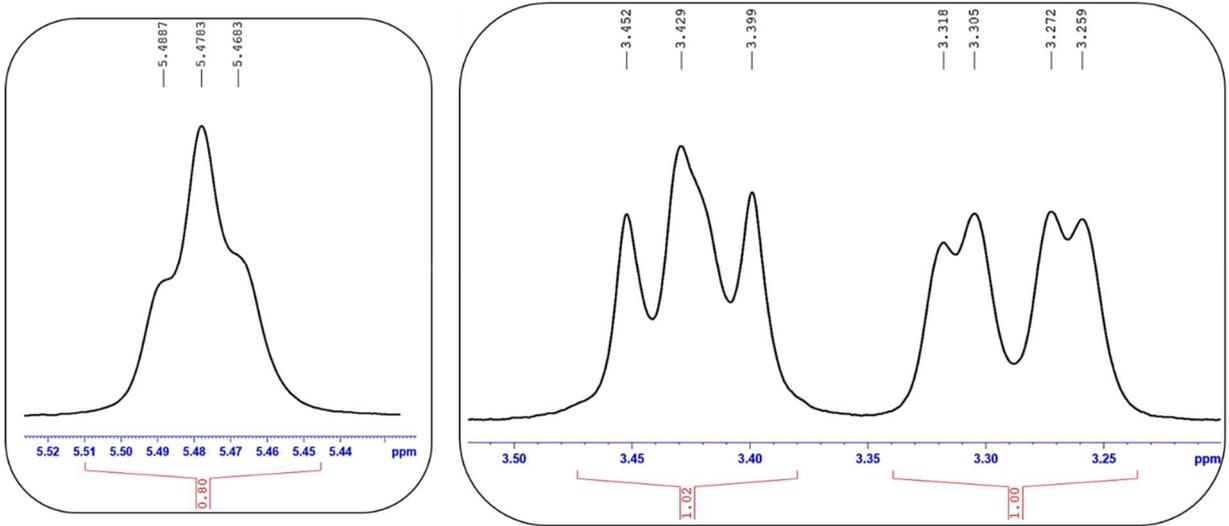
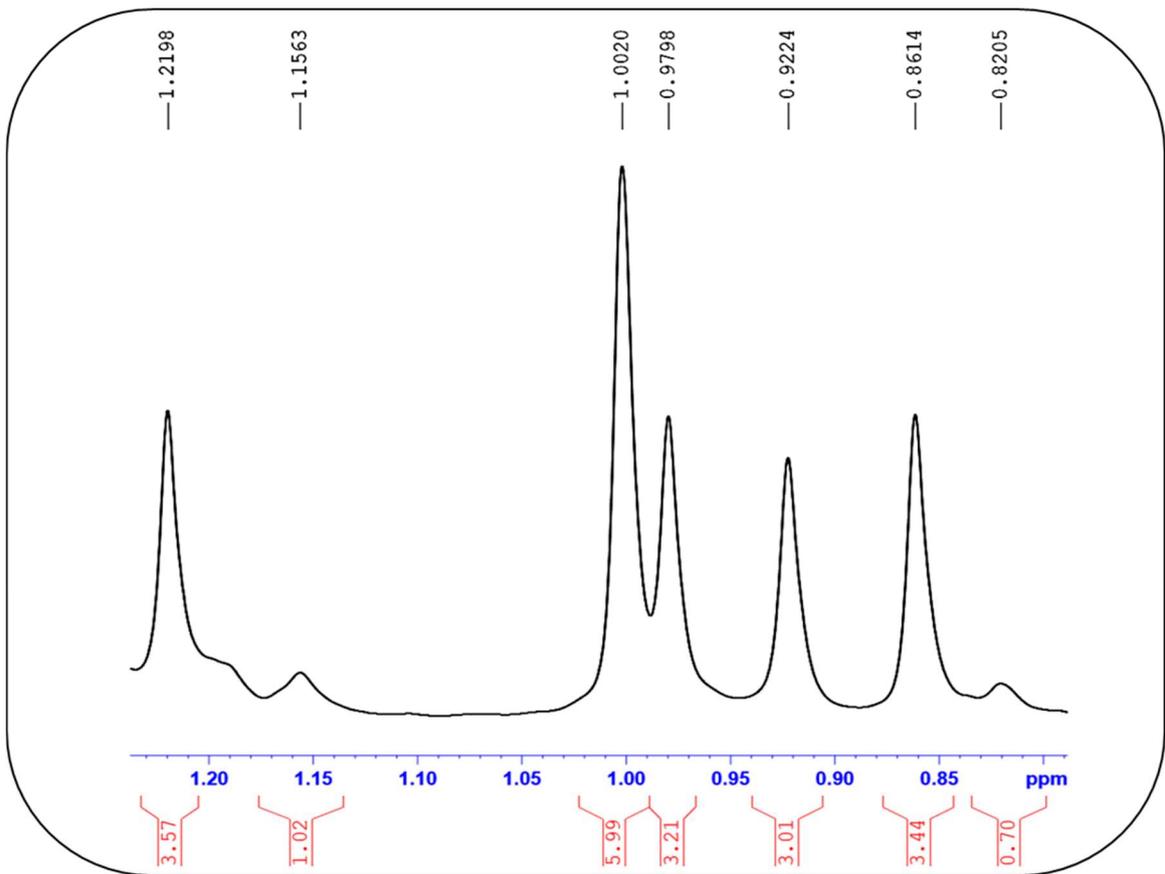


Figura 31. Espectro de RMN <sup>1</sup>H de PRM-40 (300 MHz, Piridina).

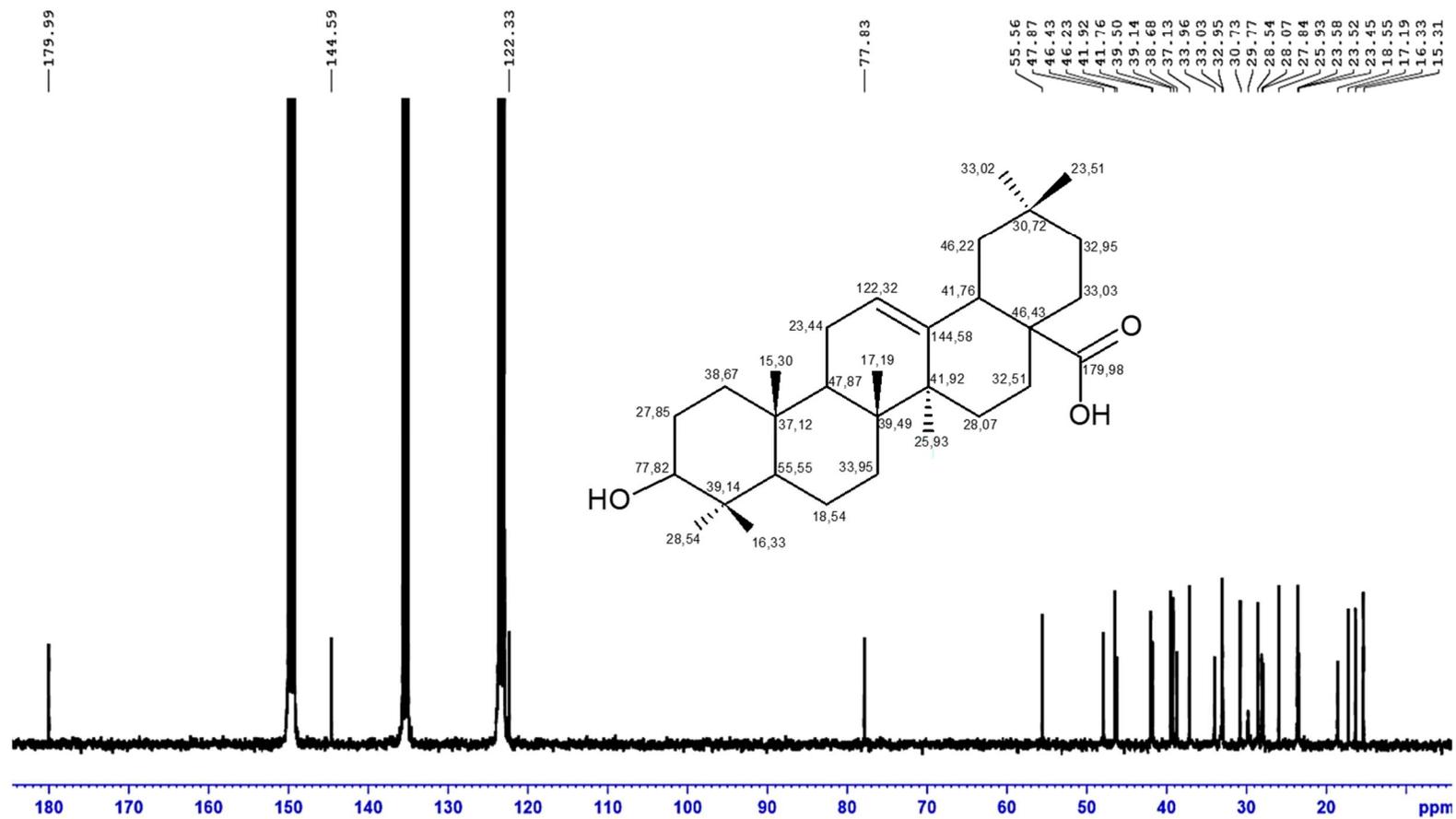


**Figura 32.** Ampliação dos sinais de RMN de  $^1\text{H}$  de PRM-40 na região do H-12, H-3 e H-18, respectivamente.



**Figura 33.** Ampliação dos sinais de RMN de  $^1\text{H}$  de PRM-40 na região dos hidrogênios metílicos.

PRM-40 (13C; Piridina; 10.2 mg)  
 10/04/2019  
 Op. Magno



```

Current Data Parameters
NAME          PRM-40
EXPNO         2
PROCNO        1

F2 - Acquisition Parameters
Date_         20190410
Time_         11.29
INSTRUM       FOURIER300
PROBHD        5 mm DUL 13C-1
PULPROG       zgpg30
TD            32768
SOLVENT       Pyridine
NS            12555
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            292.7 K
D1            0.20000000 sec
D11           0.03000000 sec
D31           0.00000875 sec
D40           0.02710625 sec
L4            20
L5            5
P32           90.00 usec
TD0           1

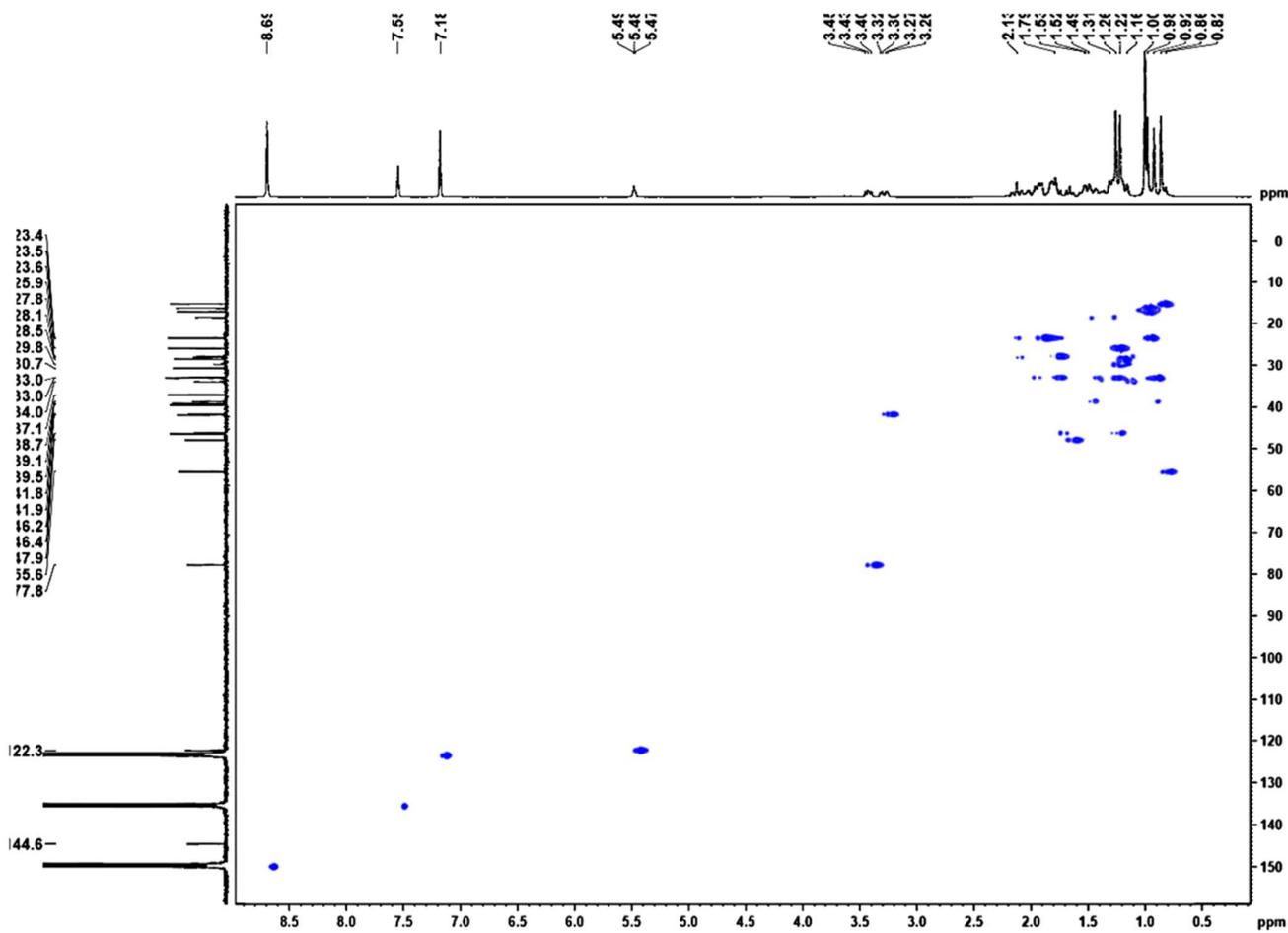
===== CHANNEL f1 =====
SFO1          75.4928982 MHz
NUC1           13C
P1             8.75 usec
PLW1           50.00299835 W

===== CHANNEL f2 =====
SFO2          300.2012008 MHz
NUC2           1H
CPDPRG[2]     waltz16
PCPD2         90.00 usec
PLW2          20.00000000 W
PLW12         0.16806000 W
PLW13         0.13613001 W

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

Figura 34. Espectro de RMN de <sup>13</sup>C (75 MHz, Piridina) da substância 4.

PRM-40 (HSQC Piridina; 10.2 mg)  
 11/04/2019  
 Op. Zelina



```

Current Data Parameters
NAME          PRM-40
EXNO          200
PROCNO        1

F2 - Acquisition Parameters
Date          20190411
Time          10.28
INSTRUM       FOURIER300
PROBHD        5 mm DUL 13C-1
PULPROG       hsqcqpqh
TD            3048
SOLVENT       Pyridine
NS            60
DS            16
SWH           6103.516 Hz
FIDRES        2.980232 Hz
AQ            0.1677722 sec
RG            501.187
DW            81.920 usec
DE            10.00 usec
TE            292.7 K
CNST2         145.0000000
D0            0.00000300 sec
D1            1.00000000 sec
D4            0.00172414 sec
D11           0.03000000 sec
D13           0.00000400 sec
D16           0.00020000 sec
D21           0.00344828 sec
D31           0.00000764 sec
D32           0.00001528 sec
D33           0.00000930 sec
D34           0.00001860 sec
D36           0.00100000 sec
D38           0.00001655 sec
D41           0.00000166 sec
D42           0.00000332 sec
D43           0.00002128 sec
D44           0.00224428 sec
D45           0.00051614 sec
IN0           0.00003310 sec
L4            19
P35           75.00 usec

***** CHANNEL f1 *****
SFO1          300.2019513 MHz
NUC1          1H
P1            7.64 usec
P2            15.28 usec
PLW1          20.00000000 W

***** CHANNEL f2 *****
SFO2          75.4921437 MHz
NUC2          13C
CFDPRG[2]    garrp
P3            9.30 usec
P4            18.60 usec
PCPD2        75.00 usec
PLW2          50.00000000 W

***** GRADIENT CHANNEL *****
GPNAM[1]     RECT.1
GPNAM[2]     RECT.1
GPNAM[3]     RECT.1
GPZ1         30.00 %
GPZ2         80.00 %
GPZ3         20.10 %
P16          1000.00 usec

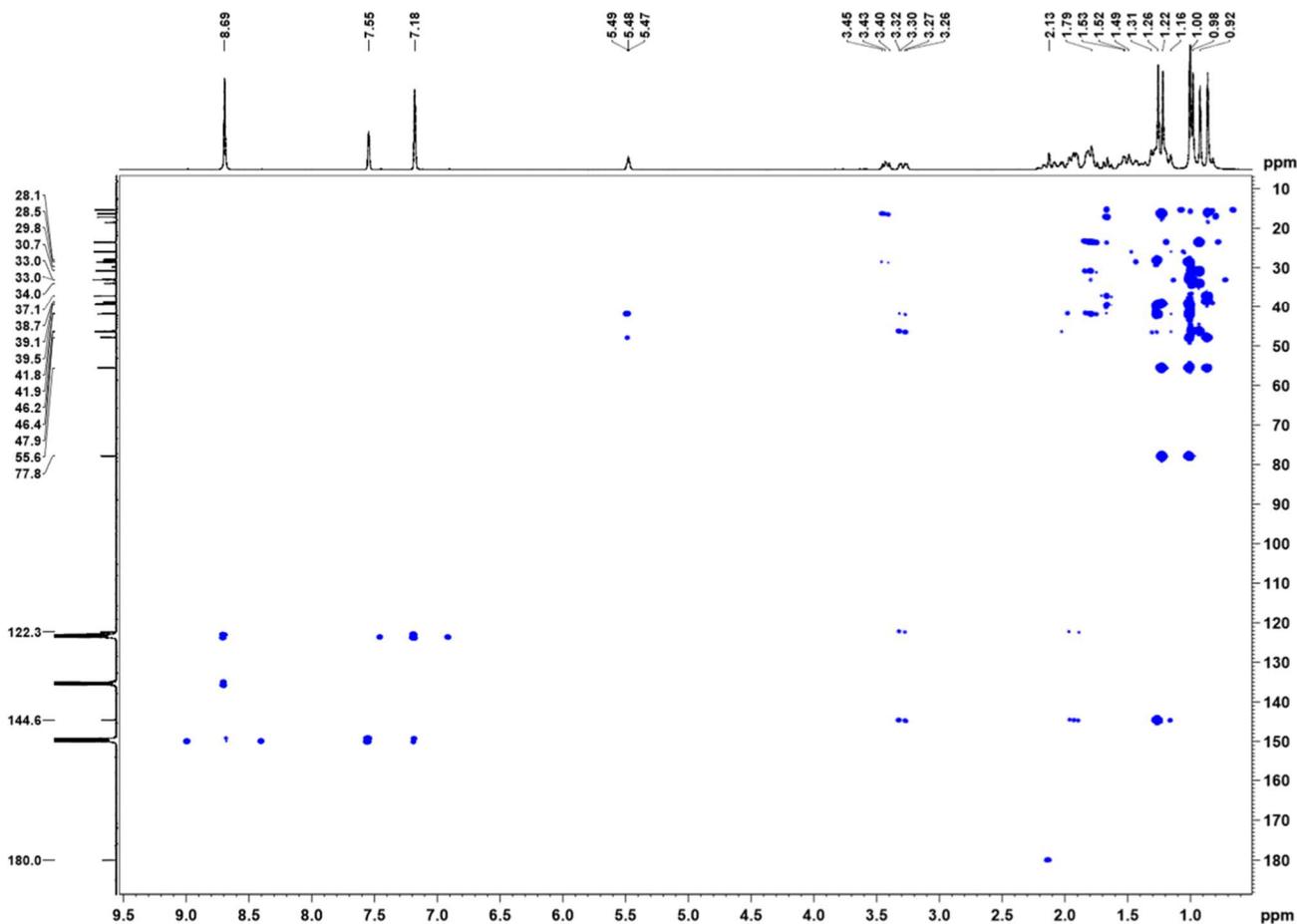
F1 - Acquisition parameters
TD            256
SFO1          75.49214 MHz
FIDRES        118.013598 Hz
SW            200.097 Ppm
FnMODE        TPPI

F2 - Processing parameters
SI            1024
SF            300.200000 MHz
WDW           QSINE
SSB           2
LB            0 Hz
GB            0
PC            1.40

F1 - Processing parameters
SI            1024
MC2           TPPI
SF            75.4853500 MHz
WDW           QSINE
SSB           2
LB            0 Hz
GB            0
  
```

Figura 35. Mapa de contornos de HSQC de PRM-40 (75 MHz, Piridina).

PRM-40 (HMBC; Piridina; 10.2 mg)  
 23/05/2019  
 Op. Zelina



```

Current Data Parameters
NAME          PRM-40
EXPNO        300
PROCNO       1

F2 - Acquisition Parameters
Date_        20190423
Time_        17.33
INSTRUM      FOURIER300
PROBHD       5 mm DUL 13C-1
PULPROG      hmbcgp1pndqf
TD           2048
SOLVENT      Pyridine
NS           158
DS           16
SWH          6103.516 Hz
FIDRES       2.980232 Hz
AQ           0.1677722 sec
RG           501.187
DW           81.920 usec
DE           10.00 usec
TE           292.8 K
CNST2       145.0000000
CNST13      7.0000000
DO           0.00000300 sec
D1           1.00000000 sec
D2           0.00344828 sec
D6           0.07142857 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
INO          0.00003010 sec

===== CHANNEL f1 =====
SFO1         300.2019513 MHz
NUC1         1H
P1           7.64 usec
P2           15.28 usec
PLW1         20.00000000 W

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

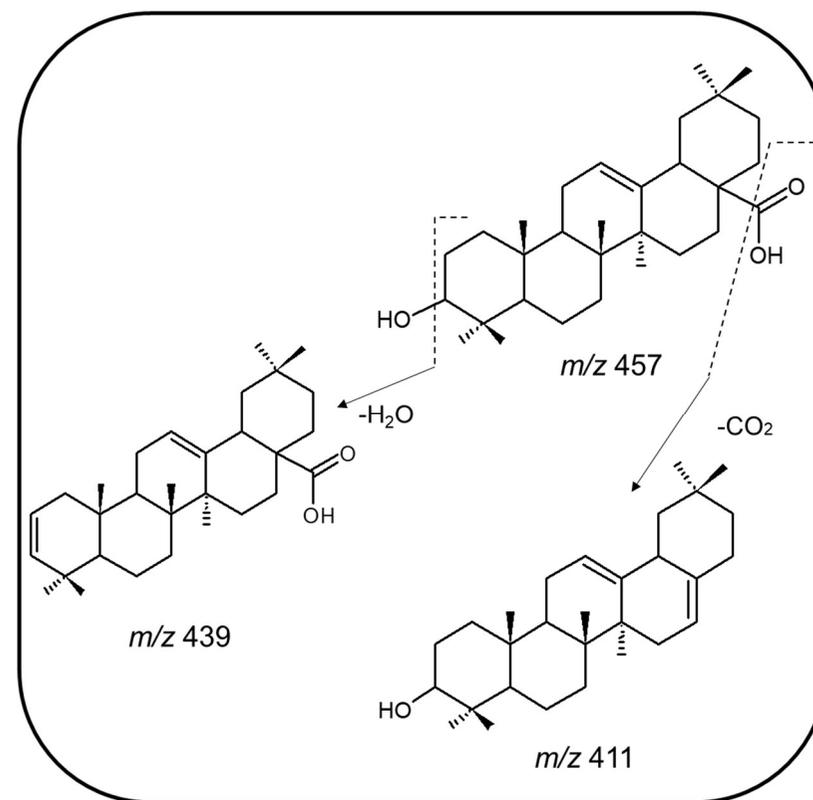
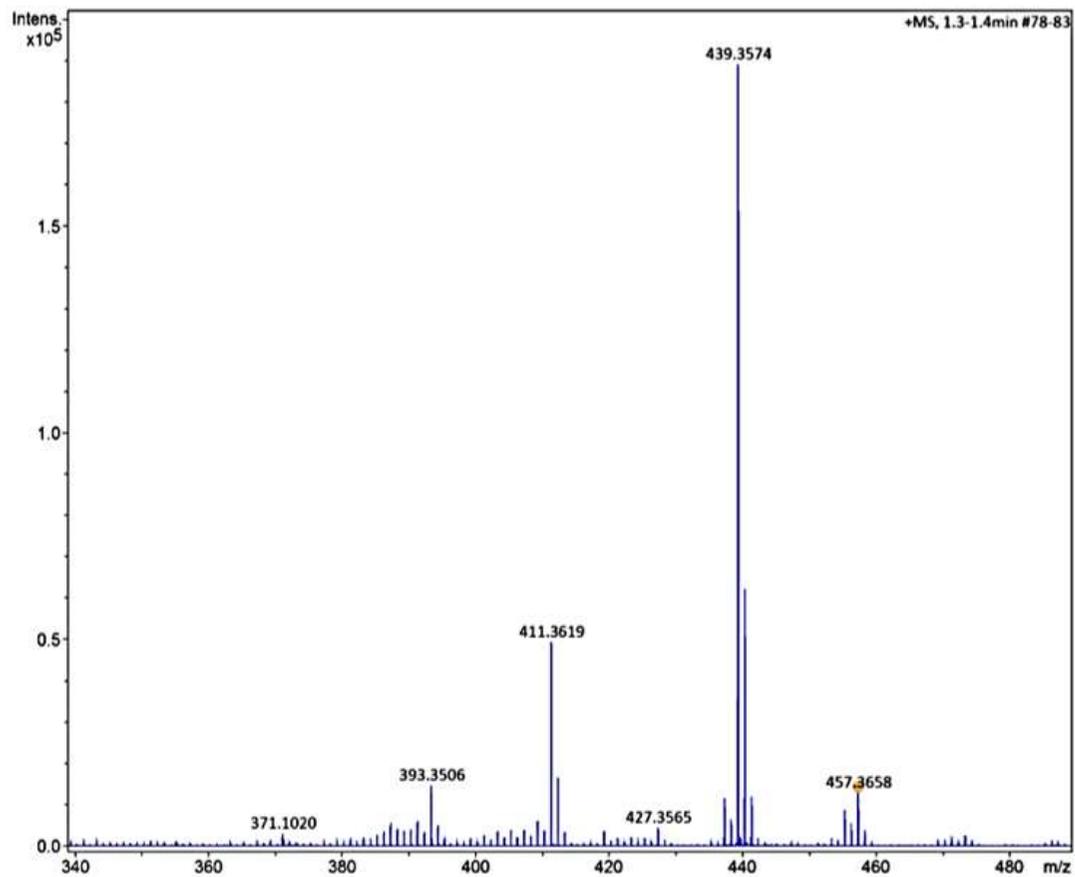
===== GRADIENT CHANNEL =====
GPNAM[1]     SINE.100
GPNAM[2]     SINE.100
GPNAM[3]     SINE.100
GPZ1         50.00 %
GPZ2         30.00 %
GPZ3         40.10 %
P16          1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters
TD           256
SFO1         75.49328 MHz
FIDRES       129.775742 Hz
SW           220.037 ppm
F2MODE       QF

F2 - Processing parameters
SI           2048
SF           300.2000000 MHz
WDW          SINE
SSB          0
LB           0 Hz
GB           0
PC           1.40

F1 - Processing parameters
SI           2048
MC2          QF
SF           75.4853500 MHz
WDW          SINE
SSB          0
LB           0 Hz
GB           0
  
```

Figura 36. Mapa de contornos de HMBC de PRM-40.



**Figura 37.** Espectro de Massas de Alta Resolução da substância 4 e proposta de fragmentação (ESI, modo positivo).

## 5.9 Identificação da substância 5 (PRM-44.10)

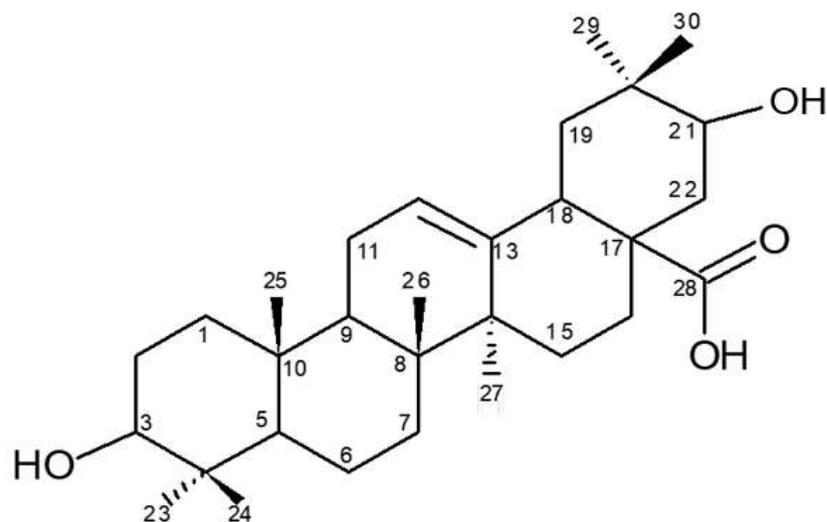
A substância **5** (Figura 38) foi obtida conforme o fracionamento cromatográfico do extrato metanólico, conforme descrito no Esquema 4 (p. 45), e apresentou-se como um sólido branco e com solubilidade em acetona. Na análise em CCD detectou-se apenas uma absorção no UV 254 nm, e após revelação em vanilina sulfúrica uma mancha de cor roxa e com  $R_f = 0,7$  quando eluída em Hex:AcOEt (6:4). Esta amostra foi identificada por meio de análises espectroscópicas de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 39) e  $^{13}\text{C}$  (Figura 40), HSQC (Figura 41), HMBC (Figura 42) e comparação com os dados reportados na literatura (Tabela 20, p. 94).

Os dados do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  mostram um tripleto em  $\delta$  5,31 ( $t$ ;  $J = 3,6$  Hz) referente ao H-12 e um duplo dubleto em  $\delta$  3,09 ( $dd$ ;  $J = 14,5$  e  $4,1$  Hz) referente ao H-18 e sinais entre  $\delta$  0,77 – 0,98 ppm referentes aos hidrogênios metílicos, bem como o sinal de um duplo dubleto em  $\delta$  3,18 ( $dd$ ;  $J = 10,0$  e  $5,3$  Hz) característico de hidrogênio oximetínico em  $\alpha$  na posição-3. Apesar de **PRM-44.10** apresentar sinais semelhantes ao ácido oleanólico, esta substância apresentou um singleto largo em  $\delta$  4,56 característico de hidrogênio oximetínico, o que permitiu sugerir um grupo hidroxila adicional à estrutura.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  apresenta sinais característicos do esqueleto oleanano, como os sinais da dupla ligação em C-12 e C-13 ( $\delta$  122,0 e 144,0), sendo que o primeiro possui hibridização  $sp^2$  e o segundo é um não hidrogenado. A comparação com os dados da literatura (MAHATO e KUNDU 1994; MIMAKI *et al.*, 2004) permitiu sugerir as seguintes atribuições: o sinal em  $\delta$  177,6 foi atribuído ao carbono carboxílico (C-28), o sinal em  $\delta$  77,7 foi atribuído ao carbono carbinólico (C-3) e o sinal em  $\delta$  74,0 foi atribuído à outro carbono carbinólico. As atribuições dos deslocamentos químicos dos hidrogênios e carbonos foram realizadas mediante as análises das correlações observados no mapa de correlação HSQC.

Os dados de HMBC permitiram sugerir a posição da hidroxila adicional da estrutura, pois os sinais em  $\delta$  3,09 do H-18 e  $\delta$  1,91 do H-22 correlacionam com o sinal  $\delta$  74,0 referente ao carbono C-21. A posição de substituição deste grupo hidroxílico na estrutura dessa substância foi proposta baseada na inspeção dos

valores de carbonos oximetínicos de diversos derivados do ácido oleanólico e seus efeitos de proteção e desproteção nos carbonos relacionados (MIMAKI *et al.*, 2004; LEE *et al.*, 2002; MAHATO e KUNDU, 1994; PIOZZI *et al.*, 1985; WANG *et al.*, 2011). Dessa forma, a substância 5 foi identificada como ácido- $3\alpha,21\alpha$ -dihidroxi-olean-12-en-28-óico.



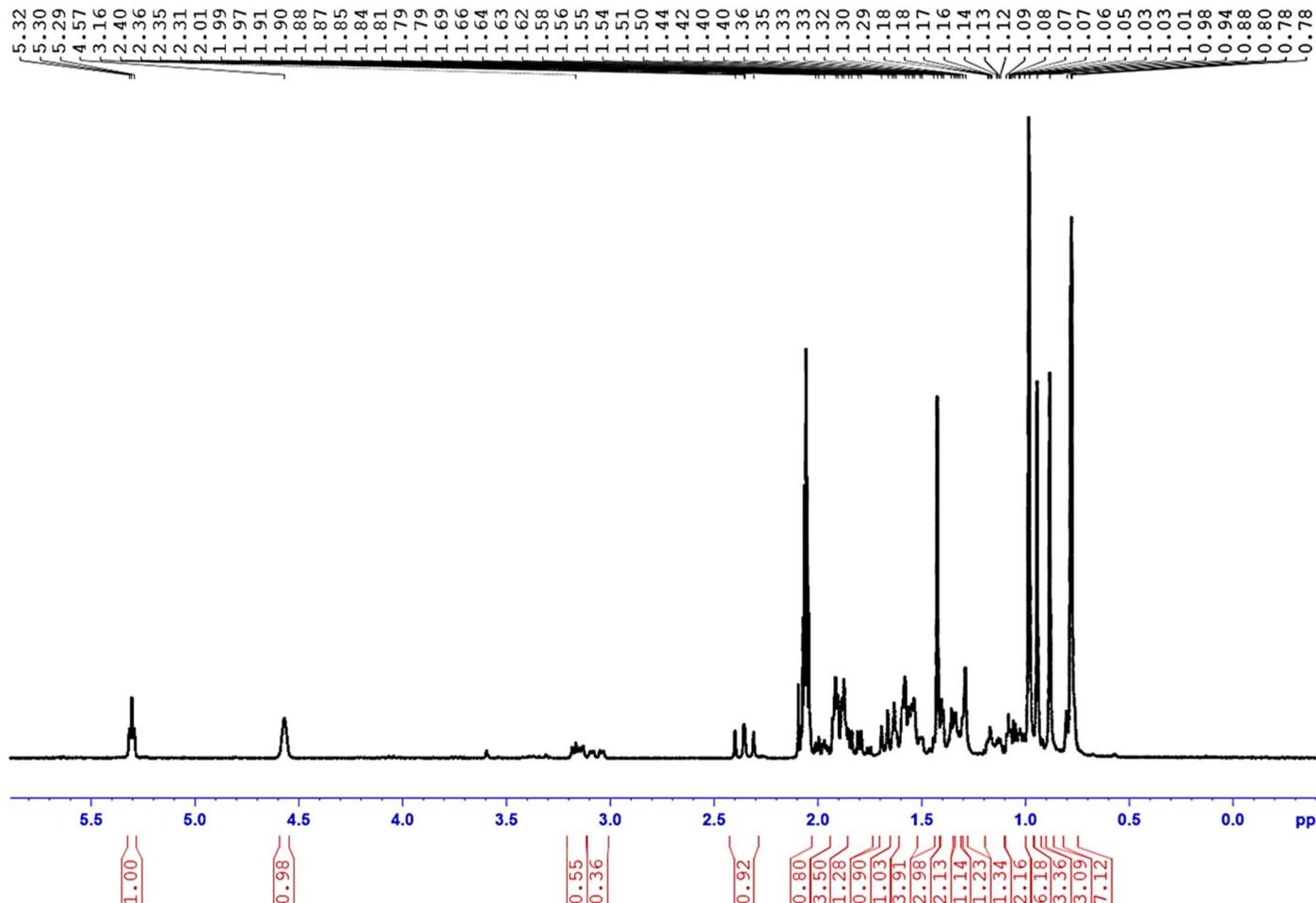
**Figura 38.** Estrutura do ácido- $3\alpha,21\alpha$ -dihidroxi-olean-12-en-28-óico.

**Tabela 20.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  do ácido-3 $\alpha$ ,21 $\alpha$ -dihidroxi-olean-12-en-28-óico.

Nº	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$
	$\delta$ (ppm) <sup>1*</sup>	$\delta$ (ppm); mult. J (Hz) <sup>2*</sup>	$\delta$ (ppm) <sup>3*</sup>	$\delta$ (ppm); mult. J (Hz) <sup>4*</sup>
Substância 5			Mimaki <i>et al</i> (2004)	
1	38,5	1,64 (m)	39,0	
2	27,2	1,58 (m) 2H	28,1	
3	77,7	3,18 (dd; 10,0; 5,3)	78,1	3,47 (dd; 10,6; 5,4)
4	38,6	----	39,4	----
5	55,4	0,80 (s)	55,9	
6	18,2	1,42 (s); 1,37 (m) 2H	18,8	
7	33,0	1,59 (m) 2H	33,5	
8	39,3	----	39,7	----
9	46,7	1,69 (t; 9,3)	48,2	
10	36,9	----	37,4	
11	23,2	1,91 (dd; 8,8; 3,2)	23,9	
12	122,0	5,31 (t; 3,6)	122,5	5,60 (t; 3,2)
13	144,0	----	145,1	----
14	41,3	----	42,6	----
15	30,3	1,29 (m)	28,8	
16	31,8	1,83 (m)	27,4	
17	47,8	----	47,2	----
18	40,6	3,09 (dd; 14,5; 4,1)	42,1	3,53 (dd; 13,9; 3,2)
19	46,5	2,39 (dd; 14,2; 12,8)	41,7	2,62 (dd; 13,9; 13,9)
20	35,4	----	35,9	----
21	74,0	4,56 (sl)	73,8	3,81 (dd; 2,7; 2,7)
22	35,1	1,91 (dd; 8,8; 3,2)	40,4	2,39 (dd; 14,4; 2,7)
23	32,5	0,88 (s)	28,8	1,25 (s)
24	15,5	0,78 (s)	16,6	1,04 (s)
25	15,0	0,94 (s)	15,7	0,94 (s)
26	16,7	0,78 (s)	17,6	1,08 (s)
27	26,3	1,42 (s)	25,7	1,40 (s)
28	177,6	----	180,3	----
29	27,8	0,98 (s)	28,5	1,27 (s)
30	23,8	0,98 (s)	25,1	1,16 (s)

1\* 75 MHz, Acetona; 2\* 300 MHz, Acetona; 3\* 100 MHz, Piridina-d<sub>5</sub>; 4\* 500 MHz, Piridina-d<sub>5</sub>.

PRM-44.10 (1H sup; Acetona; 6.1 mg)  
 02/05/2019  
 Op. Magno



Current Data Parameters  
 NAME PRM-44.10  
 EXPNO 12  
 PROCNO 1

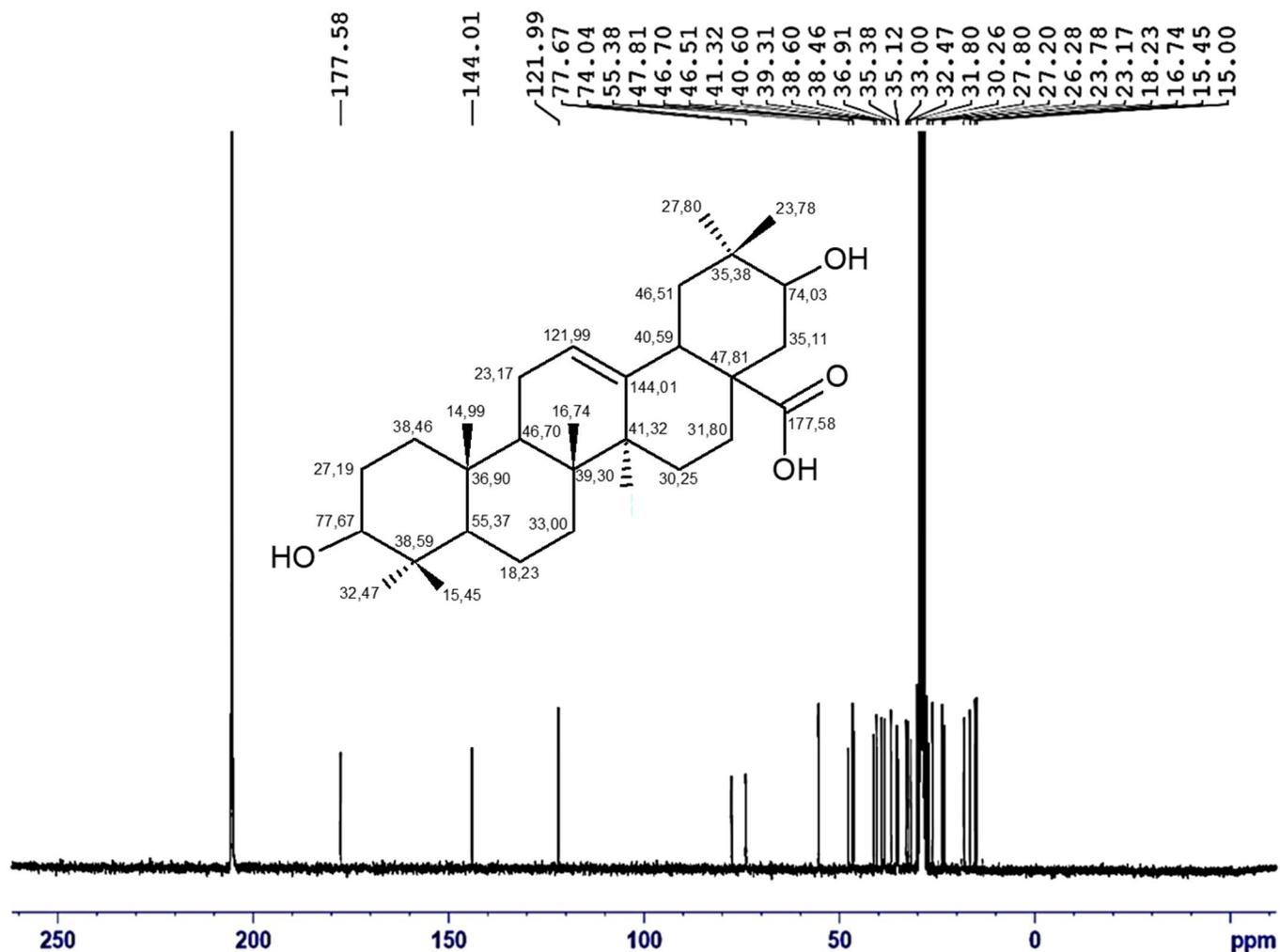
F2 - Acquisition Parameters  
 Date\_ 20190502  
 Time\_ 15.29  
 INSTRUM FOURIER300  
 PROBHD 5 mm DUL 13C-1  
 PULPROG zgpcpr  
 TD 65536  
 SOLVENT Acetone  
 NS 32  
 DS 4  
 SWH 6103.516 Hz  
 FIDRES 0.093132 Hz  
 AQ 5.3687091 sec  
 RG 17.9125  
 DW 81.920 usec  
 DE 10.00 usec  
 TE 1007.3 K  
 D1 2.0000000 sec  
 D12 0.00002000 sec  
 P41 2000000.00 usec  
 TD0 1

===== CHANNEL f1 =====  
 SFO1 300.2008861 MHz  
 NUC1 1H  
 P1 7.88 usec  
 PLW1 20.0000000 W  
 PLW9 0.00001000 W

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

Figura 39. RMN de <sup>1</sup>H de PRM-44.10 (300 MHz, Acetona).

PRM-44.10 (13C; Acetona; 6.1 mg)  
 02/05/2019  
 Op. Magno



Current Data Parameters  
 NAME PRM-44.10  
 EXPNO 2  
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters  
 Date\_ 20190502  
 Time 15.41  
 INSTRUM FOURIER300  
 PROBHD 5 mm DUL 13C-1  
 PULPROG zgpg30  
 TD 32768  
 SOLVENT Acetone  
 NS 43008  
 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 1007.3 K  
 D1 0.30000001 sec  
 D11 0.03000000 sec  
 D31 0.00000875 sec  
 D40 0.02336821 sec  
 L4 20  
 L5 8  
 F32 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  
 CFPDPRG[2] waltz16  
 PCPD2 90.00 usec  
 PLW2 20.00000000 W  
 PLW12 0.16806000 W  
 PLW13 0.13613001 W

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

Figura 40. Dados de RMN de <sup>13</sup>C de PRM-44.10 (75 MHz, Acetona).

PRM-44.10 (HMBC1H sup; Acetona; 6.1 mg)  
 14/05/2019  
 Op. Magno



```

Current Data Parameters
NAME      PRM-44.10
EXPNO    300
PROCNO   1

F2 - Acquisition Parameters
Date_    20190514
Time     16.46
INSTRUM  FOURIER300
PROBHD   5 mm DUL 13C-1
PULPROG  hmbcggplpndqf
TD       2048
SOLVENT  Acetone
NS       200
DS       16
SWH      6103.516 Hz
FIDRES   2.980232 Hz
AQ       0.1677722 sec
RG       501.187
DW       81.920 usec
DE       10.00 usec
TE       292.6 K
CNST12   145.0000000
CNST13   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      0.00002880 sec
IN0      0.00002880 sec

===== CHANNEL f1 =====
SF01    300.2019513 MHz
NUC1    1H
P1      7.64 usec
P2      15.28 usec
PLW1    20.00000000 W

===== CHANNEL f2 =====
SF02    75.4932760 MHz
NUC2    13C
P3      9.30 usec
PLW2    50.00000000 W

===== GRADIENT CHANNEL =====
GPNAM[1] SINE.100
GPNAM[2] SINE.100
GPNAM[3] SINE.100
GPZ1    50.00 %
GPZ2    30.00 %
GPZ3    40.10 %
P16     1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters
TD      256
SF01    75.49328 MHz
FIDRES  135.633682 Hz
SW      229.969 ppm
FnMODE  QF

F2 - Processing parameters
SI      4096
SF      300.1999983 MHz
WDW     SINE
SSB     0
LB      0 Hz
GB      0
PC      1.40

F1 - Processing parameters
SI      4096
MC2     QF
SF      75.4853499 MHz
WDW     SINE
SSB     0
LB      0 Hz
GB      0
  
```

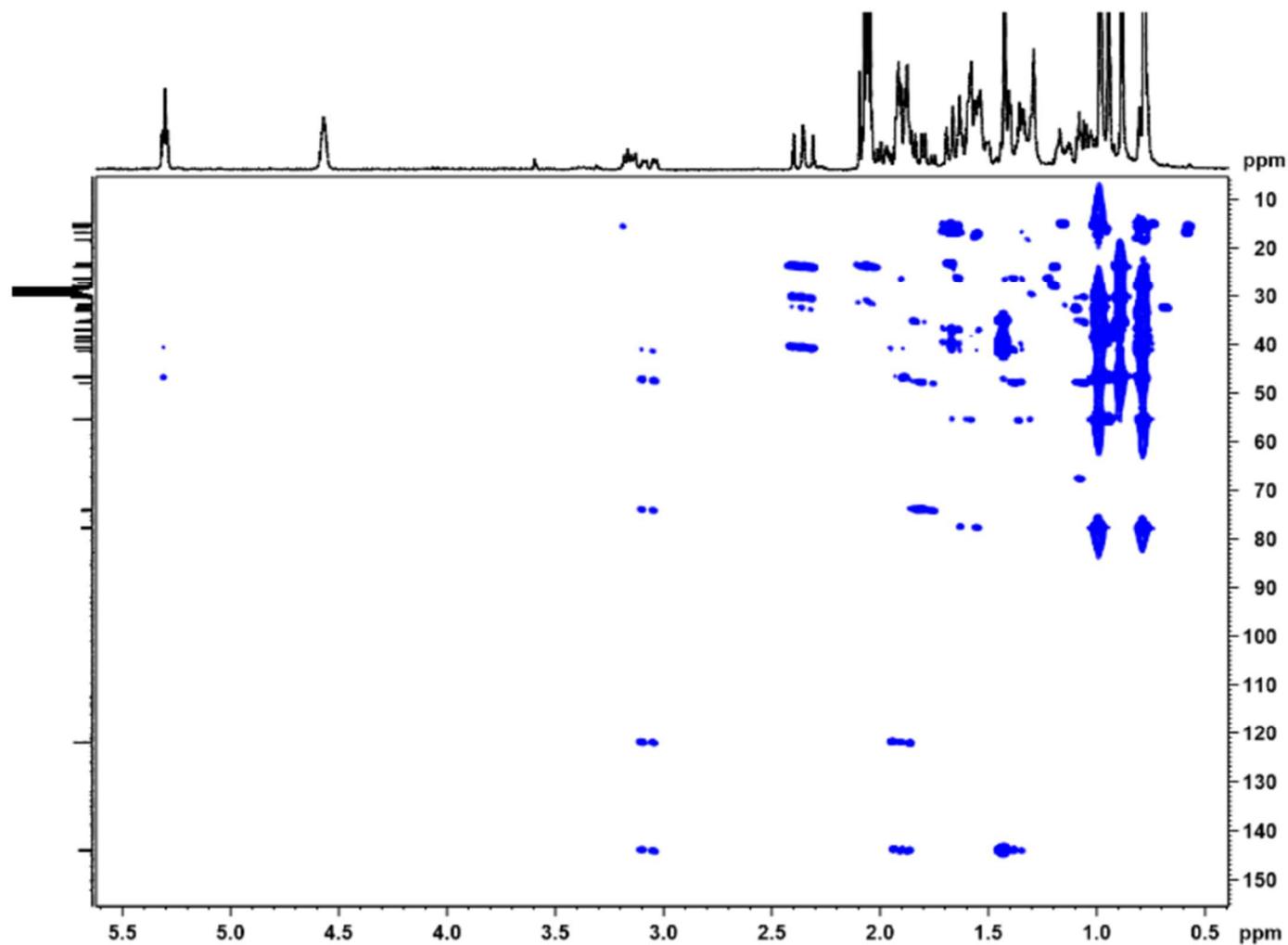


Figura 41. Mapa de contornos de HSQC de PRM-44.10 (75 MHz, Acetona).

## 6. Ensaio de Avaliação antibacteriana

### 6.1. Ensaio antibacteriano – Teste de difusão em ágar

O ensaio antimicrobiano foi realizado com as substâncias isoladas: espinasterol (**2**), 3 $\beta$ -nonanoato de espinasterol (**3**) e ácido oleanólico (**4**), o qual foi desenvolvido por meio do teste de difusão em ágar realizado frente a bactérias gram-positivas.

Nesse teste nenhuma das amostras apresentou atividade na concentração testada de 1 mg/mL. Apesar das substâncias não apresentarem atividade, há relato de atividade da substância **4** frente às bactérias gram-positivas (*Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis*, *S. aureus* e *S. epidermidis*) (KIM *et al.*, 2015; KUREK *et al.*, 2009; HORIUCHI *et al.*, 2007; JIMÉNEZ-ARELLANES *et al.*, 2007; FONTANAY *et al.*, 2008).

Segundo Kim e colaboradores (2015), o ácido oleanólico inibe o crescimento de *L. monocytogenes*, *E. faecium* e *E. faecalis*, além de indicar resultados de mortalidade para essas bactérias, o que possibilitou inferir que o ácido oleanólico afeta a membrana celular bacteriana. No ensaio realizado por esses autores, as concentrações inibitórias mínimas foram determinadas pelo método de diluição em caldo. Os resultados obtidos por Kim e colaboradores (2009) quando comparados com os deste trabalho, demonstram que método de diluição em caldo possibilitou a visualização da atividade inibitória da amostra em menores concentrações, porém, o mesmo não ocorreu no método de difusão em ágar testada neste trabalho. A ausência de uma zona de inibição não significa necessariamente que a amostra seja inativa frente ao micro-organismo testado, pois pode ser que a difusão não foi completa, e isso pode ser relacionado com a dificuldade de difusão da amostra no meio da cultura sólida devido à natureza química ou características lipofílicas das substâncias isoladas (Moreno *et al.*, 2006; Rios *et al.*, 1988).

De acordo com a literatura, o ácido oleanólico inibe o crescimento e a sobrevivência de muitas bactérias, particularmente as do tipo gram-positivas. Pois, o ácido oleanólico afeta a morfologia celular e aumenta a autólise das células bacterianas (KUREK *et al.*, 2009).

## 7. CONCLUSÃO

Os estudos realizados com *Pithecellobium racemosum* no presente trabalho conduziram o isolamento e a identificação de três esteroides: espinasterona, espinasterol e 3 $\beta$ -nonanoato de espinasterol, bem como o isolamento e a identificação de dois triterpenos: ácido oleanólico e ácido-3 $\alpha$ ,21 $\alpha$ -dihidroxi-olean-12-en-28-óico. Sendo que a espinasterona, o 3 $\beta$ -nonanoato de espinasterol, o ácido oleanólico e o ácido-3 $\alpha$ ,21 $\alpha$ -dihidroxi-olean-12-en-28-óico são reportados pela primeira vez no gênero *Pithecellobium*.

Este trabalho contribui para o conhecimento prévio da composição química da espécie *P. racemosum*. Uma vez que é o segundo registro de estudo fitoquímico descrito na literatura.

Na busca pelos estudos das propriedades tecnológicas da espécie *P. racemosum* através das determinações da densidade básica e da estabilidade dimensional, evidenciou-se que por tratar-se de uma madeira com alta densidade e fator anisotrópico de excelente qualidade, agregou-se valor para a demanda da reutilização do resíduo madeireiro.

Visando a avaliação do potencial antibacteriano das substâncias isoladas, as amostras submetidas ao teste de difusão em ágar não apresentaram atividade frente as bactérias testadas. Apesar disso, é importante salientar que ausência de uma zona de inibição não significa necessariamente que a amostra seja inativa, por isso é interessante avaliar a difusão das substâncias a serem testadas ou até mesmo cogitar outros métodos antibacterianos.

Desse modo, esta pesquisa descreveu a importância dos estudos dos metabólitos secundários desta espécie, bem como as propriedades tecnológicas que agregam valor aos resíduos madeireiros.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEODATO, S.; VILELA, M.; BETIOL, L. S.; MONZONI, M. Madeira de ponta a ponta: o caminho desde a floresta até o consumo. São Paulo, SP: **FGV RAE**, v. 1, n. 1, p. 128, 2011.

ALLEN, O. N.; ALLEN, E. K. The Leguminosae, a source book of characteristics, uses, and nodulation. **Univ. of Wisconsin Press**, v. 1, n. 1, p. 812, 1981.

ANDRADE A. L. P., MIOTTO, S. T. S.; SANTOS, E. P. A subfamília Faboideae (Fabaceae Lindl.) no Parque Estadual do Guartelá, Paraná - Brasil. **Hoehnea**, v. 36, n. 4, p. 737-768, 2009.

BAKAR, R. ABU; AHMAD, I.; SULAIMAN, S. F. Effect of *Pithecellobium jiringa* as antimicrobial agent. **Bangladesh Journal of Pharmacology**, v. 7, n. 2, p. 131-134, 2012.

BARRERA-NECHA, L.; BAUTISTA-BAÑOS, S.; BRAVO-LUNA, L.; BERMUDEZ-TORRES, K.; GARCIA-SUAREZ, F.; JIMENEZ-ESTRADA, M.; REYES-CHILPA, R. Antifungal activity against postharvest fungi by extracts and compounds of *Pithecellobium dulce* seeds (huamuchil). **Acta Horticulturae**, v. 2, n. 1, p. 761-766, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual integrado de vigilância, prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Editora do Ministério da Saúde**. Brasília, p. 158, 2010.

BRASILEIRO, S. F. A atividade madeireira na Amazônia brasileira: produção, receita e mercados / Serviço Florestal Brasileiro, Instituto do Homem e Meio Ambiente da Amazônia – Belém, PA. **Serviço Florestal Brasileiro (SFB). Instituto do Homem e Meio Ambiente da Amazônia (Imazon)**, p. 20, 2010.

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal view. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n. 1-2, p. 131-134, 2005.

CHOI, N. H.; JANG, J. Y.; CHOI, G. J.; CHOI, Y. H.; JANG, K. S.; NGUYEN, V. T.; MIN, B. S.; DANG, Q. L.; KIM, J. C. Antifungal activity of sterols and dipsacus saponins isolated from *Dipsacus asper* roots against phytopathogenic fungi. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 141, p. 103-108, 2017.

CURSINO, L. M. C.; SANTOS, I.; MARIÚBA, L. A. M.; JEFFREYS, M. F.; LIMA, N. M.; OLIVEIRA, J. L.; ORLANDI, P. P.; NUNEZ, C. V. 2011. Antibacterial activity of *Minquartia guianensis* extracts and phytochemical evaluation. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, v. 23, n. 6, p. 505-510.

ELOFF, J.N. A Sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plants extract for bacteria. **Planta Medica**, v. 64, n. 8, p. 711-713, 1998.

FONTANAY, S.; GRARE, M.; MAYER, J.; FINANCE, C.; DUVAL, R. E. Ursolic, oleanolic and betulinic acids: antibacterial spectra and selectivity indexes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, n. 2, p. 272-276, 2008.

GUNASEKERA, S. P.; CORDELL, G. A.; FARNSWORTH, N. R. Constituents of *Pithecellobium multiflorum*. **Journal of Natural Products**, v. 45, n. 5, p. 651-651, 1982.

GOMES, D.C. F.; ALEGRIO, L. V. Acyl sterol glycosides from *Pithecellobium cauliflorum*. **Phytochemistry**, v. 49, n. 5, p. 1365-1367, 1998.

HORIUCHI, K.; SHIOTA, S.; HATANO, T., YOSHIDA, T.; KURODA, T.; TSUCHIYA, T. Antimicrobial activity of oleanolic acid from *Salvia officinalis* and related compounds on vancomycin-resistant enterococci (VRE). **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, n. 6, p. 1147-1149, 2007.

IGNOATO M. C. Contribuição ao estudo fitoquímico e atividades biológicas de *Aeschynomene fluminensis* e de *Machaerium hirtum* (Fabaceae) de Porto Rico. Tese (Doutorado). **Universidade Estadual de Maringá**, p. 209, 2012.

JIMÉNEZ-ARELLANES, A.; MECKES, M.; TORRES, J.; LUNA-HERRERA, J. Antimycobacterial triterpenoids from *Lantana hispida* (Verbenaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 2, p. 202-205, 2007.

KATEKHAYE, S. D.; LADDHA, K. S. Coumarins and a Triterpenoid from *Pithecellobium dulce*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 51, n. 5, p. 956-958, 2015.

KATEKHAYE, S. D.; PAUL, A.; LADDHA, K. S. Lupane analogue from bark of *Pithecellobium dulce* and in vitro  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase enzyme inhibition assay of extract for potential antidiabetic activity. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 52, n. 2, p. 359-362, 2016.

KHAN I. A., CLARK A. M. E MCCHESENEY J. D. Atividade antifúngica de um novo triterpeno glicosilado de *Pithecellobium racemosum* (M.) **Pharmaceutical Research**, v. 14, n. 3, p. 358-361, 1997.

KIM, S.; LEE, H.; LEE, S.; YOON, Y.; CHOI, K. H. Antimicrobial action of oleanolic acid on *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. **PLoS One**, v. 10, n. 3, p. 1-11, 2015.

KUMAR, M.; NEHRA, K.; DUHAN, J. S. Phytochemical analysis and antimicrobial efficacy of leaf extracts of *Pithecellobium dulce*. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 6, n. 1, p. 70-76, 2013.

LEE, K. T., CHOI, J.; JUNG, W. T.; NAM, J. H.; JUNG, H. J.; PARK, H. J. Structure of a new echinocystic acid bisdesmoside isolated from *Codonopsis lanceolata* roots and the cytotoxic activity of prosapogenins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 15, p. 4190-4193, 2002.

MA, S. G.; HU, Y. C., YU, S. S., ZHANG, Y., CHEN, X. G., LIU, J.; LIU, Y. X. Cytotoxic triterpenoid saponins acylated with monoterpenic acid from *Pithecellobium lucidum*. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 1, p. 41-46, 2007.

MAHATO, S. B.; KUNDU, A. P.  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of pentacyclic triterpenoids—a compilation and some salient features. **Phytochemistry**, v. 37, n. 6, p. 1517-1575, 1994.

MIMAKI, Y.; YOKOSUKA, A.; HAMANAKA, M.; SAKUMA, C.; YAMORI, T.; SASHIDA, Y. Triterpene Saponins from the Roots of *Clematis chinensis*. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 9, p. 1511-1516, 2004.

MMA. Avaliação e identificação de áreas e ações prioritárias para a conservação, utilização sustentável e repartição dos benefícios da biodiversidade nos biomas brasileiros. Brasília - DF: **Ministério do Meio Ambiente - MMA**, 2012.

MOBOT, 2012. APG III (Família Fabaceae). Disponível em: <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/orders/fabalesweb.htm#Fabaceae>. Acessado em 20/09/2017.

MORENO, S.; SCHEYER, T.; ROMANO, C.S.; VOJNOV, A.A. Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. **Free Radical Research**. v. 40, p. 223-231, 2006.

NIGAM, S. K., GOPAL, M., UDDIN, R., YOSHIKAWA, K., KAWAMOTO, M., & ARIHARA, S. Pithedulosides AG, oleanane glycosides from *Pithecellobium dulce*. **Phytochemistry**, v. 44, n. 7, p. 1329-1334, 1997.

NIGAM, S. K.; MITRA, C. R. *Pithecellobium dulce* IV. Constituintes de flores, cerne e casca de raiz. **Planta Medica**, v. 16, n. 03, p. 335-337, 1968.

OIMT. Reseña anual y evaluación de la situación mundial de las maderas. **Organización Internacional de las Maderas Tropicales**. Yokohama- Japão, p. 210, 2010.

PIOZZI, F.; PATERNOSTRO, M.; PASSANNANTI, S.; GACS-BAITZ, E. Triterpenes from *Amaracus dictamnus*. **Phytochemistry**, v. 25, n. 2, p. 539-541, 1986.

PRATES R. C. O desmatamento desigual na Amazônia brasileira: sua evolução, suas causas e consequências sobre o bem-estar. Tese (Doutorado) - **Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**. Piracicaba, p. 135, 2008.

RÍOS, J.L.; RECIO, M.C.; VILLAW, A. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 2, n. 2-3, p. 127-149, 1988.

ROZATTO, M. R. Determinação da atividade antimicrobiana in vitro de extratos, frações e compostos isolados de *Arrabidaea brachypoda*. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). **Universidade Estadual Paulista**, p. 100, 2012.

SAHU, N. P.; MAHATO, S. B. Anti-inflammatory triterpene saponins of *Pithecellobium dulce*: characterization of an echinocystic acid bisdesmoside. **Phytochemistry**, v. 37, n. 5, p. 1425-1427, 1994.

SEEBACHER, W.; SIMIC, N.; WEIS, R.; SAF, R.; KUNERT, O. Complete assignments of  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR resonances of oleanolic acid,  $18\alpha$ -oleanolic acid, ursolic acid and their 11-oxo derivatives. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 41, n. 8, p. 636-638, 2003.

SIMONETTI, E. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos de *Eugenia anomala* e *Psidium salutare* (Myrtaceae) frente à *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, n. 1, p. 9-18, 2016.

SOUSA J. S., BASTOS M. N. C E ROCHA A. E. S. Mimosoideae (Leguminosae) do litoral paraense. **Acta Amazonica**, v. 39, n. 4, p. 799 – 812, 2009.

XU, X.; ZHU, X.; DWEK, R. A.; STEVENS, J.; WILSON, I. A. Structural characterization of the 1918 influenza virus H1N1 neuraminidase. **Journal of Virology**, v. 82, n. 21, p. 10493-10501, 2008.

WANG, X. L., HAY, A. E.; MATHEEUSSEN, A.; GUPTA, M. P.; HOSTETTMANN, K. Structure elucidation and NMR assignments of two new triterpenoids from the stems of *Paragonia pyramidata* (Bignoniaceae). **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 49, n. 4, p. 184-189, 2011.