



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Exatas e da Natureza
Departamento de Química Fundamental
Programa de Pós-Graduação em Química

Estudo Químico e Biológico da Madeira de lei *Hymenolobium petraeum* (Angelim pedra)

Dissertação de Mestrado

Luciana Santos de Oliveira

**RECIFE – PE
2011**

Luciana Santos de Oliveira

**Estudo Químico e Biológico da Madeira de lei
Hymenolobium petraeum (Angelim pedra)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Pernambuco como requisito final à obtenção do título de Mestre em Química. Área de concentração: Química de Produtos Naturais.

Orientador: Prof. Dr. Lothar Wilhelm Bieber

Co-Orientadora: Prof. Dr. Márcia Silva do Nascimento

**RECIFE – PE
2011**

Catálogo na fonte
Bibliotecária Joana D'Arc L. Salvador, CRB 4-572

Oliveira, Luciana Santos de.

Estudo químico e biológico da madeira de lei
Hymenolobium Petraeum (Angelim pedra) / Luciana
Santos de Oliveira. - Recife: O Autor, 2011.

xvii, 133 f.: fig. tab.

Orientador: Lothar Bieber.

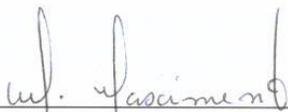
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de
Pernambuco. CCEN. Química Fundamental, 2011.

Inclui bibliografia e anexo.

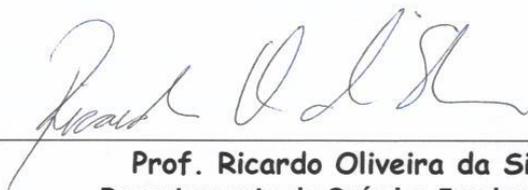
1. Química orgânica. 2. Produtos naturais. I. Bieber,
Lothar (orientador). II. Título.

Dissertação submetida ao Corpo Docente do Programa de Pós-Graduação em Química do Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de Mestre em Química.

Aprovada:



Prof. Márcia Silva do Nascimento (Co-orientadora)
Departamento de Antibióticos
Universidade Federal de Pernambuco



Prof. Ricardo Oliveira da Silva
Departamento de Química Fundamental
Universidade Federal de Pernambuco



Prof. Cláudia de Albuquerque Maranhão
Instituto Federal de Pernambuco

"Estudo Químico e Biológico da Madeira de Lei *Hymenolobium petraeum* (Angelim pedra)"

Por

Luciana Santos de Oliveira

Departamento de Química Fundamental
Centro de Ciências Exatas e da Natureza
Universidade Federal de Pernambuco
Recife-PE-Brasil
13 de maio de 2011

*A minha família: pai, mãe e
irmã pelo apoio incondicional
e por acreditarem em mim.*

*“Bem mesmo é ir à luta com determinação,
abraçar a vida com paixão,
perder com classe e vencer com ousadia,
por que o mundo pertence a quem se atreve.
E a vida é **muito** para ser insignificante.”*

Charles Chaplin

AGRADECIMENTO

Um especial agradecimento Prof. Dr. Lothar Bieber por me aceitar como sua aluna e pela orientação.

À professora Dra. Márcia Nascimento, pela orientação, incentivo, amizade, companheirismo e dedicação, meu obrigada e minha total admiração.

Aos Professores Dr. George Jackson e Dr. Adilson Gonçalves por me aceitar e disponibilizar o laboratório para realização dos trabalhos sobre o estudo de lignina.

À professora Dra. Daniela Navarro por disponibilizar seu laboratório para realização dos testes larvicida e por possibilitar auxílio financeiro para a pesquisa fora de campo.

Ao professor Dr. Ricardo Oliveira pela realização das análises espectroscópicas.

À Professora Norma Gusmão e à aluna Rita de Cássia pela realização dos testes de atividade fungicida.

Aos técnicos da Central analítica, Eliete, Elias, Abene, Lúcio e Severino pelas análises realizadas.

Aos funcionários Maurílio e Patrícia pela ajuda na parte burocrática da pós-graduação.

A um amigo que se dispôs a dedicar um pouco do seu tempo para me ajudar nas análises de RMN, a você Rubens, muito obrigada.

Um agradecimento especial as grandes amigas que me ajudaram na pesquisa e na vida Prof. Dra. Ándrea Santana, Prof. Dra. Cláudia Albuquerque e Prof. Dra. Janaina Versiano.

Aos grandes e queridos amigos que me acompanham nessa jornada da minha vida: Jéssica, Diego, Ester, Fausthon, Rogério (pai), Dayvson, Kaline, Marcelo (Zoio) e aos

demais amigos do DQF: Túlio, Charles, Juliano, Julix, Fred, Dianinha, Felipe.... pelo companheirismo e momentos de descontração.

Aos alunos do laboratório da EEL-USP em Lorena: Naila, Fernando, Priscila, José Luiz, Mariana, Rafael e Simone, aos técnicos Zé cobrinha, Jussara e Cibele e aos amigos que fiz, em Lorena-SP, Carol, Flávio, Juliana e Ándrea.

Aos meus pais e irmã: Solange, Fernandes e Renata, pela paciência e compreensão por sempre estar ao meu lado e me apoiar e incentivar. E aos familiares: Silvana, Ricardo, Suzana, Marisa, e seus respectivos filhos (as) e companheiros (as), a todos eu dedico este trabalho.

Ao mais novo membro da família, Daniel, que me deu muitas alegrias nesse período de desenvolvimento da pesquisa.

A Deus por sempre abrir meus caminhos e colocar pessoas boas em minha vida

Ao CNPq pelo apoio financeiro

A todos que contribuíram direta e indiretamente para a realização desse trabalho,

Muito Obrigada!

SUMÁRIO

AGRADECIMENTO.....	V
SUMÁRIO.....	VIII
ÍNDICE DE TABELA.....	XI
ÍNDICE DE FIGURA.....	XII
ABREVIATURA E SÍMBOLOS.....	XIV
RESUMO.....	XVI
ABSTRACT.....	XVII
1 INTRODUÇÃO.....	01
1.1 Definição da Madeira.....	02
1.2 Anatomia da madeira.....	03
1.3 Composição química.....	04
1.3.1 Celulose e Hemicelulose.....	04
1.3.2 Lignina.....	06
1.3.3 Extrativos.....	10
1.4 Atividade biológica.....	16
1.4.1 Atividade fungicida.....	17
1.4.2 Atividade larvicida.....	18
1.5 Fundamentação teórica da espécie <i>Hymenolobium Petraeum</i> (Angelim pedra).....	19
1.5.1 Considerações sobre a família Leguminosae.....	19
1.5.2 <i>Hymenolobium Petraum</i>	19
1.5.3 fundamentação dos flavonóides.....	22
1.5.3.1 Isoflavonóides e seus derivados.....	25
2 OBJETIVOS.....	28
2.1 Objetivo geral.....	28
2.2 Objetivos específicos.....	28
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
3.1 Materiais.....	29
3.2 Preparo do material.....	30
3.3 Abordagem fitoquímica.....	31
3.3.1 Determinação de Alcalóides.....	31

3.3.2 Determinação de Flavonóides.....	32
3.3.3 Determinação de Saponinas.....	32
3.3.4 Determinação de Taninos.....	32
3.3.5 Determinação de Terpenos e Esteróides.....	32
3.4 Quantificação de Umidade.....	33
3.5 Determinação de Fenóis Totais.....	33
3.6 Quantificação de flavonóides.....	34
3.7 Quantificação, isolamento, e caracterização da madeira <i>Hymenolobium</i> <i>petraeum</i>	34
3.7.1 Determinação de lignina solúvel e insolúvel em meio ácido.....	34
3.7.2 Determinação do teor de cinzas na lignina insolúvel.....	36
3.7.3 Determinação do teor de carboidratos.....	37
3.7.4 Determinação do teor de furfural e hidroximetilfurfural.....	37
3.7.5 Isolamento de lignina em meio básico.....	38
3.7.5.1 Precipitação da lignina.....	38
3.7.6 Acetilação da lignina.....	39
3.7.7 Caracterização da lignina.....	39
3.7.7.1 Curva padrão de lignina solúvel em espectros de UV / Visível.....	39
3.7.7.2 Espectros no infravermelho.....	40
3.7.7.3 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear- RMN.....	40
3.7.7.4 Determinação da fórmula mínima.....	41
3.8 Obtenção dos extrativos da madeira (extratos brutos).....	41
3.8.1 Fracionamento do extrato acetato de etila.....	42
3.9 Bioensaios.....	45
3.9.1 Teste de atividade fungicida.....	45
3.9.1.1 Meio de crescimento do fungo.....	45
3.9.1.2 Preparação das amostras para inóculo.....	45
3.9.2 Teste de atividade larvicida.....	
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
4.1 Resultados do screening fitoquímico.....	47
4.2 Resultados das análises quantitativas.....	48

	X
4.2.1 Teor de umidade e extrativos.....	48
4.2.2 Composição química total da madeira.....	49
4.2.3 Resultado dos teores de fenóis totais e flavonóides.....	51
4.3 Identificação da estrutura da lignina.....	54
4.3.1 Resultados do IV da lignina.....	54
4.3.2 Resultados do RMN de ¹ H da lignina.....	58
4.3.3 Resultados da análise elementar da lignina.....	60
4.4 Identificação das estruturas químicas isoladas do extrato em acetato de etila.....	62
4.4.1 Fragmentação e similaridade das estruturas identificadas por GC/MS.....	64
4.4.2 Elucidação estrutural das substâncias isoladas do extrato em acetato de etila.....	67
4.5 Bioensaio.....	86
4.5.1 Atividade fungicida.....	86
4.5.2 Bioensaios preliminares das substâncias isoladas.....	87
5 CONCLUSÃO.....	88
6. PERSPECTIVAS.....	89
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	90
8 ANEXOS.....	101

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.	Compostos isolados de extratos de plantas e suas respectivas atividades biológicas.	15
Tabela 2.	Testes para identificação das classes de compostos presentes no vegetal.	31
Tabela 3.	Abordagem fitoquímica.	47
Tabela 4.	Percentual de extrativos da madeira <i>H. petraeum</i> .	48
Tabela 5.	Composição química da madeira <i>H. petraeum</i> em %.	50
Tabela 6.	Atribuições dos picos de absorção no IV de ligninas de acordo com Lim e Dence (1992).	55
Tabela 7.	Subestruturas da lignina	56
Tabela 8.	Sinais do espectro de RMN de ^1H da lignina acetilada	59
Tabela 9.	Dados da análise elementar de lignina da madeira <i>H. Petraeum</i> .	61
Tabela 10.	Rendimento das substâncias obtidas.	63
Tabela 11.	Resultados das análises de GC/MS das frações HPAC-A(2-10).	64
Tabela 12.	Dados de RMN de ^1H , ^{13}C , HMBC e HSQC da substancia HP-1 em Acetona- d_6 .	68
Tabela 13.	Dados de RMN de ^1H , ^{13}C , HMBC e HSQC de HP-2 em piridina- d_5 .	76
Tabela 14.	Dados de RMN de ^1H , ^{13}C , HMBC e HSQC do composto HP-3 em DMSO.	80
Tabela 15.	Dados de RMN de ^1H , ^{13}C do coumestrol em DMSO.	81
Tabela 16.	Espectro de RMN de ^1H , ^{13}C , HMBC e HSQC da isoflavona em DMSO.	85

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Representação da anatomia do tronco de uma árvore.	03
Figura 2.	Polímero da celulose.	05
Figura 3.	Unidades de açúcares das hemiceluloses.	06
Figura 4.	Alcoóis precursores da lignina.	08
Figura 5.	Estrutura da lignina de madeiras de coníferas, segundo Adler 1977.	09
Figura 6.	Oxiresveratrol (a) e Diidromorina (b).	12
Figura 7.	Basidiomicetos: Cogumelo (A) e Orelha de pau (B).	18
Figura 8.	<i>Hymenolobium petraeum</i> (Angelim Pedra).	20
Figura 9.	Esqueleto básico de um flavonóide.	22
Figura 10.	Esquema biosintética dos flavonóides.	23
Figura 11.	Formação do grupo prenila (Fonte: Dewick, 2001).	24
Figura 12.	Transformações do grupo prenila: formação do anel furano dissubstituído (Fonte: Dewick, 2001).	25
Figura 13.	1,2-difenil-propano.	26
Figura 14.	Isoflavona (A), Pterocarpano (B) e Coumestanos (C).	27
Figura 15.	Algumas fitoalexinas derivadas de isoflavonóides.	27
Figura 16.	Da esquerda para direita estão: Reator, banho e sistema de deslignificação respectivamente.	38
Figura 17.	Cromóforos da lignina.	40
Figura 18.	Esquema de análise da madeira.	42
Figura 19.	Esquema de fracionamento do extrato em acetato de etila.	44
Figura 20.	Larvas do <i>Aedes aegypti</i> no estágio L4.	46
Figura 21.	Produtos da decomposição da celulose e hemicelulose.	49
Figura 22.	Curva padrão do ácido gálico.	52
Figura 23.	Curva padrão de rutina.	53
Figura 24.	Espectroscopia de FTIR da lignina <i>in natura</i> (esquerda) e acetilada (direita).	56
Figura 25.	Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) da lignina acetilada.	59
Figura 26.	Substâncias identificadas no estudo da madeira <i>H. petraeum</i>	62
Figura 27.	Formação do íon $m/z = 101$.	64

Figura 28.	Representação do rearranjo de Mclafferty dos íons palmitato de etila (A) e estearato de metila (B).	65
Figura 29.	Fragmentação comum aos ésteres de ácido graxo e hidrocarbonetos.	66
Figura 30.	Pico base do íon butanolídeo.	67
Figura 31.	Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) da amostra HP-1 em acetona- d_6 .	69
Figura 32.	Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) da amostra HP-1 em acetona- d_6 .	70
Figura 33.	Estrutura básica de pterocarpanos e coumestanos	71
Figura 34.	Estrutura do pterocarpeno HP-1.	72
Figura 35.	Espectro de RMN de ^1H (A) e ^{13}C (B) da amostra HP-2 (400 MHz e 100 MHz, em piridina- d_5)	73
Figura 36.	Estrutura proposta para o composto HP-2	77
Figura 37.	Espectro de RMN de ^1H (A) e ^{13}C (B) da substância HP-3 (400 MHz, 100 MHz, em DMSO).	79
Figura 38.	Estrutura proposta para o composto HP-3.	81
Figura 39.	Espectro de RMN de ^1H (A) e ^{13}C (B) da amostra HP-4 (400 MHz e 100 MHz, em DMSO).	83
Figura 40.	Estrutura proposta para o composto HP-4	85
Figura 41.	(A) <i>H. petraeum</i> ; Teste realizado por Oliveira e colaboradores (2010), (B) <i>A. colubrina</i> e (C) <i>M. huberi</i> ; Da esquerda para direita MCE e MSE.	87

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AcOEt	Acetato de etila
CC	Cromatografia em coluna
CCD	Cromatografia em camada delgada
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
COSY	Homonuclear Correlation Spectroscopy
GC/MS	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa
<i>dd</i>	duplo duplete
<i>d</i>	duplete
δ	Deslocamento químico
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DMSO-d₆	Dimetilsulfoxido deuterado
EtOH	Etanol
G	Guaiacila
HMBC	Heteronuclear MultipleBond Coherence
HMF	Hidroximetil furfural
HPAc-A	<i>Hymenolobium petraeum</i> extrato acetato de etila coluna A.
HP	<i>H. petraeum</i>
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
Hz	Hertz
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento
LH-20	Sephadex LH-20
<i>m</i>	multiplicidade
MCA	Madeira para controle abiótico
MCE	Madeira com extrativos
MeOH	Metanol
MHz	megahertz
MSE	Madeira sem extrativos
<i>m/z</i>	Relação massa carga
[M]⁺	Pico do íon molecular
ESI-MS	Espectrometria de Massa por Ionização de Eletrospray

ppm	Partes por milhão
RMN de ^{13}C	Ressonância Magnética Nuclear de carbono
RMN de ^1H	Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio
S	Siringila
s	Simpleto
UV/visível	Ultravioleta visível

Estudo Químico e Biológico da Madeira de lei *Hymenolobium petraeum* (*Angelim pedra*)

Resumo:

Hymenolobium petraeum é uma espécie pertencente a família leguminosae e conhecida popularmente como angelim-amarelo, angelim-aroeira, angelim-pedra, angelim-vermelho e murarema. A madeira é muito utilizada na medicina popular na cura de úlceras, bem como na indústria madeireira para construção civil por sua alta durabilidade e resistência ao ataque de cupins, fungos e outros parasitas. Os extrativos em ciclohexano, acetato de etila e etanol foram avaliados segundo sua bioatividade, frente a larvas de *Aedes aegypti*. Apenas o extrato em acetato de etila apresentou uma significativa atividade larvicida. A total mortalidade das larvas foi observada nas concentrações (10, 100 e 250 ppm) deste extrato. Nele foram identificados alguns constituintes químicos, através de análises espectroscópicas, GC-MS, ESI-MS, ¹H-RMN e ¹³C-RMN uni e bidimensionais e em comparação com os dados da literatura. Os compostos identificados foram: palmitato de etila e estearato de metila, 1 pterocarpeno (HP-1) anidrotuberosina, 2 coumestanos: (HP-2) coumestrol e (HP-3) sophorocoumestano A e uma isoflavona impura (HP-4) daidzeina, todas descritas pela primeira vez nesta espécie. A composição química desta madeira foi quantificada sendo obtidos 52% de celulose e hemicelulose, 33,65% lignina total, 9,05% de extrativos e 0,8% de cinzas. A identificação de lignina foi determinada por análise elementar, RMN de ¹H e IV, sendo observado um conteúdo de 40% de unidades siringila e 60% de guaicila, típicos de madeiras folhosas. As substâncias isoladas no extrato em acetato de etila foram submetidas à atividade larvicida e constatou-se que (HP-1) causou a mortalidade de 71 ±8% das larvas na concentração de 100 ppm, 43 ±6% em 50 ppm e 18±2% em 10 ppm e (HP-4) apresentou 88 ±2% em 10 ppm e nas concentrações de 50 e 100 ppm a mortalidade foi total. A natural resistência desta madeira ao ataque de fungos da podridão branca foi avaliada utilizando-se, *Phanerochaete chrysosporum*, *Pycnoporus sanguineus*, *Schizophyllum commune*, *Lentinula edodes* e *Trametes vellosa*, e não foi observado crescimento de nenhum dos fungos testados tanto na madeira com extrativos como com a madeira livre de extrativos.

Palavra chave: *Hymenolobium petraeum*; lignina; flavonóides; *Aedes egypti*; fungos da podridão branca; resistência natural.

ABSTRACT

Hymenolobium petraeum is a species belonging to the family Leguminosae, known as angelim-amarelo, angelim-aroeira, angelim-pedra, angelim-vermelho and murarema. The wood is widely used in folk medicine in the healing of ulcers, as well as timber for construction for high durability and natural resistance to termites, fungi and other parasites. The extractives in cyclohexane, ethanol and ethyl acetate were evaluated for their bioactivity against larvae of *Aedes aegypti*. Only the ethyl acetate extract showed significant larvicidal activity. The extract at the concentrations of (10, 100 and 250 ppm) caused the mortality of 100% of larvae. The chemical constituents of this extract have been identified through spectrometric and spectroscopic analysis, GC-MS, ESI-MS, ¹H-NMR and ¹³C-NMR and in comparison with literature data. The compounds were identified: ethyl palmitate and methyl stearate, one pterocarpene, anhydrotuberosin (HP-1), two coumestans, coumestrol (HP-2) and sophorocoumestan A (HP-3) and one impure isoflavone, daidzein (HP-4). All these substances are described for the first time in this species. The chemical composition of wood was evaluated and is composed of 52% cellulose and hemicellulose, 33.65% total lignin, 9.05% extractives and 0.8% of ash. The chemical composition of lignin was determined by elemental analysis, ¹H-NMR and IR and was observed that this wood has a content of 40% of syringyl and 60% of guaicyl units, typical of hardwoods. The substances isolated in the ethyl acetate extract were subjected to larvicidal activity and was found that the pterocarpene (HP-1) caused the mortality of $71 \pm 8\%$ of the larvae at a concentration of 100 ppm, $43 \pm 6\%$ to 50 ppm and $18 \pm 2\%$ to 10 ppm. The (HP-4) caused the death of $88 \pm 2\%$ of the larvae at 10 ppm and that at concentrations of 50 ppm and 100 ppm the mortality was total. The natural resistance of wood to attack by white rot fungi was evaluated using, *chrysosporum Phanerochaete*, *Pycnoporus sanguineus*, *Schizophyllum communee*, *Lentinula edodes* and *Trametes Velloso*, and no growth was observed in any of the fungi tested in both the wood extractives and free extractives.

Keyword: *Hymenolobium petraeum*; lignin; flavonoid; *Aedes egypti*; white rot fungi; natural resistance.

1 INTRODUÇÃO

Considerada um importante produto comercial, a madeira apresenta grande diversidade de aplicações, sendo matéria-prima para geração de energia, produção de papel, indústria moveleira, construção civil, meios de transportes (barcos, carroçarias, vagões de trem e dormentes), instrumentos musicais, artigos esportivos, entre outros. Apesar da importância econômica da madeira, os processos que levam ao seu desenvolvimento e muitos de seus aspectos bioquímicos e moleculares são ainda pouco conhecidos¹. Uma importante característica que a madeira apresenta é a alta ou baixa susceptibilidade a uma série de fatores bióticos e abióticos, tais como a composição da microbiota do solo, as condições climáticas e as características físicas e químicas da madeira².

Os agentes degradadores bióticos são: insetos, fungos, bactérias e microrganismos, ou seja, os organismos xilófagos em geral, enquanto que os abióticos são: chuvas, ventos e radiação solar, as chamadas intempéries³.

A propriedade que a madeira apresenta de resistir ao ataque dos agentes deterioradores sem um prévio tratamento é chamada de **resistência natural** (ou durabilidade natural).

A durabilidade natural das madeiras é conferida por dois componentes principais: O primeiro são os metabólitos secundários, que na maioria das vezes se apresentam em pequenas proporções e possuem baixo peso molecular, mas podem, em algumas espécies, atingir valores bastante elevados como os encontrados por Oliveira e Della Lucia⁴, ao determinarem os teores de extrativos de 27 espécies de madeiras. Esses componentes são denominados **extrativos**. O segundo componente é a **lignina**, biopolímero de grande abundância nos vegetais sendo encontrado, sobretudo na madeira e que também confere resistência ao ataque de organismos xilófagos, influenciando significativamente a durabilidade natural da madeira⁵⁻⁶. A lignina e a celulose são responsáveis pela resistência física (sustentação) das plantas.

¹ Plomion, C.; *et al.*; *Plant Physiology* **2001**, 127: 1513-1523.

² Trevisan, H.; *et al.*; *Floresta* **2008**, 38, 1: 33-40.

³ Pastore, T. C. M.; *et al.*; *Quim. Nova* **2008**, 31, 8: 2071-2075.

⁴ Oliveira, J. T. S.; Della Lúcia, R. M.; *Sociedade de Investigações Florestais*, Bol. Técnico 9, **1994**, 5p.

⁵ Syafh, W.; *et al.*; *Bulletin of Tokyo University Forest*, **1988**, 80: 69-77.

Os fatores que afetam a velocidade da deterioração da madeira são a umidade e a temperatura. A degradação da madeira é maior em áreas quentes e úmidas que favorecem a deterioração biológica⁷, resultante da atividade de organismos xilófagos, bem como dos fatores climáticos⁸.

Madeiras com resistências químicas e biológicas são chamadas de **madeira de lei**. A expressão madeira de lei tem origem em uma lei do período Colonial em que madeiras destinadas a construção naval era protegidas por lei, ou “ordenações do reino” e por decretos dos governadores⁹. Apesar do termo ser muito utilizado no Brasil, não existe uma definição técnica. Esta expressão é ainda hoje sinônimo da madeira de construção, civil e naval, ou seja, conforme o dicionário Aurélio¹⁰: "madeira dura ou rija, própria para construções e trabalhos expostos às intempéries". De modo geral, pode-se dizer que madeira de lei é um material resistente utilizado para a construção civil e outras áreas, apresentando baixa suscetibilidade ao ataque de organismos xilófagos (fungos, bactérias e cupins).

1.1 Definição da Madeira

Conforme Petrucci (1979), a madeira é um produto vegetal proveniente do lenho dos vegetais superiores, árvores e arbustos¹¹. A madeira é um material heterogêneo de composição complexa, onde predominam as fibras de celulose, hemicelulose e lignina¹². Ela é responsável por desempenhar funções como: condução de seiva e substâncias nutritivas, transformação, armazenamento e sustentação do vegetal.

⁶ Tuomela, M.; *et al.*; *A review. Bioresource Technology* **2000**, 72: 169-183.

⁷ Simpson, W.; Wolde, A.; *Wood Handbook-Wood as an engineering material*; Department of Agriculture, Forest Service **1999**, 463 p.

⁸ Schmitt, U.; *et al.*; *Holz als Roh und Werkstoff* **2005**, 63: 118-122.

⁹ Gonzaga, A. L.; *Madeira: Uso e conservação*; IPHAN/Monumenta; Caderno técnico - 6, Brasília-DF, **2006**, 39 p.

¹⁰ Ferreira, A. B. de H.; *Novo Dicionário da Língua Portuguesa*. 2. ed. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, **1986**, 755p.

¹¹ Petrucci, E. G. R.; *Materiais de Construção*. 4 ed., Porto Alegre, **1979**.

¹² Barrichelo, L. E. G.; Britto, J. O.; *Química da madeira - Manual Didático*. Centro Acadêmico “Luiz de Queiróz”, USP – Piracicaba, **1989**.

As árvores são plantas superiores de elevada complexidade anatômica e fisiológica e podem ser classificadas em Gimnosperma e Angiosperma¹³. As diferenças fundamentais entre esses grupos devem-se a tipos, tamanhos, proporções e arranjo das diferentes células que as compõem. As madeiras moles (softwoods), ou de coníferas principal classe pertencente ao grupo das gimnospermas, apresentam como características distintivas a folhagem na forma de agulha e a ausência de frutos (sementes descobertas). As madeiras duras (hardwoods), ou folhosas, pertencem ao grupo das angiospermas dicotiledôneas, que apresentam como características distintivas folhas largas e sementes encerradas em frutos¹⁴.

1.2 Anatomia da madeira

O tronco apresenta camadas de crescimento que se dispõem em arranjos concêntricos, os chamados anéis de crescimento. A figura 1 mostra do centro para a periferia, respectivamente, a medula, o cerne, o alburno e a casca.

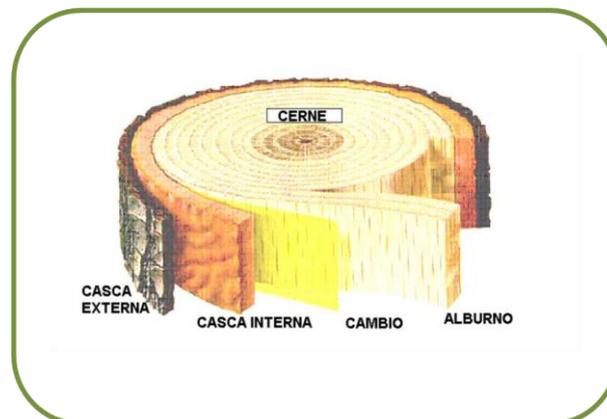


Figura 1. Representação da anatomia do tronco de uma árvore.

O alburno é a região do xilema que conduz água e sais minerais, armazena substâncias de reserva e colabora na sustentação¹⁵. O cerne, por sua vez, é a região do xilema que apresenta como principal função a sustentação e defesa química. A

¹³Miller, R.B.; *Wood Handbook-wood as an engineering material*. Department of Agriculture, **1999**, Cap. 1.

¹⁴ Rowell, R. M.; *Handbook of Wood Chemistry and Wood Composites*, 1 ed., CRC Press: Madison, **2005**.

¹⁵ Wiedenhoeft, A. C., Miller, R. B.; *In Handbook of wood chemistry and wood composites*. Washington, **2005**, 9-33 p.

cernificação é o processo de transformação do alburno em cerne. Essa transformação é geralmente acompanhada pelo aumento no conteúdo de extrativos, substâncias comumente armazenadas pelo cerne e que são conhecidas por contribuir para a durabilidade natural das madeiras¹⁶. Os extrativos alteram a coloração do cerne dando a ele uma cor característica, que é variável nas diferentes madeiras e conferem maior resistência à biodeterioração. Porém, não é comum a todas as plantas que o cerne se diferencie do alburno por uma coloração¹⁷.

1.3 Composição química

A madeira é composta principalmente por celulose, polioses (hemicelulose) e lignina e em menor quantidade estão os extrativos e as substâncias minerais que constituem o material inorgânico. As proporções e composições das madeiras variam de acordo com os grupos aos quais elas pertencem (gimnosperma e angiosperma), bem como, famílias e gêneros botânicos além das condições climáticas e do solo¹³.

1.3.1 Celulose e hemicelulose

A celulose é o principal componente das madeiras, compreende cerca de 40 a 50% do material biológico. É um polímero linear constituído unicamente por moléculas de D-glucose unidas entre si através de ligações glicosídicas do tipo β (1 \rightarrow 4), que resultam da perda de uma molécula de água¹⁸. A celulose (figura 2) é responsável pela maioria das propriedades físicas, químicas e mecânicas. A cristalinidade do polissacarídeo associada ao alto grau de polimerização, bem como o grande número de ligações de hidrogênio e a forte interação entre as moléculas da celulose são os principais responsáveis pela alta resistência das fibras de celulose nas madeiras¹⁹.

¹⁶ Oliveira, L. S.; *et al*; *International Biodeterioration & Biodegradation* **2010**, 64, 8: 711-715.

¹⁷ Burger, L.M.; Richter, H.G.; *Anatomia da madeira*, Nobel, São Paulo, **1991**, 154 p.

¹⁸ Fengel, D.; Wegener, G.; *Wood Chemistry, Ultrastructure and Reactions*, 1 ed., Walter de Gruyter: Berlin, **1989**.

¹⁹ Pandey, K. K.; *Journal of Applied Polymer Science* **1999**, 71, 12: 1969-1975.

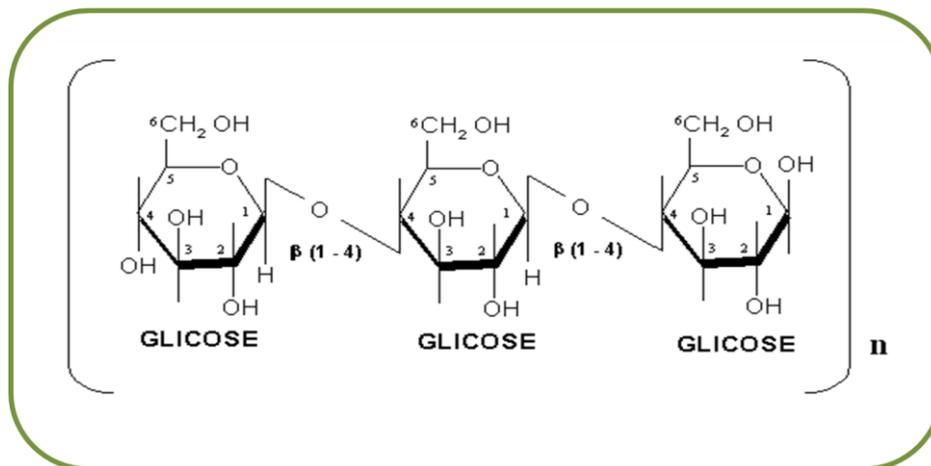


Figura 2. Polímero da celulose

Diferentemente da celulose que apresenta como unidade fundamental exclusivamente a β -D-glucose, as hemiceluloses são polímeros cuja composição pode ser formada, em proporções variadas, de diferentes unidades de açúcares ligados por condensação, como apresentado na Figura 3¹⁸.

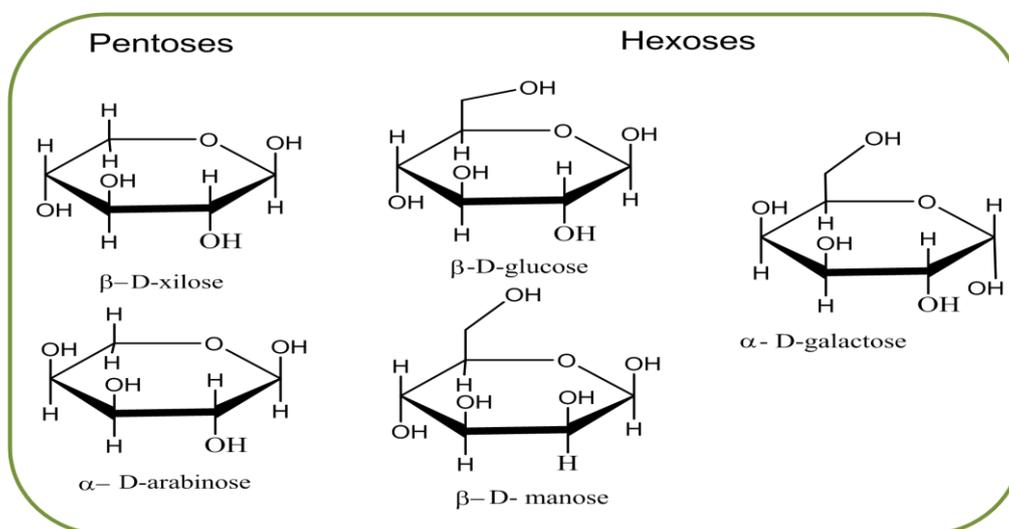


Figura 3. Unidades de açúcares das hemiceluloses¹⁸.

As hemiceluloses também se distinguem da celulose em relação ao peso molecular, a baixa polimerização, a não produção de fibras e a ausência de regiões cristalinas⁹. Elas compõem cerca de 20 - 30% do tecido das folhosas. Na Figura 3, observa-se a existência de algumas unidades monoméricas com apenas cinco átomos de carbono. Estas são denominadas pentoses, enquanto que as hexoses são monômeros com seis

átomos de carbono. Assim, os polímeros formados pela condensação de pentoses são chamados de **pentosanas** e os polímeros formados pela condensação de hexoses são as **hexosanas**²⁰.

As mais importantes misturas complexas de polissacarídeos encontradas nas hemiceluloses são: glucoxilanas, arabinoglucoxilanas, glucomananas, arabinogalactanas e galactoglucomananas. Xilanos e glucoxilanos são considerados os maiores componentes das madeiras de angiospermas, chegando a compor 30% da parede celular das mesmas. Em menores proporções são encontradas as glucomananas (2 -5%). Nas madeiras de gimnospermas, por sua vez, são encontradas diversas hemiceluloses, sendo a galactoglucomanana (aproximadamente 20%) considerado o principal componente seguido de glucuronoarabinoxilana (5-10%)¹⁴.

1.3.2 Lignina

A palavra lignina foi introduzida por Schultz, em 1865. Tem origem do latim *lignum* que significa madeira²¹. A lignina é um polímero amorfo, predominantemente aromático (fenólico), altamente complexo, que tem como principais funções dar suporte mecânico e rigidez adicional para a parede celular, tornando-a hidrofóbica, impermeável e resistente. A lignina também está envolvida nos mecanismos de defesa contra microorganismos²².

A lignina foi descoberta por Anselme Payen em 1838. Ele observou que a madeira quando tratada com ácido nítrico concentrado perde uma parte de suas substâncias deixando um resíduo sólido e fibroso que ele chamou de celulose. Após um tempo Payen percebeu que além da celulose, outro polímero havia sido isolado do tratamento com ácido, esse material apresentava maior teor de carbono que o resíduo fibroso, porém só em 1865, foi denominada lignina por Schultz²¹.

O primeiro relato do uso de ácido sulfúrico na determinação quantitativa de lignina foi realizado por Peter Klason em 1897^{20;23}. Embora o procedimento tenha sofrido inúmeras modificações desde que foi proposto, ainda permanece essencialmente

²⁰ Morais, S. A. L. de; Nascimento, E. A. do; Melo, D. C. de ; *R. Árvore* **2005**, 29, 3:461-470.

²¹ Sjöstrom, E.; *Wood Chemistry: Fundamentals and applications*. London: Academic Press, **1981**.

²² Boudet, A.M.; *Plant Physiology and Biochemistry* **2000**, 38, 81-96.

²³ Busche, L. R.; *Doctor's Dissertation*; The Institute of Paper Chemistry, Appleton-Wisconsin, **1960**.

inalterado. A hidrólise da madeira com ácido sulfúrico 72% ficou conhecida por **lignina de Klason**.

Por muito tempo a lignina foi comparada com a celulose, que é um composto puramente alifático. Os motivos principais para tal comparação são: a lignina apresentava-se na madeira em grande quantidade como a celulose; a estrutura de muitas substâncias presentes na madeira como, celulose, proteínas, entre outros, já haviam sido eluciadas e apresentavam-se como polímeros alifáticos; e o tratamento para obtenção da lignina era o mesmo utilizado na determinação da celulose. Assim, a lignina foi considerada como um composto alifático, isto é, sua unidade estrutural não deveria conter anéis aromáticos como é conhecido atualmente²⁴.

A primeira análise que iniciou a descoberta da estrutura da lignina foi realizada por Lange em 1944, através de espectroscopia de ultravioleta. Lange usou uma técnica especial para obtenção de fotomicrografias a 280 nm, comprimento de onda que pertence ao ultravioleta próximo, a partir de cortes finos da madeira. Neste comprimento de onda a celulose e os outros compostos alifáticos não apresentam absorção, enquanto que os compostos aromáticos, entre eles a lignina, apresentavam fortes absorções²⁴. Em 1950, Kratzl e colaboradores estudaram a lignina "in situ", através de seções finas de madeira, por espectroscopia diferencial no infravermelho, e demonstraram claramente que lignina "in situ" é uma substância aromática²³. A hipótese da formação de lignina, por unidades fenilpropanóides, foi sugerida por Harris e colaboradores quando a lignina tratada com metanol seguida por hidrogenólise a alta pressão fornece unidades de propilciclohexano. Os estudos de oxidação e etanólise de Hibbert e colaboradores demonstraram a construção das ligninas de coníferas, principalmente a partir de monômeros guaiacila (G), enquanto ligninas das madeiras de folhosas são compostas principalmente por unidades guaiacila (G) e siringila (S)¹⁸.

O processo biosintético da lignina é derivado de três álcoois p-hidróxi-cinâmicos como precursores principais: álcool cumarílico, álcool coniferil e álcool sinapílico (figura 4). Dependendo do grau de metoxilação têm-se como unidades básicas o p-hidróxifenil derivado do álcool p-cumarílico não metoxilado, o guaiacil derivado do

²⁴ McCarthy, J. L.; Islam, A.; *Lignin Chemistry, Technology, and Utilization: A Brief History*, American Chemical Society, 2000. Cap. 1, 2–99 p.

álcool coniferílico com uma metoxila e o siringil derivada do álcool sinapílico com duas metoxilas (figura 4)¹⁸.

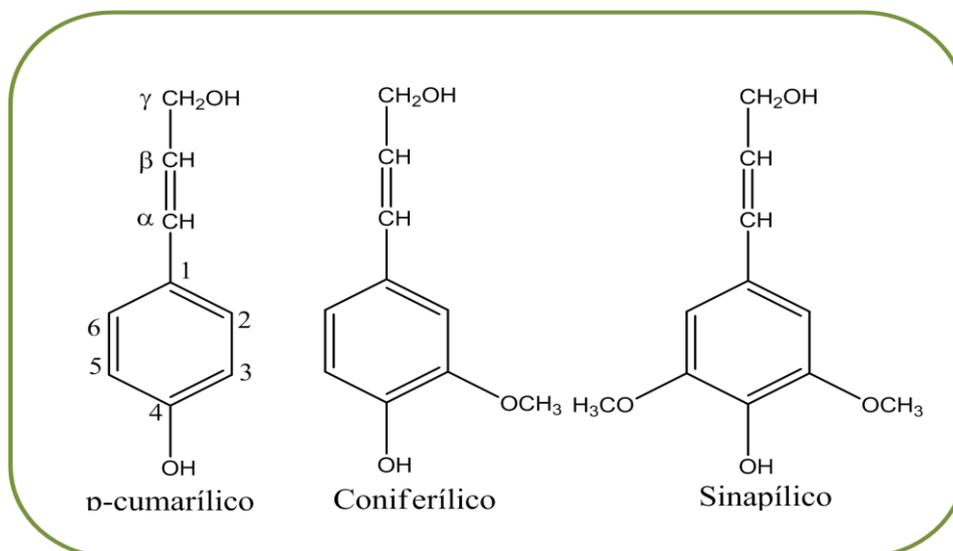


Figura 4. Alcoóis precursores da lignina

A determinação da estrutura da lignina foi proposta inicialmente por Freudenberg e Neish, em 1968. Eles obtiveram a estrutura a partir da junção de dados analíticos existentes até o momento, com os resultados da reação de polimerização desidrogenativa do álcool coniferílico²⁵. Em 1981, Glasser e Glasser²⁰ propuseram um esquema de uma estrutura de lignina de madeiras de coníferas. Eles utilizaram varias ferramentas analíticas, desde análise elementar, determinação de grupos funcionais por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear - RMN de ^1H , espectrometria de massa até cromatografia de permeação em gel - CPG. Também realizaram determinação de açúcares e cinzas e reação de oxidação com permanganato. Os resultados foram associados aos dados da literatura, bem como, simulações por computador dos modos possíveis de acoplamento dos radicais e dos derivados do álcool cinamílico, isto possibilitou a formulação de um esquema para a estrutura dessas ligninas²⁵. A figura 5 ilustra uma possível estrutura de lignina da madeira de coníferas de acordo com Adler 1977²¹. Ao contrário de outros polímeros naturais, esta macromolécula apresenta varias ramificações que se entrecruzam umas com as outras, conferindo-lhe particular resistência a diferentes agentes químicos, físicos e biológicos.

²⁵ Saliba, E. de O. S.; *et al*; *Ciência Rural* **2001**, 31,5:917-928.

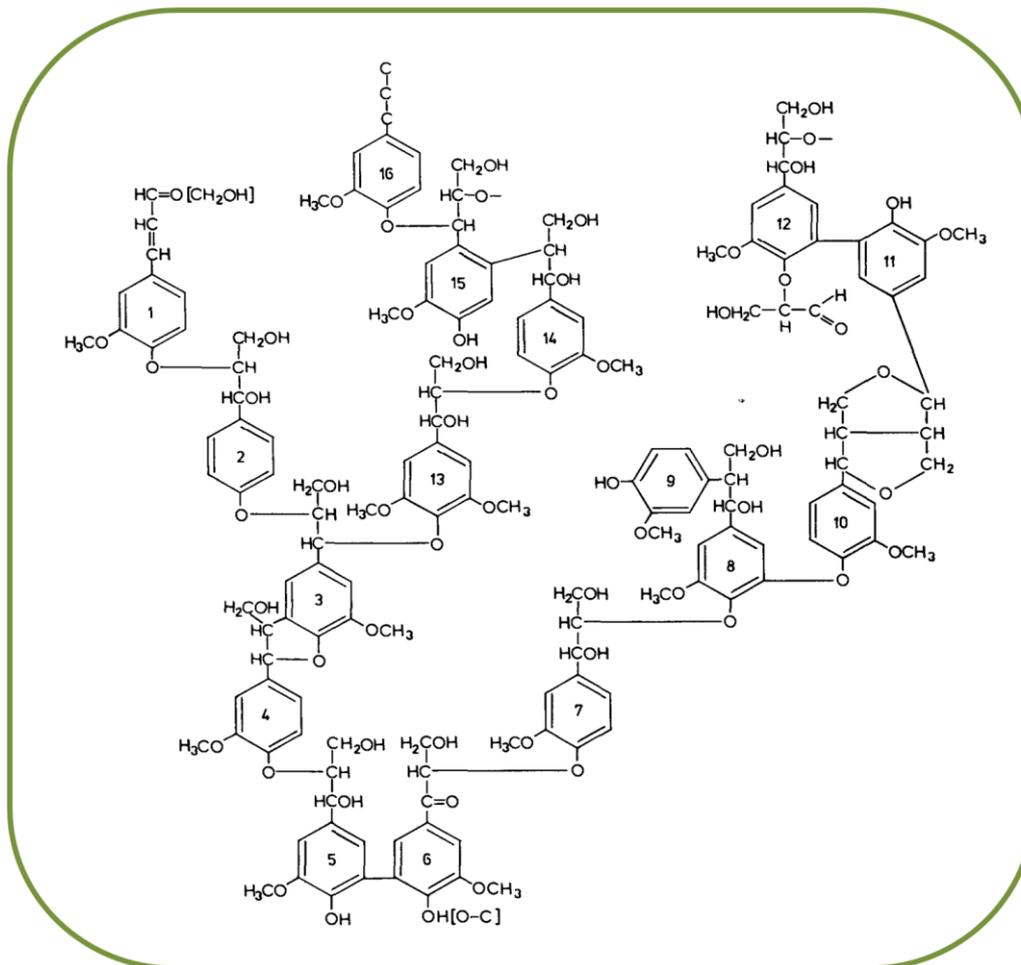


Figura 5. Estrutura da lignina de madeiras de coníferas segundo Adler 1977²¹.

A resistência da lignina aos agentes biológicos está relacionada a sua alta indigestibilidade e proteção contra patógenos, isto é, o processo de mudança na rigidez e reforço da parede celular está relacionado a efeitos ambientais e respostas a infecções²².

A lignina forma uma barreira ao redor das microfibrilas de celulose e das hemiceluloses na parede celular, fazendo com que sua presença represente uma barreira que os fungos devem remover ou modificar para ter acesso aos demais polímeros²⁶. Algumas hipóteses têm sido propostas para explicar a ação inibitória da lignina na digestibilidade dos carboidratos na parede celular. Patton e Gieseker (1942) relataram três possíveis causas: pela incrustação; por ligações químicas formando compostos

²⁶ Morrison, I.M.; *Phytochemistry* **1973**, 12, 2979.

indesejáveis; e por inibição local das enzimas, devido à ação tóxica dos grupos fenólicos proveniente da degradação parcial da lignina²⁷. A elevada indigestibilidade da lignina esta associada ao aumento da concentração dos compostos fenólicos à medida que a planta amadurece, assim, a lignina é um dos componentes da madeira mais relacionado a resistência contra microorganismos²⁸.

A lignina compõe cerca de 20-35% do peso seco dos vegetais, estando em menor quantidade nas angiospermas (18 a 25%) e em maior quantidade nas gimnospermas (25 a 35%)¹⁴. A estrutura da lignina, diferentemente da estrutura dos polímeros naturais, é formada pelas unidades fenilpropanóides ligadas por ligações éter e carbono-carbono, proporcionando uma estrutura rígida e compacta insolúvel em água, denominada de cimento natural¹⁸.

Apesar de todos os estudos realizados até hoje sobre lignina, muitos pontos, relativos principalmente à sua estrutura e seu comportamento na planta, permanecem obscuros. O principal motivo está na grande diversidade da estrutura das ligninas, uma vez que a lignina apresenta diferentes precursores e várias maneiras de se ligar, quando se passa de uma espécie vegetal para outra ou, até mesmo, dentro da mesma espécie, quando são analisadas partes diferentes do vegetal.

1.3.3 Extrativos

A expressão “extrativos” é muito utilizada para definir substâncias químicas presentes na madeira que podem ser extraídas usando diferentes tipos de solventes¹³. Eles estão frequentemente associados a propriedades como cor, cheiro e sabor, bem como relacionados às atividades inibidoras ou tóxicas, servindo como preservantes naturais ao ataque de insetos, à colonização e deterioração por fungos²⁹. Os extrativos são constituídos por substâncias de baixa massa molar envolvidas no metabolismo das plantas, por isto, também chamado de **metabólitos secundários**¹⁵. Quimicamente, consistem em compostos aromáticos, ceras, ácidos graxos e resinas, entre outros. Em geral, compreendem de 2 a 10% da massa total em base seca, sendo esse percentual

²⁷ Patton, A.R.; Gieseke, L.; *J. Anim. Sci.* **1942**, 1, 22.

²⁸ Fahey, J. G. C.; McLaren, G. A.; Williams, J. E.; *Journal of Animal Science* **1979**, 48, 4: 941.

²⁹ Schultz, T.P.; Nicholas, D.D.; *Phytochemistry* **2000**, 54: 47-52.

geralmente maior para as espécies de folhosas que para as coníferas³⁰⁻³¹. Os teores de extrativos variam dependendo das espécies, das condições de crescimento e da idade da árvore¹³. Os extrativos ocorrem na casca, folhas, flores, frutos e sementes, e quase sempre as quantidades nessas partes da árvore são proporcionalmente maiores que na madeira³².

Muitos estudos relacionam a resistência das plantas contra os organismos xilófagos (fungos, bactérias e cupins) aos extrativos. Deon e colaboradores (1980) realizaram o estudo dos extrativos de seis espécies tropicais através de testes com duas espécies de fungos causadores da podridão parda e outras duas de podridão branca⁴. O estudo indicou que a durabilidade natural da maioria das madeiras pode ser atribuída aos extrativos. Schultz et al.³² (1995) buscaram identificar os componentes responsáveis pela resistência ao apodrecimento do cerne de *Maclura pomifera*, uma folhosa dos Estados Unidos. Os autores concluíram que a elevada durabilidade dessa madeira é conferida por altas quantidades de compostos como oxiresveratrol e diidromorina (figura 6)³³.

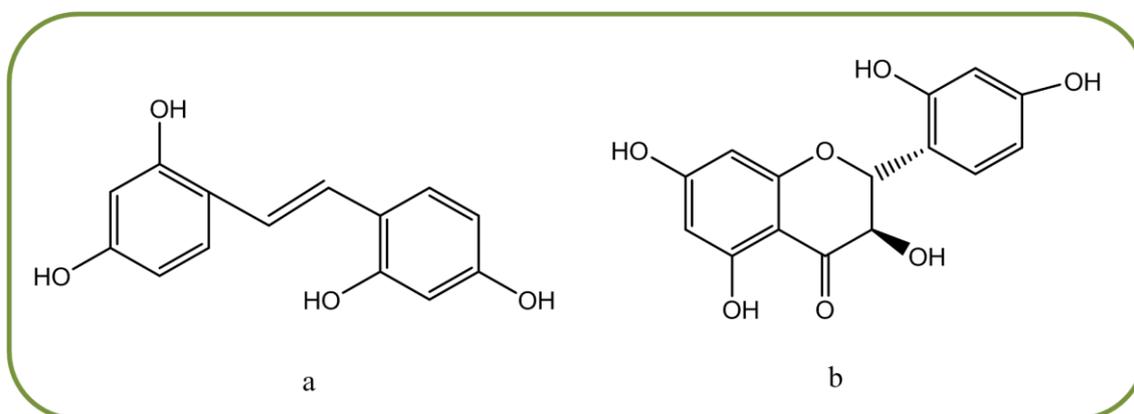


Figura 6. Oxiresveratrol (a) e Diidromorina (b).

³⁰ Ramos, L. P.; *Quím. Nova* **2003**, 26, 6: 863-871.

³¹ Philipp, P.; D'Almeida, M. L. O.; *Celulose e papel: Tecnologia de fabricação da pasta celulósica*, 2 ed., IPT: São Paulo, **1988**.

³² Klock, U.; *et al*; *Química da madeira*, Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Agrárias, Departamento de Engenharia e Tecnologia Florestal, 3 ed., **2005**.

³³ Shultz, T. P.; *et al*; *Holzforschung* **1995**, 49, 1: 29-34.

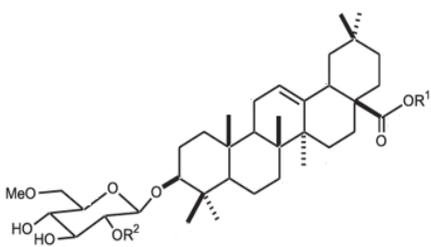
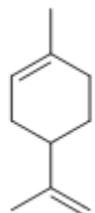
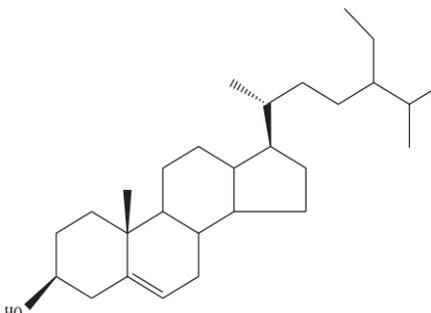
Um estudo anteriormente realizado por Wang e colaboradores (1984) utilizando a mesma madeira, também evidenciou os efeitos dos extrativos na resistência ao apodrecimento dessa espécie. Os pesquisadores constataram que a perda de massa e a redução da resistência da madeira a quatro espécies de fungos apodrecedores, após a extração com benzeno, metanol e água, indicaram a resistência de certos extrativos ao crescimento desses fungos⁴. Em 2000 Onuorah publicou um estudo usando duas madeiras pertencentes à família *Fabaceae*. Ele destaca que os extrativos presentes em *Cassia fistula* e *Afzelia sp.* possuem atividade inibidora contra fungos e insetos e caracteriza suas madeiras como muito duráveis³⁴. De acordo com Luna et al. (2005) os extrativos isolados de *Caesalpinia echinata*, árvore nativa do Brasil conhecida como pau-brasil, possuem atividade inseticida, matando larvas do mosquito *Aedes aegypti*, e moluscicida, impedindo o desenvolvimento de ovos de *Biomphalaria glabrata*³⁵. Oliveira e colaboradores (2010) analisando a influência dos extrativos e da lignina na biodeteriorização de madeiras observaram que algumas madeiras consideradas resistentes, quando tinham seus extrativos removidos, mantinham-se resistentes ao ataque do fungo da podridão branca *Phanerochaete chrysosporum*, ao contrário das madeiras de baixa resistência¹⁶. Este trabalho comprova que não apenas os extrativos, mas a lignina também tem papel preponderante na defesa das madeiras ao ataque de organismos xilófagos.

São várias as classes de extrativos e as atividades relacionadas a elas. Na tabela 1 estão ilustradas algumas substâncias isoladas, a classificação química a qual essas substâncias pertencem, a espécie, a família e as atividades biológicas.

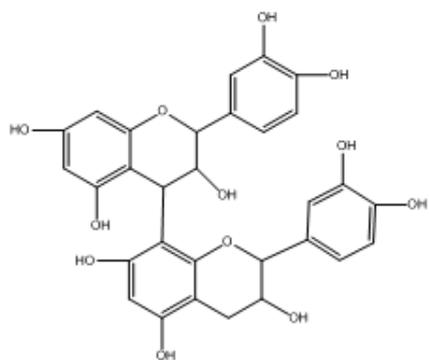
³⁴ Onuorah, E.O.; *Bioresource Technology* **2000**, 75:171-173.

³⁵ Luna, J.S.; *Journal of Ethnopharmacology* **2005**, 97: 199-206.

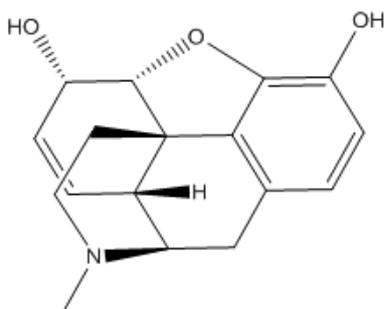
Tabela 1. Compostos isolados de extratos de plantas e suas respectivas atividades biológicas.

Estrutura do extrativo	Classe de metabolitos secundários	de Botânica	Atividade biológica*
 <p>1 R¹ glicose 2 H R² H glicose</p> <p>(1) 3-O-b-D-(6'-metil)-glicopiranosil-olean-28-oato de b-glucopiranosila</p>	Saponina triterpênica	<i>Swartzia langsdorffii</i> ³⁶⁻³⁷ (Fabaceae)	Atividade antimicrobiana, antifúngica, moluscicida e citotóxica ³⁶⁻⁴⁵
 <p>(2) Limoneno</p>	Terpenos (monoterpeno)	<i>Psidium guajava</i> L (Myrtaceae) ³⁸	Antioxidante ³⁹ , incitocida e larvicida ³⁷ .
 <p>(3) β -sitosterol</p>	Esteróides	<i>Marrubium vulgare</i> L (Labiatae); <i>Aleurites moluccana</i> L. Willd. (Euphorbiaceae) ⁴⁸	Antiinflamatório, analgésico, antifúngica e larvicida ⁴⁰ .

³⁶ Dubois, J. L.; Sneden, A. T.; *J. Nat. Prod.* **1996**, 59, 902.³⁷ Marqui, S. R. de L; *Quim. Nova* **2008**, 31, 4: 828-831.³⁸ Joseph, B.; Priya, R.M.; *Res. J. Med. Plant* **2011**, 5: 432-442.³⁹ Souza, T. J. T., et al; *Brazilian Journal of Pharmacognosy* **2007**, 17, 3: 368-372.⁴⁰ Filho, V. C.; *Química Nova* **2000**, 23, 5: 680-685.

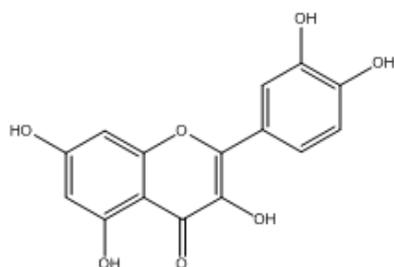


(4) Epicatequina (dímero)

Tanino
condensável*Phyllanthus
niruri*⁴¹
(Euphorbiaceae)Hemostático,
antiviral,
antidiarréico e
cicatrizante^{35:49}.

(5) Morfina

Alcalóides

*Papaver
somniferum*
(Papaveraceae)⁴².Hipnoanalgésico,
analgésico e
antitússico⁴².

(6) Quercetina

Flavonóides

*Bauhinia
splendens* HBK
(Leguminosae)⁴⁸.Analgésicos,
antibactericidas,
antioxidante e
cupincida⁴³.

*As atividades são, na grande maioria, do extrato da planta; poucas são do composto isolado.

As saponinas (1), também chamadas saponosídeos, derivados dos triterpenos tetracíclicos e esteróides, apresentam como características principais: a capacidade de diminuir a tensão superficial de uma solução aquosa, assemelhando-se a um detergente⁴⁴; a presença de uma porção hidrofílica (cadeia de açúcar) e hidrofóbica (esteróides lipofílicos ou triterpênicos) na estrutura química fornece a característica de

⁴¹ Calixto, J.B.; *et al*; *Medicinal Research Review* **1998**, 18: 225-258.

⁴² Brossi, A.; *The alkaloids*; United Kingdom edition, academic press London, **1986**, v. 29.

⁴³ Santana, A.L.B.D.; *et al*; *International Biodeterioration & Biodegradation* **2010**, 64:7-12.

⁴⁴ Harbone, J.B.; Baxter, H.; *Phytochemical dictionary: a handbook of bioactive compounds from plants*. Taylor & Francis, London, **1995**.

anfifilicidade. As saponinas possuem atividades biológicas diversas, como atividade antiinflamatória, analgésica, expectorante, antioxidante, espermicida, antiviral e antifúngica⁴⁵.

Os Terpenos (2) são hidrocarbonetos acíclicos ou cíclicos. São derivados do produto da condensação de duas ou mais moléculas de isopreno, podendo ser classificados de acordo com o número de unidades isoprênicas como: monoterpenos (C₁₀), sesquiterpenos (C₁₅), diterpenos (C₂₀), sesterpenos (C₂₅), triterpenos (C₃₀) e carotenoides (C₄₀)⁴⁶. Os óleos essenciais são formados principalmente por terpenos, estes por sua vez são responsáveis por importantes atividades biológicas, como: antioxidação, antibacteriana e antifúngica⁴⁷.

Os esteróides (3) são derivados cíclicos do isopreno, compostos complexos que possuem anéis de 5 a 6 átomos de carbono. Formam uma importante classe de compostos medicinais, à qual pertencem os hormônios, certas saponinas e alguns alcalóides. O esteróide mais comum na madeira é o β -sitosterol, que aparece na forma livre ou ligado a um açúcar, formando um glicosídeo⁴⁶. Tanto os terpenos como os esteróides apresentam atividade inseticida, repelente, fungicida, larvicida entre outros⁴⁷.

Na composição dos extrativos o maior percentual é dos compostos fenólicos, estes por sua vez apresentam-se como diferentes grupos químicos. Os taninos (4), por exemplo, são materiais polifenólicos complexos distribuídos nas plantas e são muito reativos quimicamente. Estes compostos são facilmente oxidáveis, tanto através de enzimas vegetais específicas quanto por influência de metais, como cloreto férrico, o que ocasiona o escurecimento de suas soluções⁴⁸. Tem reconhecida função inibidora de fungos, bactérias e insetos⁴⁹. De maneira geral, os taninos podem ser divididos em dois grupos: os gálicos ou hidrolisáveis e os catequínicos ou condensáveis. A diferença entre os dois está na estrutura química de origem, ou seja, os taninos hidrolisáveis são derivados do ácido gálico e ácido elágico ligados por um resíduo de glucose, enquanto

⁴⁵ Vincken, J. P.; *et al*; *Phytochemistry* **2007**, 68: 275-297.

⁴⁶ Dewick, P. M.; *Medicinal Natural Products: A biosynthetic Approach*. 3 ed., John Wiley and Sons, Ltd, **2009**, p. 187.

⁴⁷ Souza, T. J. T.; *et al*; *Brazilian Journal of Pharmacognosy* **2007**, 17, 3: 368-372.

⁴⁸ Mello, J. P. C.; Santos, S. C.; *Em Farmacognosia: da planta ao medicamento*; Simões, C. M. O.; Schenckel, E. P., orgs.; 3 ed., Ed. UFSC: Porto Alegre, **2001**.

⁴⁹ Pansera, M. R.; *et al*; *Rev. Bras. Farmacogn.* **2003**, 13, 1:17-22.

que os taninos condensáveis ou proantocianidinas são derivados da catequina ou leucocianidina (flavonóides) e formam todos os demais taninos⁴⁴.

Os alcalóides (5) são o grupo de metabólitos secundários onde existe maior diversidade estrutural, sendo conhecidos mais de 5000 compostos, a maior parte deles provenientes de plantas, embora também tenham sido encontrados alcalóides em fungos e em animais, incluindo os mamíferos. É um grupo heterogêneo de substâncias orgânicas, cuja similaridade molecular mais significativa é a presença de nitrogênio na forma de amina (ou raramente, amida)⁵⁰. Com elevada ação fisiológica, muitos alcalóides são utilizados para produção de fármacos como taxol ou vinblastina (antitumoral), tubocurarina ou coniina (anestésico), cafeína ou nicotina (estimulantes), codeína (antitussígenos) e quinina ou sanguinarina (toxinas e antibióticos). Na tabela 1 está ilustrado o alcalóide isolado do ópio conhecido como morfina⁵¹.

Os flavonóides (6) são compostos polifenólicos constituído de estrutura básica contendo 15 átomos de carbono representados por $C_6C_3C_6$. Os flavonóides estão presentes em todas as partes das plantas, incluindo folhas, raízes, madeira, cascas, pólen, néctar, flores, bagos e sementes, e são responsáveis por muitas ações nas plantas, como proteção contra a incidência de raios UV e visível, proteção contra insetos, fungos, vírus e bactérias e atividade antioxidante³⁵. A quercetina (tabela 1) é um flavonóide muito comum, que já foi isolado de varias plantas e com excelente atividade biológica⁵².

1.4 Atividade biológica

A busca por novos produtos com atividade biológica existe desde os primórdios da humanidade. O desejo de encontrar a cura para doenças como o câncer, AIDS, doenças infecciosas causadas por fungos e bactérias, ou ainda encontrar substâncias que combatam a proliferação dos causadores das doenças como a dengue e a malária são o foco de estudo de muitos pesquisadores de produtos naturais. Outro motivo para identificar substâncias com atividade biológica está na necessidade de encontrar formas

⁵⁰ Costa, A. F.; *Farmacognosia*; Fundação Calouste Gulbennkian, Lisboa, 4 ed, **1994**, v. 2.

⁵¹ Harbone, J.B.; *Phytochemical Methods: A guide to modern techniques of plants analysis*. Chapman and Hall, London, **1973**.

⁵² Grayer, R. J.; Kokubum, T.; *Phytochemistry* **2001**, 3, 56: 253-263.

de controlar a proliferação de pragas, fungos, cupins, entre outros, em materiais utilizados comercialmente.

Um grande número de bioensaios é utilizado para testar tanto extratos de plantas quanto os compostos isolados. As atividades variam dependendo do objetivo da pesquisa e incluem atividade antifúngica, moluscicida, anticancerígena, antimicrobiana, antitermítica, entre outras^{35;36;37;38;40;49}.

1.4.1 Atividade fungicida

Na natureza, os microorganismos com maior eficiência na biodegradação da madeira são os fungos decompositores da madeira¹⁸. Muitas espécies de basidiomicetos são degradadoras de madeira. Os basidiomicetos são fungos conhecidos popularmente como cogumelos e orelhas de pau (figura 7) e podem ser divididos em três grupos: os fungos da podridão branca (PB), os causadores de podridão parda (PP) e os fungos de decomposição mole (PM)⁵³. Os primeiros são dotados de complexo enzimático, que os tornam capazes de converter moléculas de celulose, hemicelulose e lignina em água e CO₂. A madeira, depois de sofrer a ação desses fungos, fica com aspecto esponjoso, fibroso ou laminado e com cor esbranquiçada, o que caracteriza o nome do grupo. Os fungos causadores de podridão parda, por sua vez, são responsáveis pela degradação da celulose e hemicelulose e deixam a madeira com aspecto amorfo e desintegrado ao final do processo de degradação, restando apenas moléculas de lignina modificada de coloração parda. Os fungos da podridão mole podem degradar tanto os polissacarídeos quanto a lignina, porém em velocidades muito reduzidas⁵⁴.

A importância dos basidiomicetos para o meio ambiente está relacionada com a capacidade persistente em secretar enzimas capazes de degradar e desestabilizar moléculas orgânicas. A madeira deteriorada por estes fungos tem suas propriedades físicas e mecânicas afetadas, havendo diminuição da resistência e aumento da permeabilidade⁵³. Por essa razão, os fungos quando atuam na deteriorização da madeira apresentam um importante papel ecológico na reciclagem de nutrientes para o solo,

⁵³ Oliveira, A. M. F.; Lepage, E. S.; *Controle de qualidade. In: LEPAGE, E.S. (coord). Manual de preservação da Madeira; IPT - São Paulo, 1986, 1, 5: 99-278.*

⁵⁴ Kirk, T. K.; Cullen, D.; *Em Environmentally Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry; John Wiley & Sons: New York, eds. Young, R.; Akhtar, M., 1998, cap. 9.*

porém essa deteriorização pode ser bastante importuna quando estas madeiras apresentam uma utilidade⁵⁵.



Figura 7. Basidiomicetos: Cogumelo (A) e Orelha de pau (B).

1.4.2 Atividade larvicida

A dengue, infecção viral transmitida por mosquitos do gênero *Aedes*, é considerada uma das maiores preocupações mundiais de Saúde Pública. Esta doença apresenta ampla incidência nos países tropicais e subtropicais. Sua dispersão se deu nos meados da década de 1970, tornando-se uma epidemia em ascensão, já que 1980, apenas 12 municípios estavam infestados pelo *Aedes aegypti* e atualmente, todo o Brasil está sofrendo com esta epidemia⁵⁶. Uma forma de controle da doença seria o combate às larvas e mosquitos responsáveis pela proliferação da doença, uma vez que não existe uma vacina para prevenção da mesma⁵⁷. Como as plantas não aceitam de modo passivo as agressões que sofrem de vírus, bactérias, fungos, insetos e demais organismos⁵⁸ e tendo em vista a grande diversidade de vegetais existentes no Brasil, um grande número

⁵⁵ Zabel, R. A.; Morrel, J. J.; *Wood microbiology decay and its prevention*. Academic Press, New York, **1992**, 432 p.

⁵⁶ Neto, V. S. G.; Rebelo, J. M. M.; *Aspectos epidemiológicos do dengue no município de São Luis*, Maranhão, FIOCRUZ, **2004**.

⁵⁷ Tauil, P.L.; Urbanização e ecologia do dengue, *Cad. Saúde Pública*, **2001**, v.17(Suplemento), 99-102 p.

⁵⁸ Lamb. C. E.; Dixon. R. A.; *Annual Review of plant Physiology and Plant molecular biology*; **1997**, 48: 251-275p.

de pesquisas está sendo realizado objetivando encontrar substâncias com propriedades inseticidas seletivas para serem usadas em futuras formulações de um produto comercial.

1.5 Fundamentação teórica da espécie *Hymenolobium Petraeum* (Angelim pedra)

1.5.1 Considerações sobre a família Leguminosae

Leguminosae ou Fabaceae é a terceira maior família entre as angiospermas, compreendendo 727 gêneros e 19.325 espécies. No Brasil estão representadas por cerca de 2.100 espécies nativas, reunidas em 188 gêneros distribuídos em quase todas as formações vegetais, que variam de grandes árvores, arbustos, ervas e trepadeiras⁵⁹. A classificação mais aceita para a família Leguminosae é a divisão em três subfamílias: Mimosoideae (56 gêneros e aproximadamente 2800 espécies), Caesalpinioideae (152 gêneros com cerca de 2800 espécies) e Papilionoideae (440 gêneros e cerca de 12000 espécies vegetais)⁶⁰. Dentre as subfamílias, Papilionoideae é considerado o grupo mais evoluído, podendo ser encontrado no mundo inteiro, porém com maior representação das árvores nos trópicos e hemisfério sul enquanto que os arbustos são encontrados com maior incidência na zona temperada⁴⁴.

Uma característica fitoquímica da família Leguminosae é que cerca de 95% dos isoflavonóides naturais identificados estão compreendidos nesta família⁴⁴. A ocorrência de derivados prenilados é mais uma característica estrutural dos flavonóides isolados de Papilionoideae. Os flavonóides são compostos que tem como função a pigmentação de folhas e frutos, bem como a proteção das plantas. Em virtude dessas propriedades muitos dos vegetais da família Leguminosae são utilizados nas indústrias de tinturaria, para produção de fármacos e inseticidas⁶¹. Os isoflavonóides da família Fabaceae, cuja

⁵⁹ Lewis, G.P. *et al*; *Legumes of the world*. Kew Publishing, **2005**, 592p.

⁶⁰ Heywood, V. H.; *The leguminosae- A systemic purview*. In: Harbone, J. B.; Boulter, D., Turner, B. L. (ed) *Chemotaxonomy of the leguminosae*. Academic Express, London, **1971**, cap 1.

⁶¹ Hegnaur, R.; Grayner-Barkmeyer, R. J.; *Phytochemistry* **1993**, 34: 3-16.

distribuição taxonômica é restrita salvo raríssimas exceções, apresentam uma diversidade estrutural importante e uma reconhecida atividade antifúngica e inseticida⁶².

1.5.2 *Hymenolobium Petraeum*

A espécie é conhecida popularmente como Angelim (PA, AM), angelim-amarelo (PA), angelim-aroeira (MA), angelim-branco-pedra (PA, AC), angelim-comum (PA), angelim-da-mata (PA), angelim-do-Pará (AM, PA, RR), angelim-grande (AM, PA, MA), angelim-macho (MA), angelim-pedra (PA), angelim-róseo (PA, AC), angelim-vermelho (AM), mirarema (MA), murarema (MA), sucupira-amarela (MA, RR). No Brasil os estados de maior incidência são Amapá (AP), Amazonas (AM), Pará (PA) e Rondônia (RO)⁶³. *H. Petraeum* é uma árvore de grande porte (figura 8) podendo chegar a 55 m de altura, e 2 m de largura, densidade 0,95-1,00 g/cm³, tronco reto e cilíndrico⁶⁴.



Figura 8. *Hymenolobium petraeum* (Angelim Pedra).

Na indústria madeireira é utilizada para construção por sua alta durabilidade natural e resistência ao ataque de cupins, fungos e outros parasitas da madeira⁶⁵. O pó da

⁶² Reynaud, J. El, *et al*; *Nat. Prod. Rep.* **2005**, 3, 22: 504 -515.

⁶³ Pio-Corrêa, M.; *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas.* **1984**, 3:238-239, 5:108-129.

⁶⁴ Oliveira, L. Z. de, *et al*; *Ciência Rural*; **2010**, 40, 8: 1732-1740.

⁶⁵ Alday, E., G., *et al*; *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **2005**, 115, 3: 634-636.

madeira é utilizado na medicina popular na cura de úlceras. Angelim pedra é uma árvore que apresenta a seguinte posição taxonômica:

Reino: Plantae

Divisão: Magnoliophyta

Classe: Magnoliopsida

Ordem: Fabales

Família: Leguminosae ou Fabaceae

Subfamília: Papilionoideae ou Faboideae

Gênero: *Hymenolobium*

Espécie: *Hymenolobium petraeum*

Em muitos estados do Brasil existem varias espécies de Leguminosae com a denominação de “Angelim” e algumas variações, tais como angelim-vermelho, angelim-pedra, angelim-da-mata, angelim-rajado, dentre outras. Essas espécies apresentam quatro diferentes gêneros: *Hymenolobium*, *Andira*, *Dinizia* e *Vatairea*. Estudos realizados com madeiras denominadas "angelim" sob o aspecto anatômico, macro e microscópico foram observados por Mainieri e Primo (1968)⁶⁶ que as madeiras de *Andira* da Amazônia (*A. inermis*, *A. micrantha*, *A. parviflora* e *A. surinamensis*) são muito semelhantes quanto ao aspecto, à cor e à propriedade, isto é, todas as madeiras de *Andira* são pesadas ou muito pesadas e não apresentam cheiro e nem gosto característico. Sobre as madeiras dos gêneros *Vatairea* e *Vataireopsis*, os mesmos autores relataram que além de serem de gosto excessivamente amargo, são semelhantes no aspecto e na cor amarelo-acastanhado ou castanho-amarelado⁶⁷.

Um levantamento bibliográfico foi realizado para a espécie *Hymenolobium petraeum* e não foram encontrados artigos relacionados a composição química da espécie. Constatou-se ainda que para os gêneros *Hymenolobium*, *Vatairea*, *Dinizia* e *Andira* também não foi encontrado qualquer estudo químico relacionado a madeira. Para o gênero *Andira* foram encontrados alguns estudos de isolamento químico dos extrativos. Porém, nenhum trabalho realizou estudo com a madeira, não sendo possível realizar uma comparação com o gênero em estudo.

⁶⁶ Mainieri, C.; Primo, B. L.; *Anu. Bras. Econ. Flor.* **1968**, 19: 39-87.

⁶⁷ Ferreira, G. C., et al.; *Acta Amazônia* **2004**, 34, 3: 387 – 398.

1.5.3 Flavonóides

Os flavonóides constituem um grupo de compostos fenólicos complexos com uma estrutura comum caracterizada por dois anéis aromáticos (A e B) e um heterociclo oxigenado (C) formado por 3 átomos de carbono como observado na figura 9. As diversas classes de flavonóides diferem no padrão de substituição e no nível de oxidação do anel C. A substituição nos anéis A e B fornecem os mais variados compostos pertencentes a esta classe de produtos naturais⁶⁸.

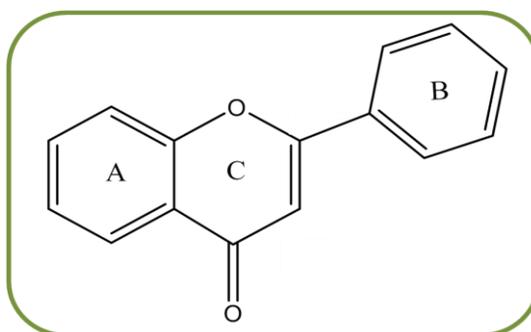


Figura 9. Esqueleto básico de um flavonóide.

Os flavonóides são biossintetizados a partir da via dos fenilpropanóides e do acetato, ou seja, tem como precursores três grupos acetatos dando origem ao anel A e os três átomos de carbono derivados do chiquimato que interligam o anel B. A biosíntese dos flavonóides começa com a chalcona. As demais classes de substâncias são derivadas das chalconas sendo a seqüência de formação: flavanona, diidrochalcona, aurona, flavanonol, debenzoilmetano, flavona, flavonol, flavana 3,4-fiol, flavana 4-diol e isoflavonóides como isoflavona, 3-arilcumarina, pterocarpano e rotenóides, ver figura 10.

⁶⁸ Pietta, P. G.; *Journal of natural products* **2000**, 63, 1035-1042.

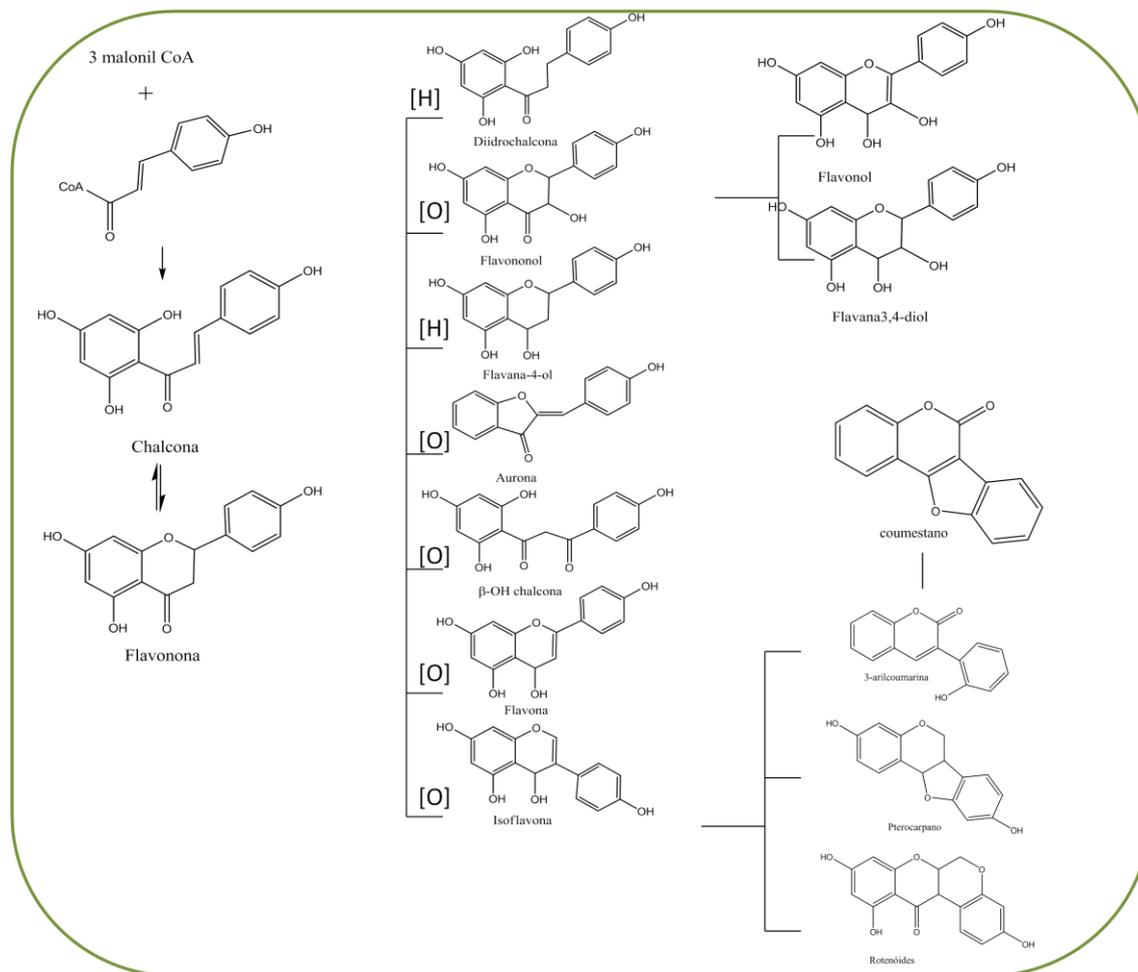


Figura 10. Esquema biosintético dos flavonóides⁶⁹

Os flavonóides apresentam-se frequentemente oxigenados e sua estrutura química é ideal para a captura de radicais livres, sendo antioxidantes mais efetivos que as vitaminas C e E. Esses compostos fornecem substâncias com propriedades diversas dentre elas destacam-se: atividade antioxidante, antimicrobiana, antiinflamatória, antialérgica, antitumoral, entre outros^{70;73}.

A grande diversidade estrutural dos flavonóides ocorrem devido a alguns fatores, como: a modificação do sistema esquelético básico que diferem entre si pela saturação no anel C, a locação do anel B nas posições C-2, C-3 e C-4 fornecendo diferentes classes de flavonóides; a oxigenação dos carbonos aromáticos; a ligação de C- ou O-alkilação, C- ou O-metilação, C- ou O-isoprenilação (prenilação e geranilação) e O- ou

⁶⁹ Tahara, S.; Ibrahim, R. K.; *Phytochemistry* **1995**, 38, 5: 1073-1094.

⁷⁰ Evans, W. C.; *Tese Doutor em ciências*; Instituto de química, UNICAMP- Campinas, **1998**.

C-glicosilação; e a modificação do substituinte: por oxigenação de grupos laterais e a ciclização com o grupo hidroxila, bem como os grupos C-prenilas podem sofrer diversas modificações resultando em éteres cíclicos de cinco ou seis membros⁷¹.

A distribuição das subclasses de isoflavonóides em plantas está praticamente restrito a subfamília Papilionoideae/Fabaceae de Leguminosae bem como a variedade estrutural destes compostos. A presença de isoflavonoides prenilados (56%) ocorre sobretudo nesta família⁶⁸.

A formação dos grupos prenilas ocorre pela via do mevalonato e as reações de ciclização do C-prenila ocorrem por ataque nucleofílico do grupo hidroxila ao epóxido inicialmente formado pela oxidação da ligação dupla deste grupo alquílico. Dependendo da orientação do ataque nucleofílico, ver figura 11, o produto será um anel de seis membros, o dimetilpirano ou um anel de cinco membros, o furano⁷².

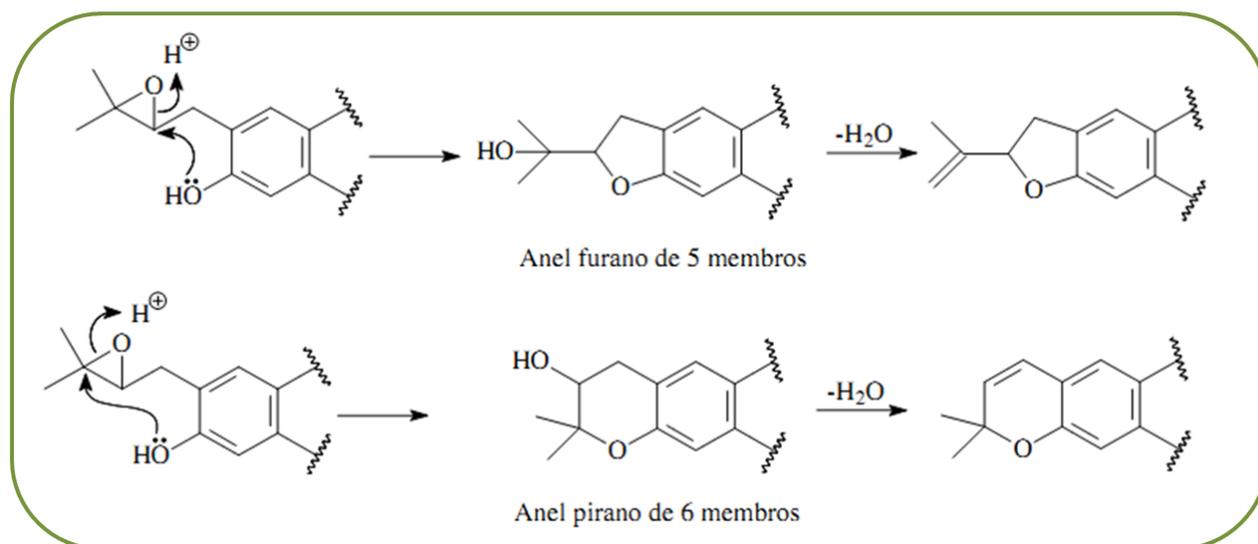


Figura 11. Formação do grupo prenila (Fonte: Dewick, 2001).

A formação do anel furano dissustituído ocorre pela ação da enzima monooxigenase citocromo P450 dependente que utiliza os cofatores NADPH e oxigênio molecular para a clivagem do grupo hidroxiisopropila cujo fragmento é liberado em forma de acetona, como observado na figura 12. Nesta etapa, não ocorre a formação de

⁷¹ Hegnauer, R.; Grayer-Barkmeyer, R. J.; *Phytochemistry* **1993**, 34, 3-16.

⁷² Dewick, P.M.; *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*. Chichester: 2 ed., John Wiley & Sons, **2001**, cap.5 e 6.

nenhum intermediário hidroxilado e o processo é iniciado por um mecanismo via radicalar⁷².

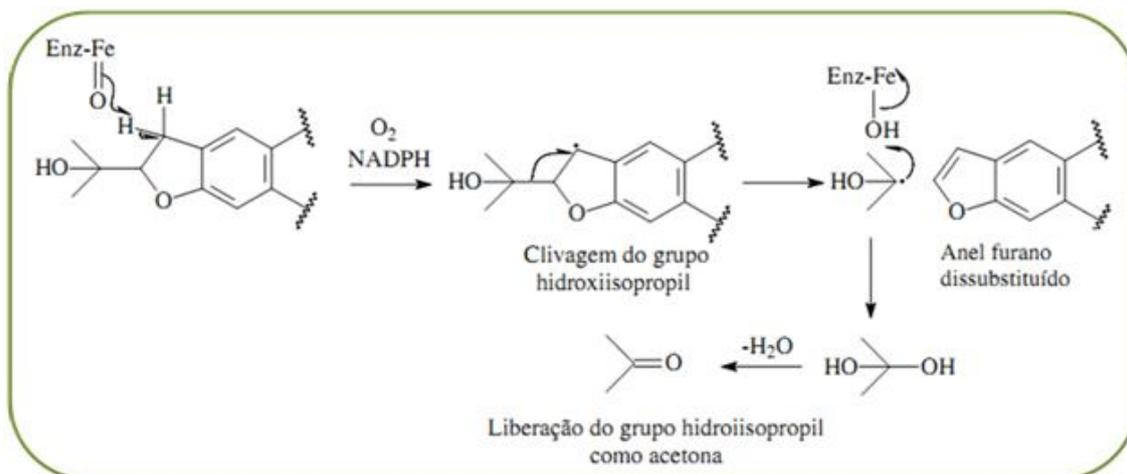


Figura 12. Transformações do grupo prenil: formação do anel furano dissustituído (Fonte: Dewick, 2001)

Muitos trabalhos descrevem a presença de grupos prenils em isoflavonóides isolados de plantas. Botta e colaboradores (2009)⁷³ publicaram uma revisão sobre a distribuição, estrutura, atividade biológica e estudo biotecnológico dos isoflavonóides prenilados conhecidos do período de 1995 a 2006. Eles evidenciaram a presença de isoflavonóides prenilados em 23 espécies da família não-Leguminosae, contudo, esses grupos foram identificados, a maior parte, em espécies da subfamília Papilionoideae/Fabaceae de Leguminosae. Botta e colaboradores (2009) também destacaram a importância da presença de grupos isoprenóides para a atividade farmacológica, uma vez que, os isoflavonóides prenilados apresentaram uma grande variedade de atividade biológica.

1.5.3.1 Isoflavonóides e seus derivados

Derivado do 1,2-difenil-propano figura 13, os isoflavonóides são de ocorrência quase que exclusiva da subfamília Papilionoideae. Eles apresentam uma diversidade estrutural importante como descrita no esquema de biossíntese dos flavonóides, figura 10.

⁷³ Botta, B. *et al.*; *Current Medicinal Chemistry*, **2009**, 16, 3414-3468.

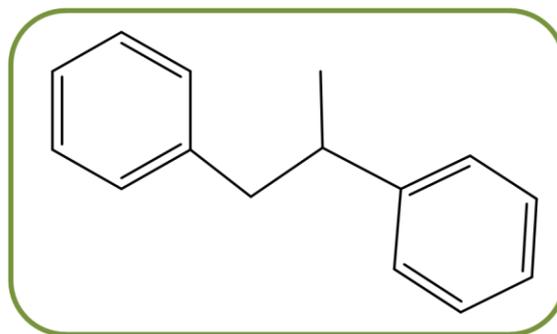


Figura 13. 1,2-difenil-propano

As isoflavonas e os pterocarpanos formam os maiores grupos de isoflavonóides naturais. As isoflavonas apresentam cerca de 400 compostos não glicosilados enquanto que os pterocarpanos cerca de 200 compostos não glicosilados foram caracterizados⁷⁴.

Diferentemente das isoflavonas, os pterocarpanos (figura 14) apresentam em sua estrutura um sistema tetracíclico derivados do esqueleto básico dos isoflavonóides. O quarto anel é formado pela ligação entre as posições 4 e 2' do isoflavonóide, com formação da função éter. Os pterocarpanos podem ser subdivididos em: pterocarpano simples, 6a-hydroxipterocarpano e pterocarpeno, este último com insaturação na posição 6a-11a⁷⁵.

Os coumestanos (figura 14) são uma classe de isoflavonóides caracterizado pela presença de carbonila na posição 6 e um átomo de carbono extra em um anel heterocíclico adicional. Este sistema é derivado da ciclização oxidativa da 3-arilcoumarina. Os coumestanos apresentam estruturas similares aos pterocarpanos e são conhecidos pelo seu alto ponto de fusão⁷³.

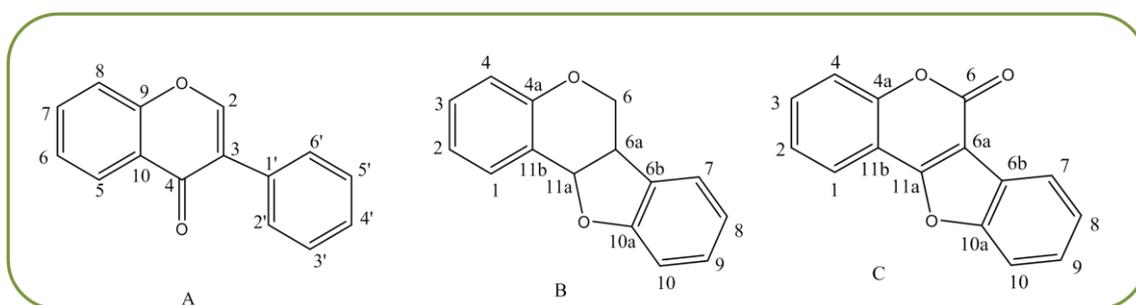


Figura 14. Isoflavona (A), Pterocarpano (B) e Coumestanos (C).

⁷⁴ Harbone, J. B.; *The flavonoids advances in research since 1986*; Chapman e Hall, London, **1994**. Cap. 5.

⁷⁵ Cseke, L. J. *et al*; *Natural products from plants*; 2 ed., Taylor e Francis, London, **2006**. Cap. 1.

Muitas substâncias são produzidas com a função de defesa contra o ataque de organismos xilófagos, estas substâncias são chamadas de fitoalexinas. A medicarpana (antimicrobiana e fungicida), genisteína (atividade antifúngica) e o coumestrol (fitoestrogênio e inseticida) são algumas fitoalexinas representadas na figura 15^{74;76;77}.

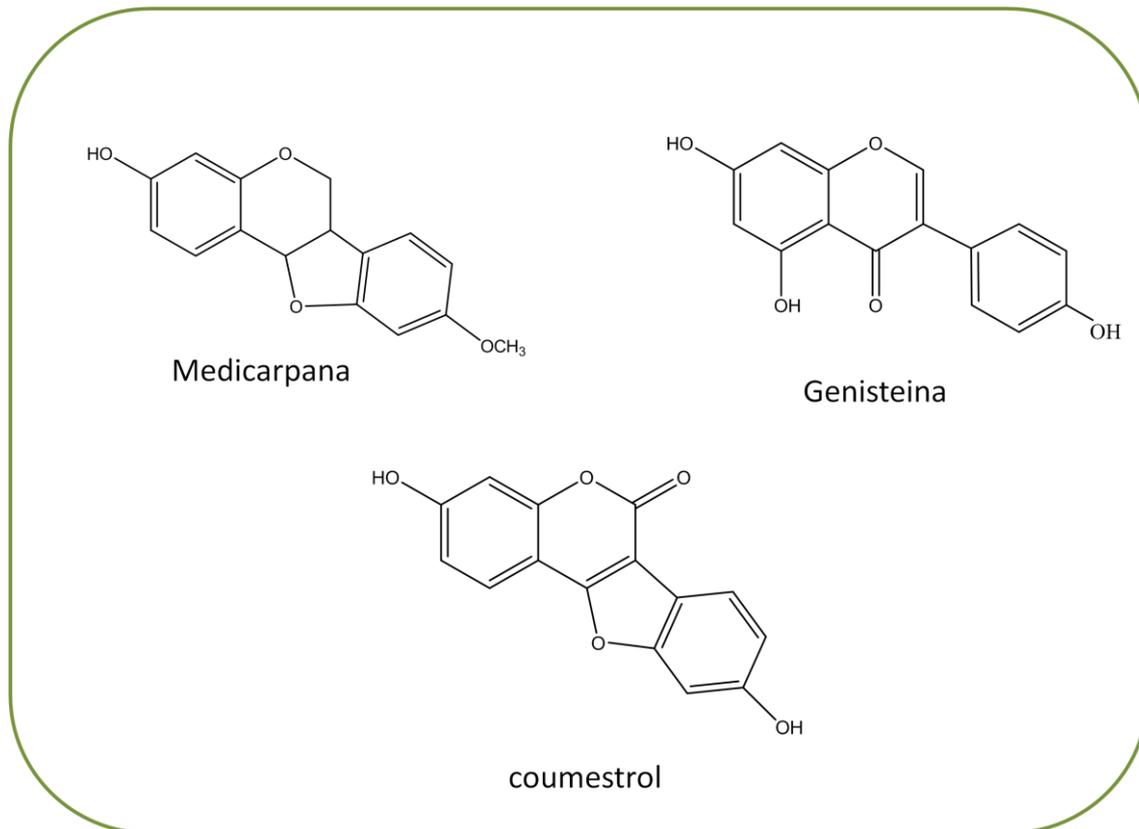


Figura 15. Algumas fitoalexinas derivadas de isoflavonóides.

⁷⁶ Clapauch, R. *et al*; *Arq Bras Endocrinol Metab* **2002**, 46, 6: 679-695.

⁷⁷ Murkies, A.L.; Wilcox, G.; Davis, S.R.; *J Clin Endocrinol Metab* **1998**, 83:297-303.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Este trabalho visa fazer uma investigação química da madeira *Hymenolobium petraeum* (*Angelim pedra*), através do isolamento, caracterização e identificação dos constituintes químicos micro e macromoleculares responsáveis pela resistência dessa madeira ao ataque de organismos xilófagos.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Realização de uma abordagem fitoquímica para verificar a presença/ausência das principais classes de compostos presentes na madeira.
- ✓ Preparação de extratos brutos com solventes orgânicos em ordem crescente de polaridade, usando ciclohexano, acetato de etila e etanol.
- ✓ Quantificação dos rendimentos dos extratos brutos.
- ✓ Quantificação dos compostos fenólicos.
- ✓ Isolamento dos metabólitos secundários através de técnicas cromatográficas.
- ✓ Determinação da estrutura da lignina bem como dos metabólitos secundários por métodos espectrofotométricos (UV, IV, RMN de H¹ e C¹³) e por análise elementar.
- ✓ Estudar a resistência da madeira frente aos seguintes basidiomicetos: *Phanerochaete chrysosporium*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Pycnoporus sanguineus*, *Lentinus edodes*, *Schizophyllum commune* e *Trametes vellosa*.
- ✓ Determinar a susceptibilidade das larvas de *A. aegypti* exposta aos extratos brutos e compostos identificados da espécie *H. petraeum*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

Na obtenção dos extrativos foram usados solventes comerciais, grau p.a. das marcas VETEC e CINÉTICA.

Nas colunas cromatográficas foram utilizados como suportes sílica gel 60 (70-230 Mesh) (Macherey-Nagel) e Sephadex LH-20 (Pharmacia) e solventes de alto grau de pureza da marca VETEC.

Nas cromatografias em camada delgada (CCD) analíticas foram utilizadas placas em sílica gel POLYGRAM SIL G/UV₂₅₄ (Macherey-Nagel). A revelação dos cromatogramas foi realizada utilizando-se iodo sublimado (I₂), anisaldeído e luz UV.

Nos testes fitoquímicos qualitativos, os reagentes e soluções foram preparados seguindo a descrição do anexo 8 (Item 8.1, pag.101). O reagente de Folin-Ciocalteu (CRQ) e os demais solventes/reagentes usados nestes testes foram das marcas: Cinética, Reagen, VETEC e Dinâmica.

A balança analítica de umidade com detecção por Infravermelho, Sartorius - MA 150, foi usada na quantificação de umidade.

Nas análises quantitativas de fenóis totais, flavonóides e carboidratos foram usados, padrão de rutina (Sigma), H₂SO₄, NaOH, ácido gálico todos da marca VETEC.

Os carboidratos foram analisados por Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) modelo C-R7A da Shimadzu com detector de UV visível da marca Shimadzu modelo SPD - 10A, com coluna Lichrospher 100 (C-18) 125 x 4 mm Hewlett Packard (RP-18) para furfural e hidroximetilfurfural e Aminex HPX 87H (300 x 7,8 mm, BIO-RAD para celulose e hemicelulose respectivamente.

As quantificações de lignina solúvel, fenóis totais e flavonóides foram realizadas usando-se espectrofotômetro UV/visível biospectro SP-220 e espectrofotômetro Shimadzu UV-150-02.

Na hidrólise de lignina, foi utilizada autoclave de marca Phoenix-autoclave vertical com cesto de aço inoxidável AISI 304 e mufla, modelo EDG-3000. Na caracterização da lignina utilizou-se um espectrofotômetro FTIR Nicolet 520.

A análise elementar foi realizada em aparelho PERKIN-ELMER modelo PE 2400.

Na identificação das frações apolares do extrato em acetato de etila foi utilizado o Cromatógrafo Gasoso GC-17A (Shimadzu), com detector a 280°C e temperatura do injetor 250°C. Temperatura de 60°C por 1 min e rampa de 10°C/min até 280°C por 30 minutos (tempo total 52 minutos). coluna DB-5 (30 m X 0,25 mm), gás He, acoplado ao espectrômetro de massa MS-QP5050 (Shimadzu).

Na identificação das substâncias purificadas foi utilizado a espectroscopia de RMN de ^1H e ^{13}C , experimentos do tipo APT ou DEPT e os 2D gCOSY (H-H, ^3J); gHSQC (H-C, ^1J) e gHMBC (H-C, ^2J e ^3J), registrados no espectrômetro VARIAN UNITY PLUS - 300 e VARIAN – VNMRS- 400, operando com 300 e 400 MHz para ^1H e 75 e 100 MHz para ^{13}C , em CDCl_3 , acetona- d_6 , piridina- d_5 ou DMSO-d_6 , tendo como padrão interno de referência o TMS.

Os experimentos ESI-SM foram realizados em aparelho LC-IT-TOF SHIMADZU, em inserção direta com fluxo de 0,2 mL/min, fonte de ionização elétron-spray (ESI) e concentração do solvente 1:1, 50% de água e 50% do solvente MeOH ou acetronitrila.

As medidas do ponto de fusão foram determinadas usando aparelho Micro Química MQAPF- 301.

Material botânico – A madeira conhecida comercialmente como Angelim Pedra (*Hymenolobium petraeum*), originária do estado do Pará, foi adquirida no comércio local.

Microrganismos - Foram utilizados cinco fungos causadores da podridão branca, sendo eles: *Phanerochaete chrysosporum* (CCT 1999), *Pycnoporus sanguineus* CCT-4518, *Lentinula edodes* (CCT 4519), *Trametes vellosa* (CCT 5567) e *Schizophyllum commune* (CCT 4718) obtidos da coleção de cultura microbiana da Fundação André Tosello-FAT, Campinas-SP (Item 3.9.1, pag. 45).

Larvas do mosquito *Aedes aegypti* - foram utilizadas larvas do mosquito em estágio L4, que corresponde ao último estágio larval. Os experimentos foram conduzidos no laboratório de ecologia química – DQF/UFPE, sob a orientação da Profa. Dra. Daniela Navarro (Item 3.9.2, pag. 45)

3.2 Preparo do material

A madeira seca, o cerne e o alburno, foram pulverizados usando moinho da marca FRISCH - pulverisette 14.

3.3 Abordagem fitoquímica

Visando a identificação dos metabólitos secundários (extrativos) presentes na madeira em estudo, foram realizados testes fitoquímicos baseados na metodologia descrita por Costa (1982)⁷⁶. Os compostos analisados estão descritos na tabela 2.

Tabela 2. Testes para identificação das classes de compostos presentes no vegetal.

Classe de compostos	Testes
Alcalóides	Dragendorff; Mayer
Flavonóides	Shinoda
Saponinas	Espuma
Taninos	Cloreto Férrico
Terpenos e Esteróides	Liebermann-Buchard

3.3.1 Determinação de Alcalóides

A presença de alcalóides foi investigada por ensaios confirmativos específicos, que consistiram em adicionar cerca de 0,5 g da madeira em um tubo de ensaio, adicionar 10 mL de H₂SO₄ a 1% e aquecer a mistura em banho-maria à temperatura de 100°C, por 2 minutos. A solução foi filtrada e o filtrado foi dividido em dois tubos de ensaio distintos. A um dos tubos de ensaio adicionou-se gotas do reagente de Dragendorff, e ao tubo seguinte gotas do reagente de Mayer. A presença de alcalóides é confirmada através da formação de um precipitado laranja avermelhado com o reagente de Dragendorff. Com o reagente de Mayer o precipitado é esbranquiçado.

⁷⁶ Costa, A. F.; *Farmacognosia*. Fundação Calouste Gulbenkian, 2^a, Lisboa, **1982**, v. II.

3.3.2 Determinação de Flavonóides

A presença de flavonóides foi determinada pelo teste de Shinoda, que consiste em transferir 0,5 g de madeira para um tubo de ensaio, adicionar 5 mL de metanol e agitar. A mistura é então filtrada e ao filtrado adiciona-se 1 mL de HCl concentrado. Com o auxílio de uma pinça acrescenta-se à solução uma fita de magnésio de 1cm. A confirmação da presença de flavonóides ocorre com o aparecimento de coloração rósea.

3.3.3 Determinação de Saponinas

As saponinas foram avaliadas pelo teste da espuma, que consiste em adicionar cerca de 0,5 g da madeira a 5 mL de água destilada em um tubo de ensaio, agitar vigorosamente a mistura por cerca de 5 minutos e deixar em repouso por 30 minutos. A presença de saponinas é confirmada pela persistência da espuma por mais de 30 minutos.

3.3.4 Determinação de Taninos

Os taninos foram identificados através do método de oxidação usando cloreto férrico. Esse método consiste em adicionar 0,5 g da madeira a 10 mL de água destilada e agitar. Em seguida a mistura é filtrada e ao filtrado adicionou-se algumas gotas de cloreto férrico a 1%, para verificar o eventual surgimento de uma coloração ou precipitado azul, indicativo da presença de taninos hidrolisáveis. Coloração ou ppt/verde indica a presença de taninos condensáveis.

3.3.5 Determinação de Terpenos e Esteróides

A presença de terpenos e esteróides foi verificada através do teste de Liebermann-Buchard, que consiste em adicionar a um tubo de ensaio 0,5 g da madeira e 3 mL de clorofórmio, agitar e filtrar. Ao filtrado adiciona-se 2 mL de anidrido acético, agitando vigorosamente. Após a agitação adicionam-se algumas gotas de ácido sulfúrico concentrado lentamente. A confirmação da presença de terpenos e esteróides se dá com o aparecimento sucessivo de colorações rósea, azul e verde.

3.4 Quantificação de Umidade

A quantificação de umidade foi realizada pesando-se cerca de 1 g da madeira em balança analítica de umidade, por 30 minutos a 105°C. O equipamento fornece o percentual de umidade e a massa final da amostra.

3.5 Determinação de Fenóis Totais

Pesou-se 1g da amostra (determinação realizada em triplicata), adicionou-se 30 mL de MeOH/H₂O (na proporção 8:2 v/v). A mistura foi deixada em repouso por 24 horas em ambiente escuro. Filtrou-se o extrato e reduziu-se seu volume em rotaevaporador até a eliminação de todo o metanol, isto é, o volume restante foi de 6 mL. Em seguida, separou-se uma alíquota de 50 µL do extrato e adicionou-se 25 mL de água destilada, retirou-se uma alíquota de 500 µL dessa nova solução para um tubo de ensaio. A este tubo foram adicionados 2,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteau 10% e 2,0 mL de Na₂CO₃ 7,5%. O branco consistiu em 2,5 mL de Folin-Ciocalteau 10% e 2,0 mL de Na₂CO₃ a 7,5% com 500 µL de água destilada⁷⁷.

Os tubos de ensaio foram levados a banho-maria a 50°C por 5 min. As amostras foram analisadas imediatamente após o aquecimento em um espectrofotômetro UV/visível, para a leitura da absorbância a 760 nm. A concentração de fenóis totais foi avaliada através da curva padrão de ácido gálico nas concentrações de 0,78; 1,56; 3,125; 6,25; 12,5; 25 e 50 µg/mL. A concentração de fenóis totais foi determinada através da equação da reta, equação 1, obtida da curva padrão do ácido gálico.

$$X = \frac{Y - B}{A} \quad (1)$$

Onde:

X - Concentração de compostos fenólicos em µg/mL;

Y – Absorbância das amostras a 760 nm;

B – Constante da reta;

⁷⁷ Waterman, P. G.; Simon, M.; *Analysis of phenolic plant metabolites*, oxford ed., Blackwell Scientific Publications, London, **1994**, 84 p.

A – Coeficiente angular da reta.

3.6 Quantificação de flavonóides

Pesou-se 4 g da madeira seca para extração em soxhlet com 300 mL de metanol 70% por 3 horas. O extrato foi transferido para um balão volumétrico de 500 mL e completado o volume com MeOH 70%. Em um balão volumétrico de 50 mL foram adicionados 15 mL da solução do balão de 500 mL, 1 mL de cloreto de alumínio 5% e completou-se o volume adicionando MeOH 70%. As medidas foram realizadas em triplicata após 30 minutos de repouso e as absorbâncias foram determinadas em comprimento de onda de 425 nm usando espectrofotômetro UV/visível. O branco foi preparado adicionando-se 1 mL de cloreto de alumínio 5% em um balão volumétrico de 50 mL e completando o volume com MeOH 70%⁷⁸.

A quantificação de flavonóides foi realizada a partir da curva padrão de rutina. Partiu-se de uma solução de rutina 100 µg/mL e usando MeOH 70% as concentrações usadas foram 10; 11; 12; 13; 14 e 15 µg/mL. As concentrações de flavonóides foram determinadas através da equação 2 obtida da relação entre as concentrações versus as absorbâncias da rutina. As análises foram realizadas em triplicata.

$$X' = \frac{Y' - B'}{A'} \quad (2)$$

Onde:

X' - Concentração de flavonóides em µg/mL;

Y' – Absorbância das amostras a 425 nm;

B' – Constante da reta.

3.7 Quantificação, isolamento e caracterização da madeira *Hymenolobium petraeum*

3.7.1 Determinação de lignina solúvel e insolúvel em meio ácido

⁷⁸ Rio, R.G.W.; *Métodos de controle químico de amostras de própolis*. Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.

A quantidade de lignina insolúvel em meio ácido foi determinada de acordo com o método Klason modificado⁷⁹⁻⁸⁰. Adicionou-se 2 g da madeira livre de extrativos a um béquer de 100 mL e a esse béquer adicionou-se 10 mL de H₂SO₄ a 72% sob vigorosa agitação por 7 minutos em um banho termostatizado a 45,0 ±0,5°C. A reação foi interrompida com a adição de 50 mL de água destilada. Imediatamente a amostra foi transferida quantitativamente para um erlenmeyer de 500 mL elevando-se o volume com adição de 225 mL de água destilada. Para completar a hidrólise dos oligômeros restantes, o erlenmeyer foi fechado com papel alumínio e autoclavados por 30 minutos a 1,05 atm. Após a descompressão, o frasco foi retirado da autoclave e resfriado até a temperatura ambiente.

Foi realizada uma filtração, para separar o material hidrolisado dos sólidos presentes na solução usando papel de filtro quantitativo, previamente secos e tarado. O hidrolisado foi recolhido em balão volumétrico de 500 mL e o sólido contido no papel de filtro lavado com porções de 50 mL de água destilada até atingir o volume do balão, o qual foi armazenado para análises posteriores. A lignina retida no papel de filtro foi lavada com água destilada até eliminar todos os sulfatos presentes (aproximadamente 1500 mL) e secada em estufa de 105°C até peso constante.

A quantificação de lignina solúvel foi realizada retirando-se uma alíquota de 5 mL do hidrolisado adicionando em um balão volumétrico de 100 mL junto com 40 gotas de solução de NaOH 6 mol/L. O volume do balão foi completado com água destilada e a absorbância da solução foi determinada por espectroscopia de UV no comprimento de onda de 280 nm. Como referência usou-se 40 gotas da solução de NaOH 6 mol/L em água destilada (volume de 100 mL).

O cálculo da lignina solúvel foi realizado usando a equação 3, admitindo os valores de absorvidade determinados e reportados na literatura⁷⁹ e considerando as respectivas relações de diluição.

$$C_{lig} = \frac{A_{lig280} - A_{pd280}}{\epsilon_{lig}} \quad (3)$$

⁷⁹ Moriya,R; Gonçalves, A.; Duarte, M.; *Applied biochemistry and biotechnology*, **2007**, 137–140, 1-12 : 505.

⁸⁰ Rocha, G. J. M.; *Tese de doutorado*. Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, **2000**.

Onde:

C_{lig} - Concentração de lignina solúvel (g.L^{-1});

A_{lig280} - Absorbância da solução de lignina em 280 nm;

A_{pd280} - Absorbância em 280 nm dos produtos de decomposição dos açúcares (furfural e hidroximetilfurfural) igual a $C_1 \cdot \varepsilon_1 + C_2 \cdot \varepsilon_2$;

C_1 - Concentração de furfural [g.L^{-1}] (determinados previamente por CLAE)];

C_2 - Concentração de hidroximetilfurfural [g.L^{-1}] (determinados previamente por CLAE)];

ε_1 - Absortividade do furfural = $146,85 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{L}$ (dado experimental);

ε_2 - Absortividade do hidroximetilfurfural = $114 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{L}$ (dado experimental);

ε_1 e ε_2 por espectroscopia de UV em 280 nm.

ε_{lig} - Absortividade molar de lignina (dado experimental obtido da curva padrão de lignina em espectroscopia de UV em 280 nm).

3.7.2 Determinação do teor de cinzas na lignina insolúvel

A lignina insolúvel foi transferida para um cadinho de porcelana, previamente tarado. A amostra foi calcinada em uma mufla lentamente até 300°C , com cadinho tampado, e mantido durante 40 minutos nesta temperatura. Após este tempo, o cadinho foi destampado e elevado a temperatura a 800°C por 2 horas contadas a partir do momento que a temperatura atingir os 800°C . Depois do resfriamento do cadinho em dessecador, a massa de cinzas foi determinada em balança analítica⁸¹. O cálculo de cinzas foi realizado usando a equação 4.

$$\%C_{en} = \frac{m_2 - m_1}{m_3} \times 100 \quad (4)$$

Em que:

$\%C_{en}$ - Percentual de cinzas em lignina

m_1 - Massa do pesa filtro em g

⁸¹ Technical Association of the Pulp and Paper Industry (TAPPI). Atlanta TAPPI Press, 1993.

m_2 - Massa do pesa filtro com cinzas em g

m_3 - Massa de lignina seca em g

3.7.3 Determinação do teor de carboidratos

A solução obtida na hidrólise de lignina em meio ácido foi analisada por CLAE. Uma pequena amostra da solução foi filtrada em filtro "Sep Pak C₁₈" e em seguida analisado quanto aos teores de celobiose, glicose, xilose, arabinose e ácido acético por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector de índice de refração. Para isso foi utilizado uma coluna Aminex. A fase móvel foi H₂SO₄ 0,005 mol/L com fluxo de 0,6 mL/min a 45 °C.

As concentrações de celobiose e glicose foram convertidas em celulose. As concentrações de xilose e arabinose, ácido m-glucurônico e o ácido acético como grupos acetila foram convertidas para hemicelulose. As massas foram divididas pelo peso seco do material inicial e multiplicadas pelo fator de hidrólise. Os fatores de conversão de glicose e celobiose e ácido fórmico para celulose são 0,90, 0,95 e 3,09 respectivamente. De maneira similar, xilose e arabinose e ácido acético foram convertidas a hemicelulose usando-se o fator de 0,88, 0,88 e 0,72. As concentrações dos compostos foram determinadas a partir de curvas de calibração traçadas para cada componente⁷⁶.

3.7.4 Determinação do teor de furfural e hidroximetilfurfural

O furfural e o hidroximetilfurfural (produtos de decomposição dos açúcares) presentes no filtrado da hidrólise da madeira livre de extrativos (3.8.1) com ácido sulfúrico 72% foram analisados por CLAE empregando-se uma coluna RP-18 (C-18), em detector de índice de refração e como fase móvel, a solução de acetonitrila - água 1:8 (v/v) com 1% de ácido acético, a um fluxo de 0,8 mL/min a 25°C⁷⁹.

As áreas médias dos cromatogramas para furfural e hidroximetilfurfural foram convertidas em hemicelulose e celulose respectivamente, utilizando-se o fator de conversão de 1,37 e 1,29⁷⁹. As concentrações dos compostos foram determinadas a partir de curvas de calibração traçadas para cada componente.

3.7.5 Isolamento de lignina em meio básico

A um reator figura 16 (usado na deslignificação) com capacidade para 500 mL foi adicionado 40g da madeira seca e uma solução de 320 mL de NaOH 4%. O reator foi bem fechado e colocado em um banho de óleo por 1 hora e 30 minutos a 150°C. Passado esse tempo, retirou-se o reator e deixou em água corrente até seu completo resfriamento. O reator foi então aberto e a amostra filtrada a vácuo usando funil de Buchner e kitassato. Lavou-se inicialmente o sólido com 100 mL de água destilada e o filtrado foi recolhido, pois nele está contida a lignina solúvel em meio básico. O sólido (polpa - madeira livre de lignina) que ficou no funil foi colocado em um pesa filtro devidamente tarado e deixado secar até peso constante⁸².



Figura 16. Da esquerda para direita estão: reator, banho e sistema de deslignificação.

3.7.5.1 Precipitação da lignina

Em um béquer de 600 mL foi adicionado o licor da primeira lavagem e lentamente adicionou-se ácido sulfúrico concentrado controlando-se o pH. Quando o pH chegou a 2 deixou-se a lignina decantar por 24 horas. A solução foi então filtrada e a lignina insolúvel foi lavada até que a solução atingisse pH= 5. A lignina foi levada a estufa a 105°C até peso constante⁸².

⁸² Silva, F.T.; *Obtenção de insumos químicos a partir do aproveitamento integral do bagaço de cana*. Tese de Doutorado. Campinas: UNICAMP/Instituto de Química, **1995**.

3.7.6 Acetilação da lignina

A acetilação foi realizada de acordo com o procedimento descrito por Lenz (1968)⁸³. Dissolveu-se cerca de 30 mg de lignina (obtida da deslignificação) em 4 mL de piridina e 4 mL de anidrido acético. A mistura foi então borbulhada por 15 minutos com nitrogênio e o frasco selado. O sistema permaneceu a temperatura ambiente no escuro durante 50 horas. Ao término da reação o excesso de anidrido acético foi destruído pela adição de 4 mL metanol. Os solventes foram evaporados sob pressão reduzida em rota-evaporador, com adição de etanol até o desaparecimento de toda piridina. As amostras foram secas em estufa à vácuo com P₂O₅.

3.7.7 Caracterização da lignina

A lignina foi caracterizada quanto à sua distribuição de massa molar, espectroscopia de ultravioleta (UV/visível), espectroscopia de infravermelho (FTIR), espectroscopia de ressonância magnética nuclear de próton (RMN de ¹H) e análise elementar da lignina *in natura* e acetilada.

3.7.7.1 Curva padrão de lignina solúvel em espectros de UV / Visível.

Uma solução estoque foi preparada dissolvendo-se cerca de 50 mg, de lignina (previamente seca em dessecador a vácuo com P₂O₅), em 100 mL de NaOH 0,01M. Foram realizadas diluições partindo-se da solução estoque 50 mg/L para a construção de uma curva de calibração. As concentrações utilizadas para a construção da curva foram: 30; 10; 5; 3; e 1 mg/L com o branco sendo a solução de NaOH 0,01M. Onde a inclinação da reta fornece o ϵ_{lig} que será usado na quantificação de lignina solúvel. As leituras foram realizadas em comprimento de onda de 280 nm usando um espectrofotômetro UV/visível. A absorção em 280 nm pode ser atribuída às estruturas quinóides e demais grupos cromóforos presentes na estrutura da lignina. Alguns destes grupos podem ser vistos na figura 17¹⁷.

⁸³ Lenz, B.L.; *Tappi Journal*; **1968**, 51, 511-519.

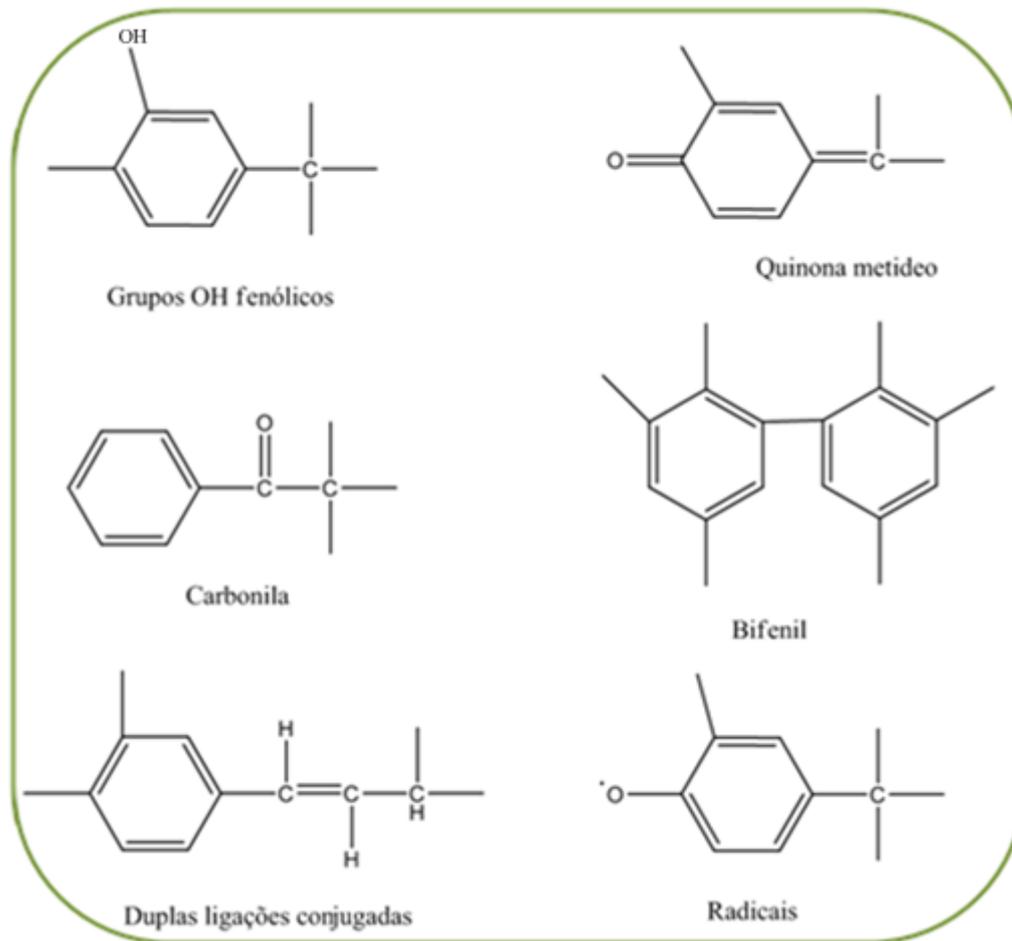


Figura 17. Cromóforos da lignina.

3.7.7.2 Espectros no Infravermelho.

Foram preparadas pastilhas de KBr contendo 0,5% de lignina (previamente secas) compactadas a 10 - 12 kgf/cm² sob vácuo. Em seguida foram medidos os espectros na região de (4000 a 400) cm⁻¹ em um espectrofotômetro FTIR.

3.7.7.3 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear - RMN de H¹

Cerca de 20 mg de lignina acetilada foram dissolvidos em 0,5 mL de CDCl₃ contendo 1% de TMS (tetrametilsilano). O espectro de RMN de ¹H de 400 MHz com pulsos de 45°, tempo de aquisição de 2,049 s perfazendo um total de 16 repetições (Tempo total: 55 s).

3.7.7.4 Determinação da fórmula mínima

Utilizando-se os valores das porcentagens de carbono, hidrogênio e nitrogênio, obtidos da análise elementar e do teor de grupos metoxilas obtidos da análise de RMN de ^1H , determinou-se a fórmula mínima para a lignina usando as expressões descritas por Freudenberg e Neish (1968). A fórmula mínima de ligninas pode ser representada pela fórmula geral $\text{C}_x\text{H}_y\text{O}_z (\text{OCH}_3)_z$, em que x, y e z são dados pelas equações 5, 6 e 7¹⁹.

$$X = \frac{277(\%H) - 27(\%OCH_3)}{2,584(\%C) - (\%OCH_3)} \quad (5)$$

$$Y = \frac{17,45(\%O) - 9(\%OCH_3)}{2,584(\%C) - 9(\%OCH_3)} \quad (6)$$

$$Z = \frac{9(\%OCH_3)}{2,5884(\%C) - 9(\%OCH_3)} \quad (7)$$

3.8 Obtenção dos extrativos da madeira (extratos brutos)

Cerca de 500 g da madeira seca foi submetida a extração a temperatura ambiente, com 500 mL de ciclohexano por 7 dias com troca de solvente a cada 48 horas, 500 mL de acetato de etila por 14 dias com troca de solvente a cada 48 horas e 500 mL de etanol absoluto por 14 dias também com troca de solvente a cada 48 horas. Em seguida os extratos foram concentrados em rotaevaporador, secos em dessecador, pesados e calculado seus rendimentos (equação 8). Com os extratos foram realizados testes de atividade larvicida e com a madeira livre de extrativos e a madeira bruta foram realizados testes de atividade fungicida com fungos da podridão branca. A figura 18 descreve o procedimento descrito acima.

O rendimento foi calculado obedecendo a seguinte equação 8:

$$\text{Ren}\% = \left[\frac{M_{ex}}{M_f} \right] \times 100 \quad (8)$$

Em que:

Ren% - rendimento dos metabólitos secundários extraídos;

M_{ex} – Massa dos extrativos secos em g;

M_f – Massa inicial da madeira seca contendo os extrativos em g.

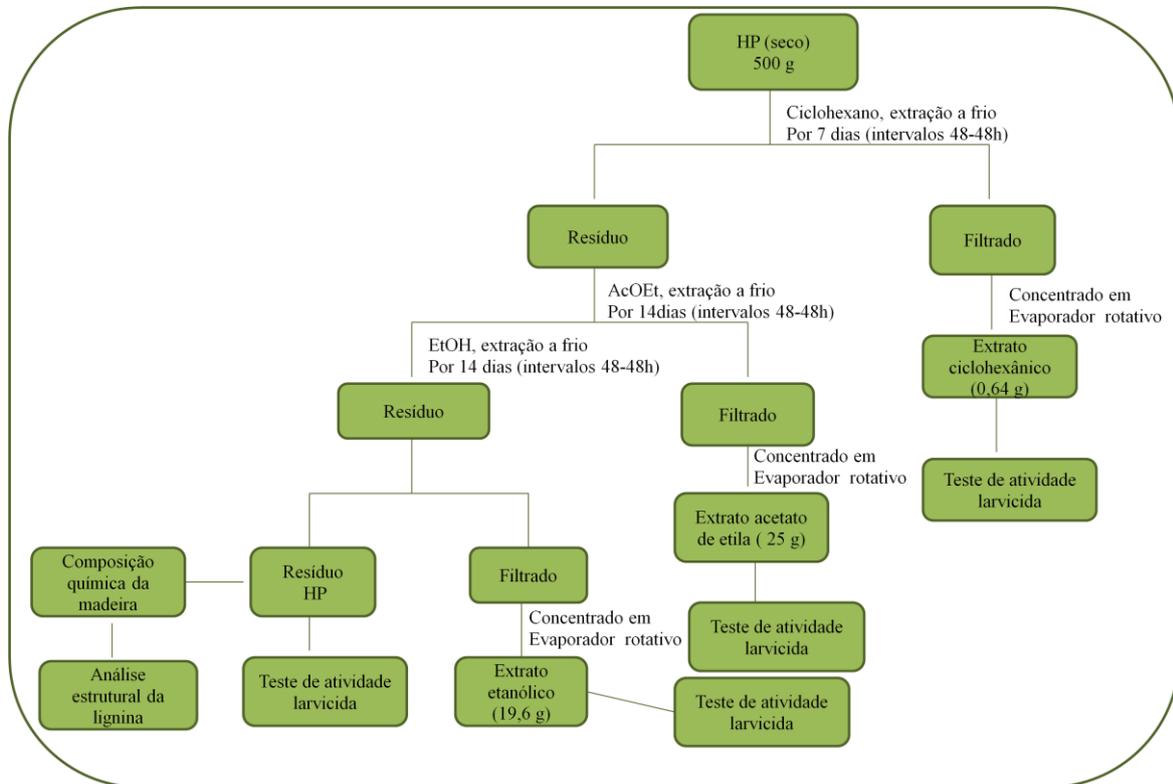


Figura 18. Esquema de análise da madeira.

3.8.1 Fracionamento do extrato acetato de etila

Cerca de 10 g do extrato acetato de etila seco foi submetido a fracionamento em coluna cromatográfica de sílica gel 60, utilizando como sistema de eluição tolueno/AcOEt (1:0 a 0:1) em gradiente crescente de polaridade. Foram coletadas 59 frações cada uma com aproximadamente 125 mL que foram posteriormente submetidas à análise em placa cromatográfica (CCD). As frações com o mesmo perfil cromatográfico foram juntadas e concentradas em rotaevaporador e pesadas para o cálculo de rendimento. As frações iniciais, HPac-A1-13, foram submetidas a cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massa CG-EM.

As frações 18 a 22 apresentaram os mesmos compostos e foram submetidas a nova coluna de sílica gel 60, em sistema tolueno/AcEt (9:1), sendo coletada 66 frações de 125 mL, com a primeira fração de 500 mL. Da coluna B foram separadas as frações de mesmo

perfil cromatográfico (HPAc-B4-6) e realizado coluna de Sephadex LH-20. O sistema eluente foi diclorometano e as subfrações coletadas foram 7 cada uma com aproximadamente 7 mL. A fração HPAc-C6 foi submetida a análise espectroscópica, sendo identificada a substância HP-1. As frações HPAc-25-27; HPAc-A36 e HPAc-A38 foram recristalizadas e identificadas utilizando-se métodos espectroscópicos como RMN de ^1H , ^{13}C , HMBC, HSQC, COSY e espectrometria de massas (LC-MS). As substâncias puras tiveram seus pontos de fusão avaliados. A figura 19 mostra o esquema de fracionamento do extrato em acetato de etila.

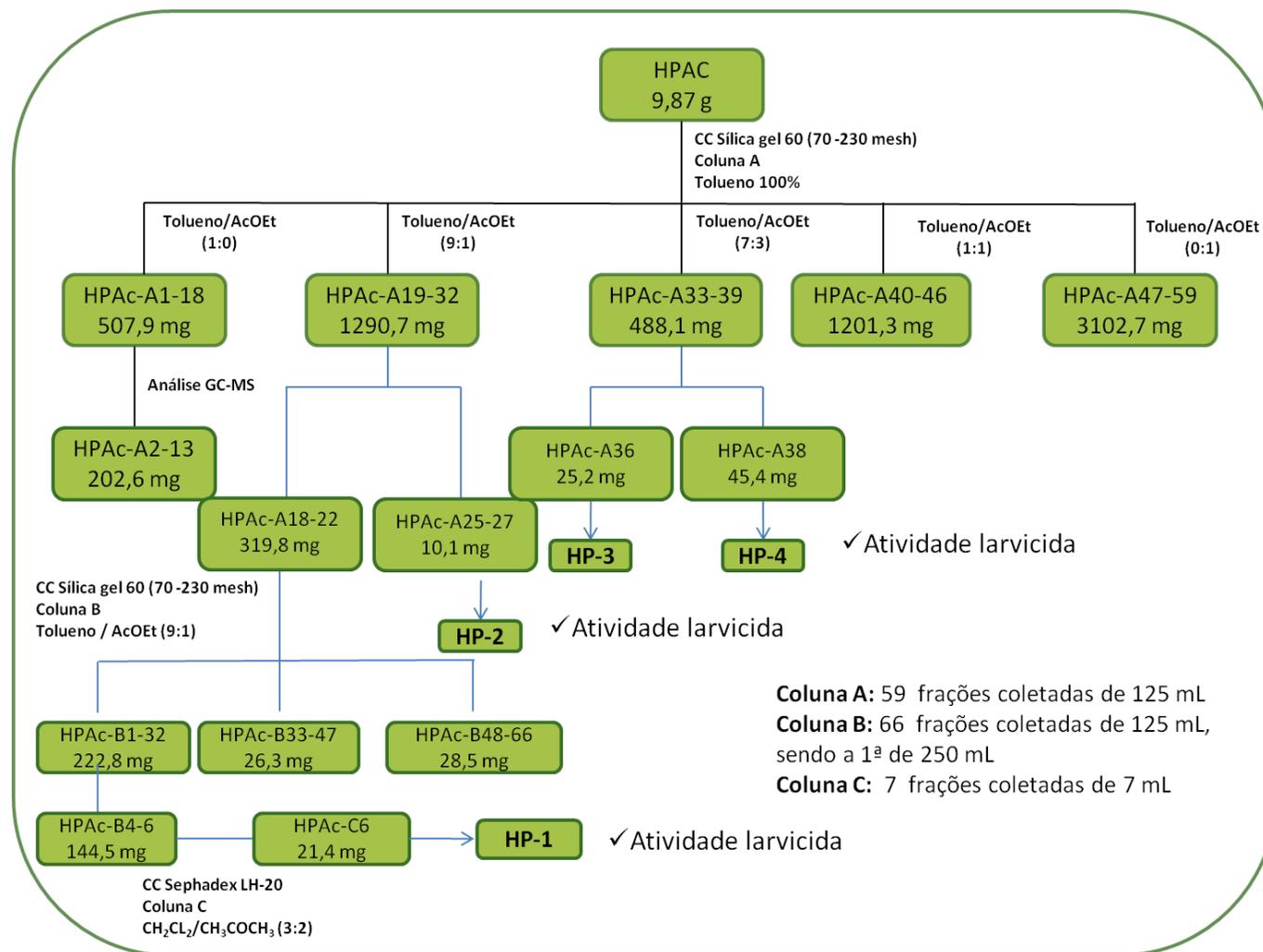


Figura 19. Esquema de fracionamento do extrato em acetato de etila.

3.9 Bioensaios

3.9.1 Teste de atividade fungicida

O teste de atividade fungicida foi realizado baseado no procedimento de Kamida e colaboradores (2005) com algumas modificações⁸⁰.

3.9.1.1 Meio de crescimento do fungo

Inicialmente o fungo foi inoculado em meio de Extrato de Malte Ágar (MEA) e incubado a 30°C por dez dias para crescimento. O meio é composto de 15 g de extrato de malte, 15 g de ágar, 1L de água potável e pH neutro.

3.9.1.2 Preparação das amostras para inóculo

Cerca de 5 g da madeira: sem extrativos (MSE), com extrativo (MCE) e a madeira com extrativos para controle abiótico (MCA) foi adicionado a três diferentes erlenmeyers de 125 mL. Estes foram autoclavados (15min 121°C e 1 atm) para eliminar quaisquer outros microorganismos/fungos que possa crescer no meio. As análises foram realizadas em triplicatas e aos erlenmeyers (MSE) e (MCE), contendo a madeira, foram adicionados 1 mL de água potável e três bloquinhos de ± 6 mm contendo o fungo crescido e inoculado. Os erlenmeyers foram incubados em estufa a 30°C por 30 dias para posterior observação do crescimento dos fungos.

3.9.2 Teste de atividade larvicida

Os extratos C₆H₁₂, AcOEt e EtOH de *H. petraeum* foram dissolvidos em EtOH (5%), com exceção do extrato C₆H₁₂ que usou também Twin 80, as soluções com diferentes concentrações (250, 100 e 50 mg/L) foram preparadas com água destilada e posteriormente adicionadas sobre uma população de 20 larvas do mosquito *Aedes aegypti* em desenvolvimento larvar L4 (Figura 20), a fim de determinar a ação larvicida dos extratos. As

⁸⁰ Kamida, H.M., *et al.*; *Química Nova* **2005**, 28, 629-632.

leituras das larvas vivas foram realizadas em 24 e 48h e o grupo controle foi tratado com água destilada em EtOH (5%)⁸¹. Para as substâncias isoladas foram realizados os ensaios preliminares com diferentes concentrações (ppm) para identificar a concentração de maior mortalidade e a partir destes resultados determinar a concentração capaz de matar 50% das larvas (LC₅₀). Foi dissolvida a amostra em DMSO (0,7 mL) mais um gota de Tween80 ou acetona (0,7 mL) e adicionado água destilada em volumes diferentes (dependendo da concentração) e 20 larvas do mosquito *Aedes aegypti* em desenvolvimento larvar L4. Os valores da LC₅₀ foram calculados estatisticamente pelo Probit Analysis utilizando o software StatusPlus 2006⁸² e todas as análises foram realizadas em triplicata.



Figura 20. Larvas do *Aedes aegypti* no estágio L4.

⁸¹ W.H.O. *Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides*. World Health Organization, VBC 81.807, **1985**.

⁸² Fiocruz; *Manutenção de Aedes aegypti em laboratório*. Laboratório de fisiologia e controle de artrópodes vetores, Rio de Janeiro, **2007**.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Resultados do screening fitoquímico

A abordagem fitoquímica, utilizada para evidenciar quais classes de metabólitos secundários predominam na madeira de *H. petraeum*, revelou a presença de alcalóides, flavonóides, terpenos e esteróides (tabela 3). Flavonóides são comuns em espécies da família Leguminosae e subfamília Papilionoideae³⁵. Malan e Swinny (1990), analisando o extrato hexânico da madeira de *Virgilia oroboides*, isolaram e identificaram flavonóides, isoflavonóides, dois pterocarpanos e um pterocarpeno⁸³. A presença de alcalóides foi investigada por Balandrin e colaboradores (1982). Eles reportaram alcalóides quinolizídínicos e dipiperidínicos em várias espécies de madeiras de papilionoideae⁸⁴. Os terpenos também foram isolados em estudo realizado por Herath e Silva (2000) que isolaram um triterpeno da espécie *Gliricidia sepium* (papilionoideae)⁸⁵, bem como a investigação da rota de evolução dos terpenos em espécies *Swartzia Schreb* estudada por Magalhães e colaboradores (2010)⁸⁶.

Tabela 3. Abordagem fitoquímica.

Classe de compostos	Resultados
Alcalóides	+
Flavonóides	+
Saponinas	-
Taninos	-
Terpenos e esteróides	+

(-) indica ausência de compostos.

⁸³ Malan, E.; Swinny, E.; *Phytochemistry* **1990**, 29, 10: 3307-3309.

⁸⁴ Balandrin, M. F.; Robbins, E. F.; Kinghorn, A. D.; *Biochemical Systematics and Ecology* **1982**, 10, 4: 307-311.

⁸⁵ Herathu, H. M. T. B.; Silva, S. de; *Fitoterapia* **2000**, 71: 722-724.

⁸⁶ Magalhães, A. F., *et al.*; *Eclética química* **2010**, 35, 3: 169-177.

4.2 Resultados das análises quantitativas

4.2.1 Teor de umidade e extrativos

Uma habitual fonte de problemas para a madeira reside no contato com a água ou umidade elevada. Quando a madeira permanece em condições de umidade elevada por períodos longos, pode ser atacada por organismos xilófagos que dela se alimentam⁸⁷. A umidade, por si só, não degrada a madeira, mas potencializa o risco de degradação deste material por agentes biológicos, no sentido de que estes só atacam a madeira quando o seu teor em água atinge valores acima de 20%³¹. A umidade presente em *H. petraeum* (8,3 ±0,3%) apresentou valores abaixo de 20%. Isso representa um percentual considerado insignificante para influenciar nas características químicas, físicas e biológicas que facilitam o ataque dos organismos xilófagos.

O teor de extrativos total obtido foi de 9,0%. De acordo com a tabela 4 o maior percentual está na extração responsável pela remoção dos compostos de média e alta polaridade, AcOEt e EtOH respectivamente. Neles estão presentes os compostos fenólicos, alcalóides, alcoóis, entre outros. Enquanto o solvente de baixa polaridade, ciclohexano, remove óleos essenciais, ceras, graxas, gorduras, resinas, terpenos, esteróides, entre outros⁸⁸. Um grande número de pesquisas tem sido realizado com o objetivo de investigar a resistência dos extrativos a organismos xilófagos. Santana e colaboradores (2010) estudaram a resistência dos extrativos de três madeiras, *Bowdichia virgilioides* (sucupira), *Anadenanthera colubrina* (angico-de-carçoço) e *Hymenaea stigonocarpa* (jatobá-do-cerrado) contra os cupins *Nasutitermes corniger* Motschulsky. O extrato polar da madeira *Bowdichia virgilioides* (papilionoideae) apresentou maior resistências aos térmitas que as demais madeiras estudadas, com o LC₅₀ de 7,2 mg.mL⁻¹, enquanto que as madeiras *A. colubrina* e *H. stigonocarpa* apresentaram LC₅₀ maior que 10 mg.mL⁻¹ (51).

⁸⁷ Cruz, H.; *Patologia, avaliação e conservação de estruturas de madeira*. Núcleo de Estruturas de Madeira, Laboratório Nacional de Engenharia- Lisboa, 1994.

⁸⁸ Swain, T.; *Flavonoids*; ARC Laboratory of Biochemical Systematics, Royal Botanic Gardens, England, 1976.

Tabela 4. Percentual de extrativos da madeira *H. petraeum*.

Extração com os solventes	<i>H. petraeum</i>	
	g	%
Ciclohexano	0,6392	0,13
Acetato de etila	25,002	5,00
Etanol	19,633	3,93
Total	45,274	9,05

4.2.2 Composição química total da madeira

A reação de hidrólise ácida das madeiras, geralmente fornece os seguintes açúcares monoméricos: glicose, xilose, galactose, arabinose e manose, isto ocorre devido a clivagem das ligações glicosídicas dos polissacarídeos com a adição de água acidificada⁸⁹. A hidrólise ácida também favorece a formação de alguns subprodutos (figura 21), os mais comuns são: ácido acético, ácido levulínicos, ácido 4-O-metilglucurônico, ácido glucurônico, hidroximetilfurfural e furfural⁹⁰.

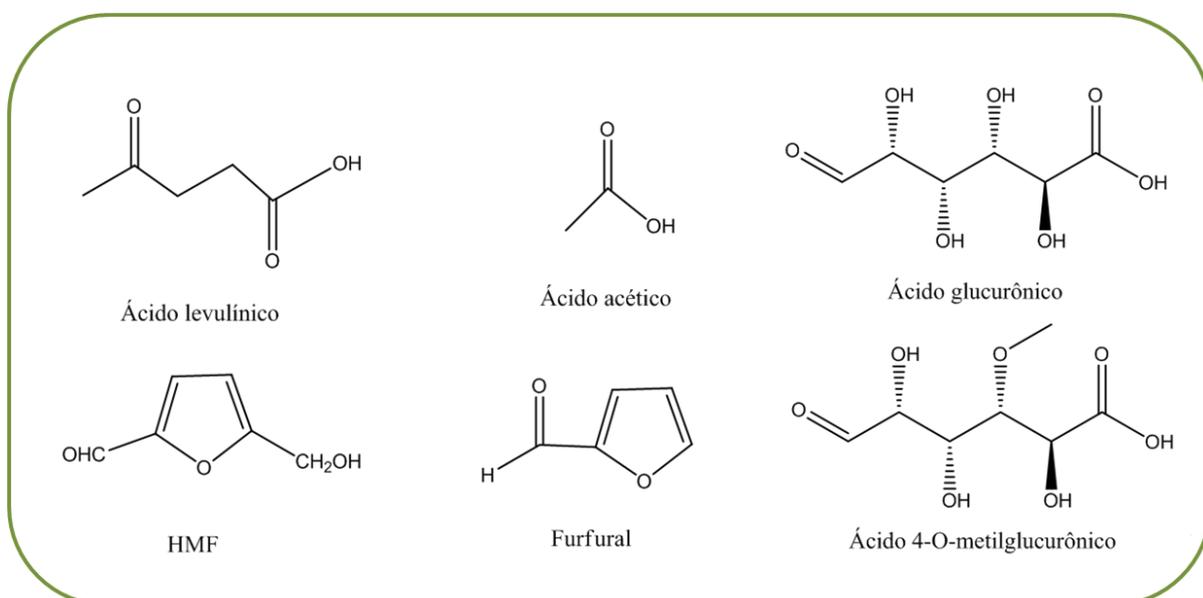


Figura 21. Produtos da decomposição da celulose e hemicelulose.

⁸⁹ Kaar, W. E. *et al.*; *J. Wood Chem. Technol* **1991**, 11: 447–463.

⁹⁰ Santana, M. A. E.; Okino, E. Y. A.; *Holzforchung* **2007**, 61: 469–477.

A quantificação dos compostos químicos presentes *H. petraeum* está apresentada na tabela 5, nela pode-se observar o percentual de glicose, xilose, hidroximetilfurfural e ácido acético (grupo acetil), bem como arabinose. Estes valores foram comparados com os dados da literatura⁹⁰. Na quantificação de arabinose foi obtido um percentual de 0,83 ±0,07%, enquanto que Santana e Okino não detectou a presença de arabinose na sua madeira. Não foi possível comparar os percentuais de celobiose e furfural uma vez que não foram encontrados dados na literatura para esta planta. Os teores de manose, galactose, ácido levulínico e anidrido urônico, não foram realizados neste estudo.

Tabela 5. Composição química da madeira *H. petraeum* em %.

Composição da madeira		<i>H. petraeum</i>	<i>H. petraeum</i> *
Celulose	Glicose	35,7 ±0,1	45,9
	Celobiose	3,22 ±0,02	NR
	HMF	0,2252 ±0,0001	0,5
	Xilose	8,7 ±0,1	11,6
	Arabinose	0,83 ±0,07	-
	Manose	NR	2,0
Hemicelulose	Galactose	NR	1,4
	Furfural	0,458 ±0,003	-
	Ácido glucurônico	1,9 ±0,1	2,0
	Ácido levulínico	NR	1,0
	Acido acético	0,799 ±0,005	1,9
Lignina	Solúvel	0,65 ±0,03	1,3
	Insolúvel	33,0 ±0,2	30,3
Extrativos		9,0 ±1	4,4
Cinzas		0,8 ±0,1	0,4
Total		95,3	102,7

* Resultados obtido por Santana e Okino; (-) Ausência; (NR) Não realizado

Os teores de lignina insolúvel (33,0 %) comportam-se de acordo com a faixa da literatura para madeiras de folhosas de 20 a 35%¹³ e corroboram com os valores obtidos para a espécie *H. petraeum* estudada por Santana e Okino (2007) de 30,3 %, no entanto, os valores de lignina solúvel foram para estes autores de 1,13 % e neste trabalho de 0,65

%. Esta diferença pode ser explicada pela forma como foi realizada a hidrólise ácida, ou seja, quanto mais eficiente for o tratamento para a remoção da lignina na sua forma insolúvel, menor será a quantidade de lignina solúvel detectável.

O percentual dos extrativos (9,05%) está compreendido dentro da faixa 2-10%²⁹⁻³⁰ e o resultado obtido difere dos resultados obtidos por Santana e Okino (2007) que encontrou 4,4% para o total de extrativos. A razão das diferenças encontradas está nos métodos de extração empregados. Santana e Okino (2007) utilizaram apenas etanol/tolueno (1/2) na extração dos extrativos e neste trabalho usou-se extrações sucessivas com ciclohexano, acetato de etila e finalmente etanol na remoção dos extrativos, que torna o método de extração muito mais eficiente.

O teor de cinzas é a fração que permanece como resíduo, após a combustão do carvão vegetal e incluem compostos inorgânicos como carbonatos e oxalatos. Variam de 0,5% a mais de 5% em madeiras, dependendo da espécie, da quantidade de casca e da presença de terra e areia. A análise de cinzas de *H. petraeum* forneceu um valor de 0,8%, dentro da faixa dos valores de cinzas em madeiras segundo Pereira (2000)⁹¹. Os componentes minerais são fontes de nutrientes para as plantas. Os resíduos inorgânicos são constituídos basicamente de K, Na, Ca e Mg em maior quantidade e Al, Fe, Cu, Mn e Zn em menor quantidade. As plantas tropicais apresentam em sua composição silícios, presentes predominantemente na forma de sílica, e também estruturalmente ligados aos carboidratos⁹².

A composição química total da madeira foi de 95,3%, como era de se esperar o percentual foi inferior a 100%, um dos motivos deve-se a ausência de algumas análises, como é o caso da quantificação de manose, galactose, ácido 4-O-metilglucurônico e ácido levulínico, bem como erros experimentais.

4.2.3 Resultado dos teores de fenóis totais e flavonóides

A curva de calibração para determinação dos fenólicos totais, usando ácido gálico como padrão, foi definida pela equação $y = 0,0046x - 0,00037$ ($R^2 = 0,996$) como descrito na figura 22.

⁹¹ Pereira, J.C.D. *et al.*; Colombo: Embrapa Florestas; Embrapa Florestas - Documentos, **2000**, 38, 113p.

⁹² Santana, M. A. E. e Rodrigues, L. C.; *Ver. floresta e ambiente*; **2005**, 12, 1: 57- 62.

O teor de fenóis totais para *H. petraeum* foi de 48,93 mg.g⁻¹ de equivalente grama de ácido gálico. O processo de determinação do teor de fenóis totais consiste numa reação de oxidação e redução, em meio alcalino, na qual o íon fenolato é oxidado e o complexo fosfotúngstico-fosfomolibídico presente no reagente de Folin-Ciocalteu é reduzido a uma mistura de óxido de tungstênio e molibdênio de cor azul. Quanto maior a concentração de fenóis totais mais óxidos reduzidos são formados e maior será a coloração azul obtida (absorção máxima entre 725 e 760 nm)⁹³.

Oliveira e colaboradores (2010) estudaram a resistência de cinco madeiras e observaram que as madeiras mais resistentes apresentaram maior teor de fenóis totais¹⁵. Queiroz e colaboradores (2002) também observaram que a elevada quantidade de extrativos fenólicos é o principal responsável pela larga resistência natural de madeiras de lei à degradação química e biológica⁹⁴.

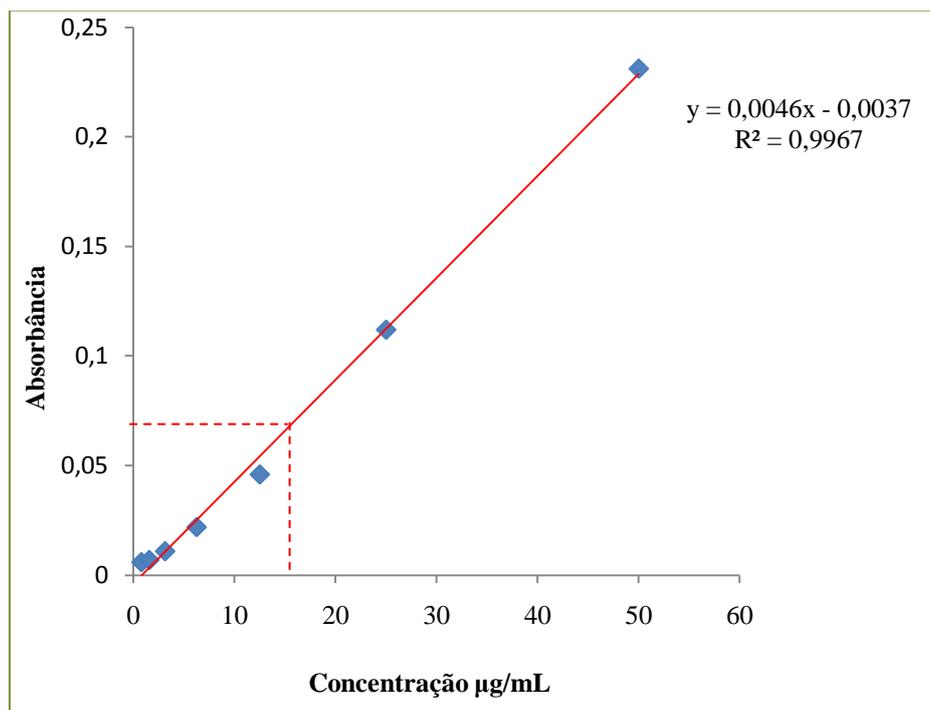


Figura 22. Curva padrão do ácido gálico.

⁹³ Sousa, C. M. de M., et al; *Quim. Nova* **2007**, 30, 2: 351-355.

⁹⁴ Queiroz, C. R. A. dos A.; Morais, S. A. L. de; Nascimento, E. A. do; *Rev. Árvore* **2002**, 26, 4: 493-497.

A curva de calibração para determinação dos flavonóides, usando rutina como padrão, foi definida pela equação $y = 0,0318x - 0,0176$ ($R^2 = 0,9806$) como descrito na figura 23.

O valor de flavonóides para *H. petraeum* foi de $4,72 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, este resultado confirma a presença de flavonóides na madeira detectada na abordagem fitoquímica (Tabela 5). Observa-se que a concentração de flavonóides é relativamente baixa em relação a concentração de compostos fenólicos. Como os compostos fenólicos de madeiras são formados principalmente por fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados de ácidos benzóico e cinâmico), cumarinas, flavonóides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas⁹³ e a concentração de flavonóides foi baixa em relação a concentração de fenóis totais, bem como pela abordagem fitoquímica verificou-se a ausência/baixa presença de taninos é possível afirmar que os compostos que estão contribuindo significativamente na composição dos fenóis totais são principalmente os fenóis simples, a lignina e os ácidos fenólicos.

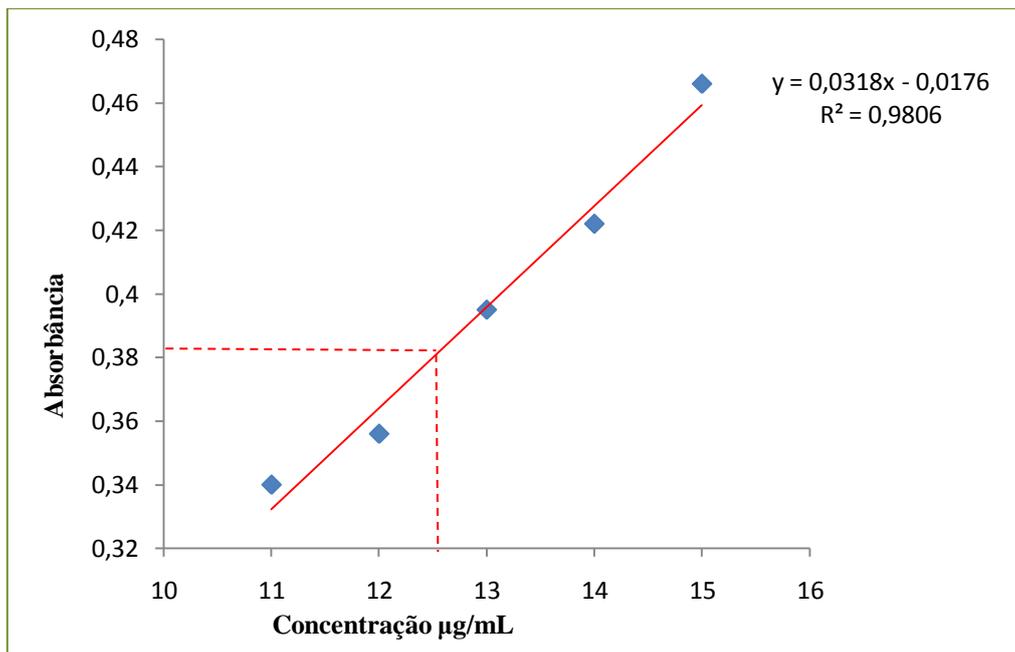


Figura 23. Curva padrão de rutina.

4.3 Identificação da estrutura da lignina

4.3.1 Resultados do IV da lignina

A espectroscopia no infravermelho é uma técnica muito utilizada para a caracterização dos constituintes de uma molécula, pois, permite determinar os tipos de ligações e grupos funcionais. A caracterização dos picos de absorção no IV se faz principalmente de modo qualitativo, por comparação com dados da literatura⁹⁵. As absorções mais frequentes em ligninas são as deformações angulares e axiais das ligações O-H, C-H, C=C (aromático), C=O e C-O-C. Outra característica que diferencia os espectros de ligninas está principalmente na proporção de grupos p-hidroxifenil, guaiacil e siringil.

A lignina em madeiras folhosas tem a predominância dos grupos G e S²⁴. Os espectros de IV da lignina foram analisados de acordo com os dados do FTIR de ligninas de madeiras e plantas realizadas por Lim e Dence em 1992. Na tabela 6 estão descritos os picos de absorção no infravermelho de ligninas de folhosas, segundo Lim e Dence⁹⁶.

⁹⁵ Tai, D.S.; Chen, C.L.; Gratzl, J.S.; *Wood Chem Technol* **1990**, 10, 111.

⁹⁶ Lim, S. Y.; Dence, C. W.; *Methods in lignin chemistry*. Springer Verlag, Berlin, **1992**, 578p.

Tabela 6. Atribuições dos picos de absorção no IV de ligninas de acordo com Lim e Dence (1992).

Faixa de Absorção (cm ⁻¹)	Atribuição (folhosas)
3490-3400	Estiramento O-H
3000-2960	Estiramento C-H de aromáticos;
3000 – 2840	Estiramento C-H de metila e/ou metileno
1735-1700	Estiramento C=O de cetonas não conjugada, carbonila em grupos ésteres e ácidos carboxílicos
1675 – 1650	Arilcetonas (C=O) conjugada
1593	Vibrações do anel aromático em associação com C=O; S>G
1515 – 1505	Vibração de anel aromático C=C para G>S
1470 – 1460	Deformação C-H (assimétrica) de grupos -CH ₂ - e CH ₃
1430 – 1415	Vibração C-C do anel aromático
1275-1270	Vibração C-O-C do anel guaiacílico
1240-1230	Vibração C-O-C do anel siringílico
1085 - 1030	Deformações C-O de alcoóis primários mais estiramento C-O não conjugado; Deformação C-H aromática no plano (G>S)
915-815	Deformação C-H aromática fora do plano
840	Deformação de C-H de aromáticos vicinais fora do plano, nas posições 5 e 6 de unidades guaiacila e nas posições 2 e 3; 5 e 6 de unidades p-hidroxifenila

Os resultados da análise de IV para a lignina *in natura* e acetilada podem ser observados na figura 24. O espectro de IV da lignina *in natura* apresentou um sinal em 3397 cm⁻¹ correspondente ao estiramento do grupo OH. Na lignina acetilada esse sinal é bastante reduzido o que implica dizer que, a reação de acetilação converteu os grupos OH da lignina em OCOCH₃.

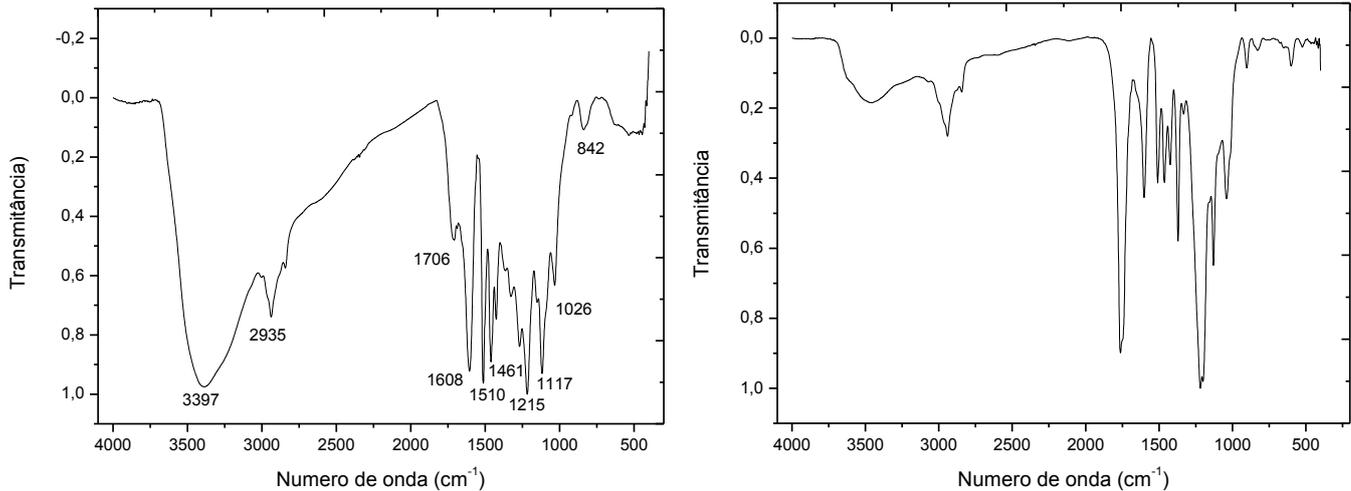


Figura 24. Espectroscopia de FTIR da lignina *in natura* (esquerda) e acetilada (direita).

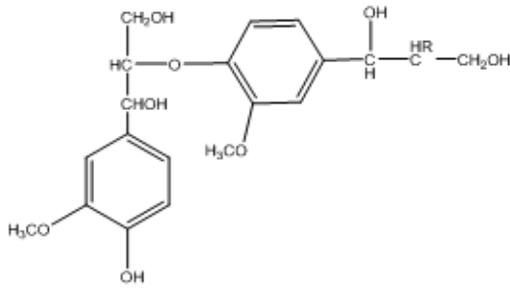
O pico em 2935 cm^{-1} corresponde ao estiramento C-H de alifáticos e arila. A banda em 1706 cm^{-1} é relacionada a região de absorção do grupo carbonila não conjugado ao anel aromático, observa-se uma maior intensidade desse sinal no espectro da lignina acetilada, isto se deve ao aumento da oxidação de lignina bem como o aumento do grupo acetila. Esse sinal também pode ser observado na lignina *in natura*, porém com intensidade menor. O principal motivo para evidenciar o sinal de carbonila também na lignina bruta está na forma como ocorrem as ligações entre as unidades da lignina. Como a lignina é uma macromolécula suas unidades não se ligam de forma regular, portanto, é possível obter algumas subestruturas da lignina, estas por sua vez são identificadas de acordo com o tipo de ligação entre os seus monômeros. Algumas subestruturas da lignina estão representadas na tabela 7⁹⁷.

Tabela 7. Subestruturas da lignina.

Subestruturas da lignina	Tipos de ligação
	5-5'

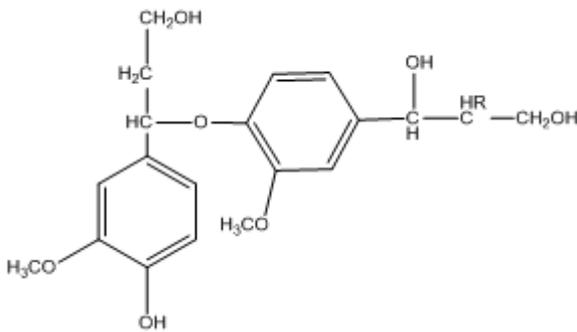
⁹⁷ Veloso, D. P., Nascimento, E. A. e Morais, S. A. L. de ; *Química nova*; **1993**, 16, 5: 435-448.

(1)



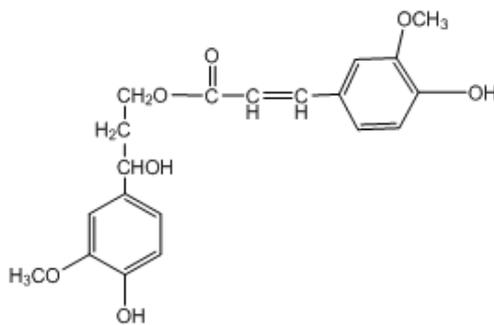
β -O-4'

(2)



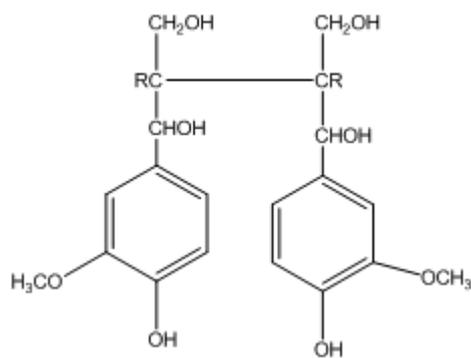
α -O-4'

(3)



γ - γ'

(4)



β - β'

(5)

As bandas em 1117 e 1215 cm^{-1} , segundo Lim e Dence (1992), são características das vibrações de deformações C-H fora do plano dos anéis siringila e guaiacila substituído na posição 5. Como também das deformações C-H de aromáticas no plano das unidades siringila. As bandas entre 1510 -1610 cm^{-1} , obtidas representam as vibrações do anel aromático das unidades guaiacila e siringila respectivamente, e a razão entre suas intensidades (1,0/0,9 de G/S)⁹⁸. Para Ibarra e colaboradores (2005) a intensidade dos sinais 1329 cm^{-1} e 1270 cm^{-1} , para a lignina de eucalipto, correspondiam às vibrações C-O dos anéis G e S respectivamente e a intensidade era indicativo da maior quantidade desses grupos⁹⁹. O sinal em 842 cm^{-1} corresponde, de acordo com Lim e Dence, a deformação C-H de aromáticos vicinais fora do plano. Neste caso esse sinal representa as posições 5 e 6 das unidades guaiacila e todas as posições das unidades p-hidroxifenila⁹⁷. A absorção compreendida na região 1150-1170 cm^{-1} representa absorções características de C-O de grupos ésteres¹⁰⁰ conjugados comuns em ligninas.

O infravermelho forneceu a informação quanto a presença dos grupos guaiacila e siringila, comuns em madeiras de folhosas, bem como a presença de alguns grupos funcionais que se sobressaem na macromolécula, como o caso dos hidroxílicos alifáticos e aromáticos, éteres, carbonilas e metoxilas.

4.3.2 Resultados do RMN de ^1H da lignina

As ligninas são substâncias de alto peso molecular, que em soluções apresentam alta viscosidade, suas moléculas possuem pouca mobilidade e por esta razão a obtenção de sinais bem definidos no espectro de RMN de ^1H se torna difícil²⁴. Esses espectros apresentam-se com bandas bastante largas e de difícil identificação. Embora alguns desses sinais não estejam completamente resolvidos, a integração das regiões do RMN de ^1H (Figura 25, Tabela 8) é utilizada para estimar o grau de substituição do anel

⁹⁸ Sarkanen, K. V. e Ludwig, C. H.; *Lignins: Occurrence, formation, structure and reactions*. New York, John Wiley, 916, **1971**.

⁹⁹ Ibarra, D., et Al.; *J. Anal. Appl. Pyrolysis*; **2005**, 74 : 116–122.

¹⁰⁰ Hesse, M., Meier, H. e Zeeh, B.; *Spektroskopische methoden in der organischen chemie*; Georg Thieme verlag Stuttgart, New York, **1995**.

aromático e os teores dos grupos funcionais da lignina, tais como hidroxilas alifáticas e aromáticas, metoxilas, entre outras (Tabela 7)¹⁰¹.

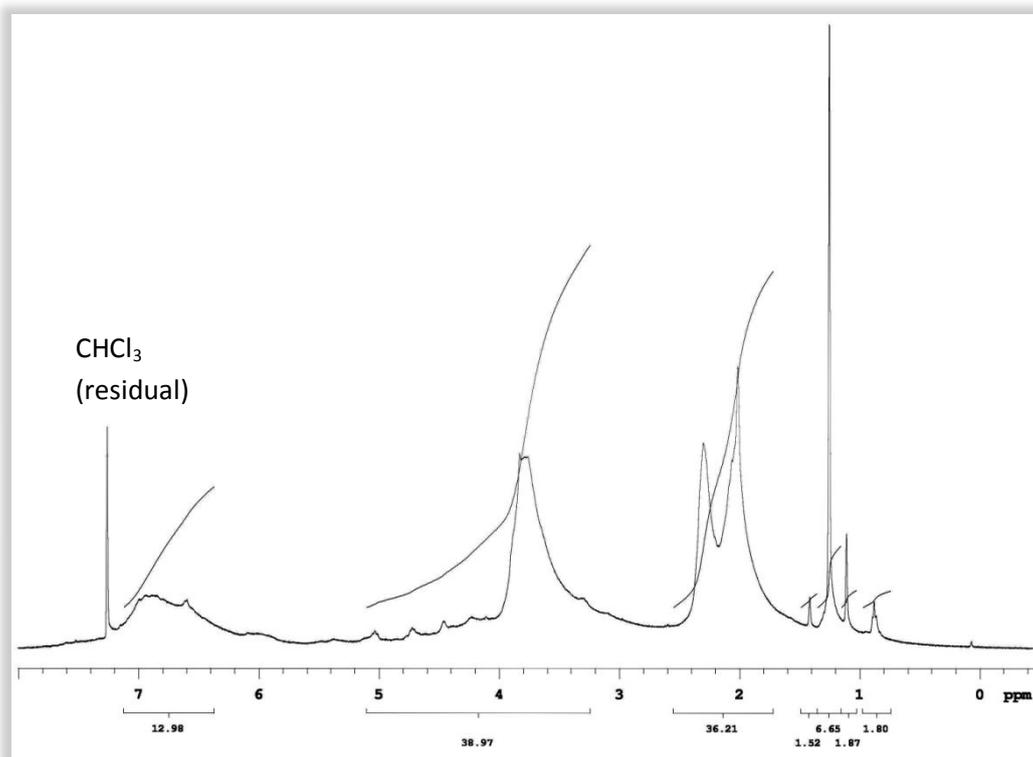


Figura 25. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) da lignina acetilada (400 MHz, CDCl_3).

Tabela 8. Sinais do espectro de RMN de ^1H da lignina acetilada

δ (ppm)	Atribuição dos prótons
6,20-7,20	Região de prótons aromáticos e vinílicos
4,00-5,20	Região de prótons α , β e γ da cadeia alifática
3,40-4,0	Prótons metoxilas
1,60-2,40	Região de prótons alifáticos do grupo acetoxila do anel aromático
<1,60	Região de prótons alifáticos não oxigenados

¹⁰¹ Guerra, A., et al.; *Applied and Environmental Microbiology*; **2004**, 70, 7: 4073–4078.

Os sinais com deslocamento químico por volta de 7,00 ppm são atribuídos aos prótons do anel aromático dos alcoóis (p-cumarílico, coniferílico e sinapílico) bem como dos prótons vinílicos: α e β em Ar-HC=CH-CHO e α em $\text{Ar-HC=CH-CH}_2\text{OAc}$ ¹⁰². Esses sinais são atribuídas aos prótons aromáticos em unidades propano-siringila (6,7-6,8 ppm) e propano-guaiacila (7,0 ppm)¹⁰³.

Observa-se que o sinal característico dos prótons da metoxila ($\sim 3,80$ ppm) apresenta intensidade comparável aos prótons do grupo acetoxila, portanto, a relação de prótons metoxilas com prótons acetoxilas é praticamente de 1/2:1. A estrutura que melhor representa este tipo de unidade é o grupo guaiacila (apresenta 1 metoxilas na sua composição). Os hidrogênios: α e β das estruturas 2 e 3 da tabela 7, apresentam dois sinais em 5,1 e 4,7 ppm, respectivamente. Os sinais em 4,2 e 4,4 ppm são representados pelos H γ de varias unidades da lignina, (Tabela 7, Estrutura 4)¹⁰⁴.

Chen e colaboradores afirmaram que os sinais em 3,1-3,20 ppm são característicos do H- β , em estruturas β - β' (Tabela 7, Estrutura 5)¹⁰⁰. Esse sinal é evidenciado no espectro da lignina acetilada, porém com baixa intensidade. Os sinais a 1,60 ppm e a 2,60 ppm são originários de hidroxilas alifáticas e fenólicas, respectivamente. Os resultados corroboram com os obtidos no espectro de FTIR da lignina acetilada. Os sinais <1,6 ppm são atribuído ao CH₃ e CH₂ em cadeias alifáticas saturadas.

A estrutura da lignina apresentou ligeira predominância de grupos guaiacila em relação ao grupo siringila resultado que foi evidenciado também no espectro de infravermelho e o ¹H-RMN também forneceu evidências da presença de algumas subunidades de lignina ($5\text{-}5'$; $\beta\text{-O-}4'$; $\alpha\text{-O-}4'$ e demais descritas na tabela 7).

4.3.3 Resultados da análise elementar de lignina

Os resultados da análise elementar de lignina *in natura* e acetilada estão descritos na tabela 9.

¹⁰² Chen, C.L. e Robert, D.; *Methods in Enzymology*; **1988**, 161: 137-175,.

¹⁰³ Faix, O.; *Holzforchung*; **1991**, 45: 21-27.

¹⁰⁴ Lundquist, K.; *Acta chemica Scandinavia*; **1979**, B33: 418-420.

Tabela 9. Dados da análise elementar de lignina da madeira *H. Petraeum*.

Amostra	%N	%C	%H	%O
Lignina <i>in natura</i>	1,11	57,506	4,97	36,41
Lignina acetilada	1,2	61,658	5,04	32,10

A análise da fórmula mínima de ligninas foi realizada utilizando os valores da análise elementar e o percentual de metoxilas foram obtidos do espectro de RMN de ^1H . Esses percentuais variam para madeiras de coníferas de 12 a 16% e para madeiras de folhosas de 18 a 22%¹⁰⁵. O percentual de metoxila para *H. petraeum* foi determinado a partir da integração da área total que corresponde a 100 unidades arbitrárias e está relacionada a 5,038 prótons. Enquanto que, pela integração da região das metoxilas (δ_{H} 3,20-4,00) a área obtida foi de 20 unidades arbitrárias. Como a área total corresponde a 100 então o percentual de metoxilas representa 20% do total. Observa-se que a quantidade de metoxilas para *H. petraeum* está coerente com os dados encontrados para madeiras de folhosas. O percentual de nitrogênio é desprezado, pois valores ($< 1,5\%$) são desconsiderados¹⁰⁶, então usando as equações 5, 6 e 7 e os percentuais da tabela 9 foi possível chegar a seguinte expressão para a fórmula mínima da lignina acetilada $\text{C}_{9,00} \text{H}_{6,14} \text{O}_{4,14}(\text{OCH}_3)_{1,4}$.

Ligninas contendo menos que um mol de metoxilas por unidade C_9 (OCH_3/C_9) são do tipo guaiacila, quando essa relação for $> 1,0$ as ligninas são do tipo guaiacila-siringila¹⁹. Portanto, a lignina da madeira *H. petraeum* apresentou uma relação de 1,40/ C_9 o que implica dizer que esta lignina é do tipo guaiacila-siringila. Estes resultados corroboram com os evidenciados nas análises de Infravermelho e ^1H -RMN. Verificou-se ainda que a relação entre esses grupos é proporcionalmente diferente, isto é, uma relação simples permite calcular a porcentagem de unidades guaiacila, a partir do teor de metoxila: $\%G=100 (2- n^\circ\text{OCH}_3)^{105}$. O percentual de guaiacila na madeira é de 60%, enquanto que o de siringila é de 40%. No espectro de infravermelho, bem como no RMN de ^1H essa relação também é confirmada.

¹⁰⁵ Veloso, D. P.; *Química nova* **1993**, 16, 5: 435-448.

¹⁰⁶ Gonçalves, A. R. *et al*; *J. Braz. Chem. Soc.*; **2000**, 11, 5: 491-494.

4.4 Identificação das estruturas químicas isoladas do extrato em acetato de etila

A bioatividade dos extratos frente às larvas do mosquito *A. egypti*, indicou que o extrato em acetato de etila apresentava-se o mais ativo quando comparado com o extrato em cicloexano e etanol. Este extrato foi então escolhido para estudo e submetido a fracionamento cromatográfico usando sílica gel 60 em sistema Tolueno/AcOEt 1:0 em gradiente de polaridade até 0:1. Foram coletadas 59 frações e analisadas por CCD e as frações com o mesmo perfil cromatográfico foram reunidas.

As frações iniciais da coluna (HPAc-A2-13) foram submetidas a análise de GC/MS, e os compostos presentes foram identificados por comparação com dados da biblioteca WILEY considerando o grau de similaridade acima de 90%, bem como baseados nos dados da literatura (Figura 26, Estruturas 1, 2 e 3).

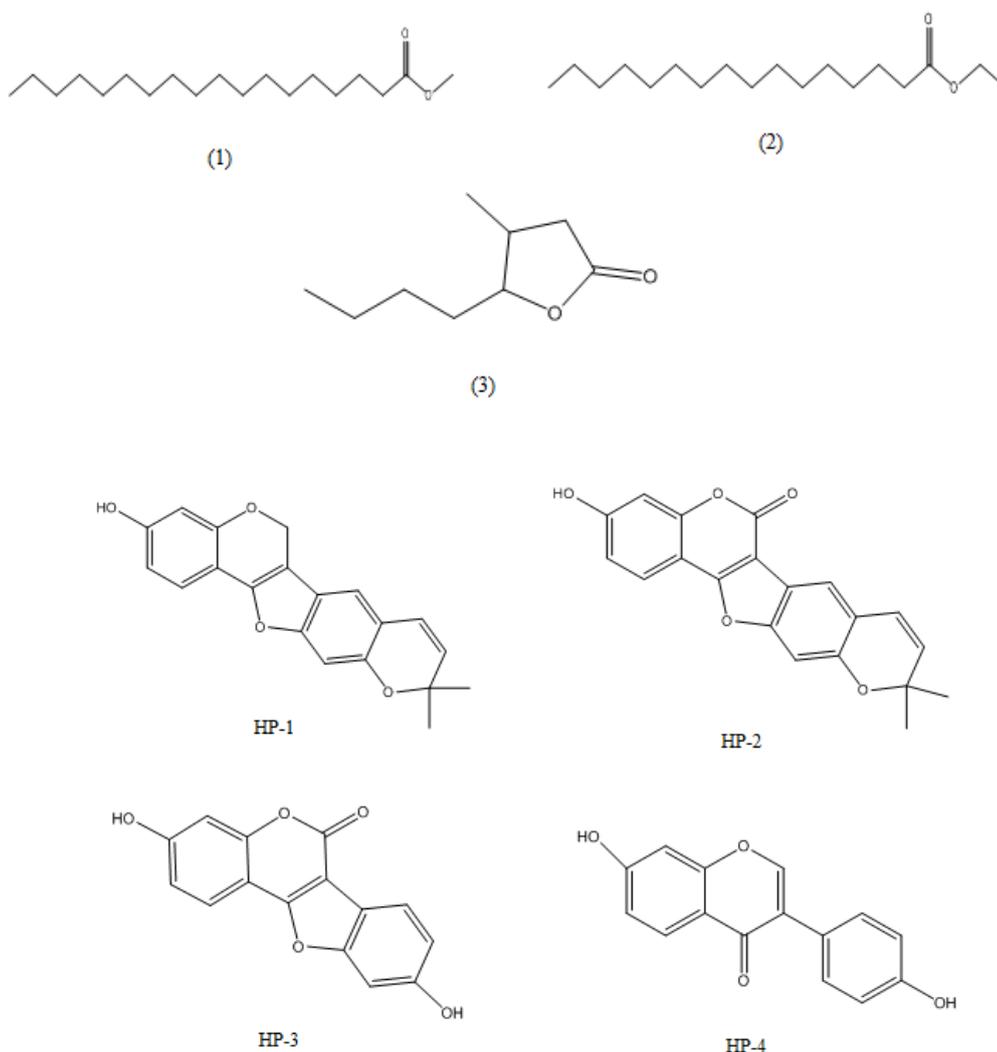


Figura 26. Substâncias identificadas no estudo da madeira *H. Petraeum*.

A técnica de GC/MS é bastante utilizada na determinação da massa molecular, bem como na caracterização estrutural e análises qualitativas e quantitativas dos componentes de uma mistura complexa de baixa polaridade.

As frações 18-22 (Figura 19, pag. 45) foram submetidas a nova coluna de sílica gel 60 em sistema tolueno/AcOEt (9:1), sendo coletadas novas 66 frações que também foram analisadas em CCD e reunidas por semelhança cromatográfica (mesmo Rf). As frações codificadas como HPac-B4-6 (coluna B fração 4 a 6) foram submetidas a coluna em Sephadex LH-20. Diclorometano/acetona (3:2) foi utilizado como eluente e a substância purificada (HPac-C6) foi codificada como HP-1.

A segunda substância obtida e caracterizada estruturalmente estava presente nas frações HPac-A25-27 (Figura 19, pag. 44) eluídas em Tolueno/AcOEt (9:1). Essas frações apresentaram duas manchas distintas na análise de CCD, quando revelada em anisaldeído e luz UV. A separação foi realizada por diferença de solubilidade, isto é, uma das substâncias era solúvel em acetona e a outra não. A fase não solúvel em acetona foi coletada e, por cromatografia em camada delgada (CCD) observou-se que a separação foi realizada, e a fração foi codificada como HP-2.

A fração HPac-A36 (Figura 19, pag. 44), por CCD apresentou-se relativamente pura e foi codificada como HP-3. A fração HPac-A38 foi analisada em CCD, recristalizada e posteriormente codificada como HP-4. O rendimento em mg das substâncias identificadas está expresso na tabela 10.

Tabela 10. Rendimento das substâncias obtidas

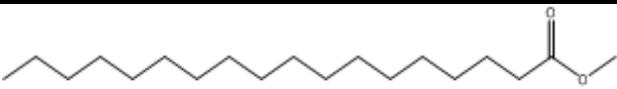
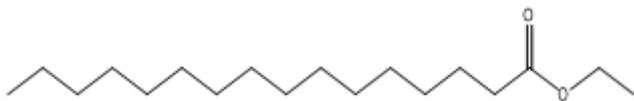
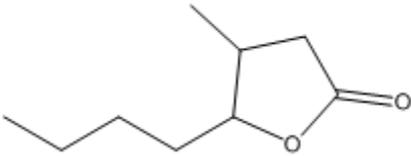
Fração de origem	Substancia pura	Rendimento (mg)
HPac-C6	HP-1	21,6
HPac-A25-27	HP-2	10,1
HPac-A36	HP-3	25,2
HPac-A38	HP-4	45,4

A identificação das substâncias foi realizada por espectroscopia de RMN ¹H e ¹³C, inclusive técnicas bidimensionais (COSY, HMBC e HSQC) e ESI-MS.

4.4.1 Fragmentação e similaridade das estruturas identificadas por GC/MS

As substâncias identificadas nas frações (HPAc-A2-10) estão representadas na tabela 11 e os cromatogramas do banco de dados juntamente com os espectros das frações estão apresentados em anexo.

Tabela 11. Resultados das análises de GC/MS das frações HPAC-A(2-10).

Substâncias	M ⁺	Frações	Similaridade com a biblioteca
 (1) Estearato de metila	298	2	95
 (2) Palmitato de etila	284	2-4	95
 (3) cis 3-metil-4-n-butilbutanolídeo	156	6-10	95

Nos espectros de massas dos ésteres de ácidos graxos (Estrutura 1 e 2) os picos mais intensos correspondem aos íons resultantes das quebras das ligações C-C. Essas sucessivas fragmentações dão origem aos íons alquila ($m/z = 29, 43, 57, \dots$) e aos íons contendo oxigênio, $C_nH_{2n-1}O_2^+$ ($m/z = 59, 73, 87, 101 \dots$) como mostra na figura 27¹⁰⁷.

¹⁰⁷ Silverstein, R. M., Bassler, G. C. e Morrill, T. C.; *Identificação espectrométrica de compostos orgânicos*, 5ª Ed., Guanabara Koogan, 1991.

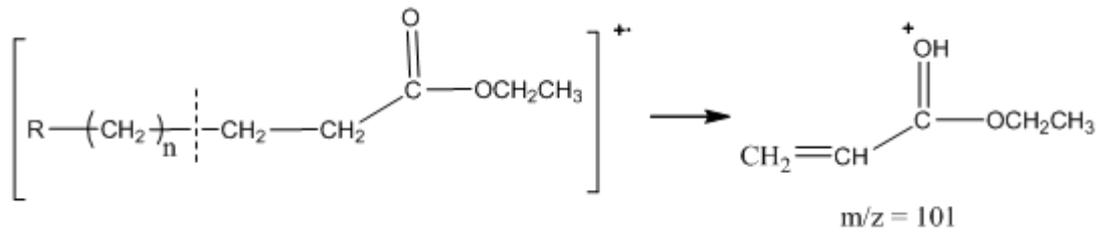


Figura 27. Formação do íon $m/z = 101$.

O pico base dos ésteres de ácido graxo é formado em ambos os casos por fragmentos do rearranjo de McLafferty, como na figura 28.

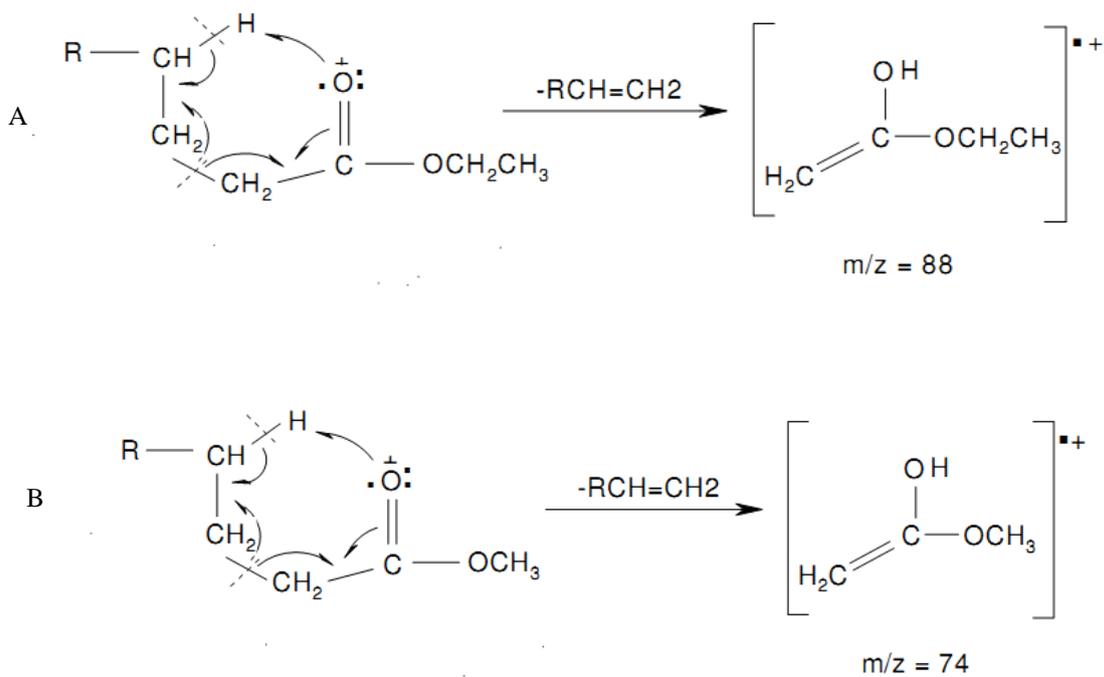


Figura 28. Representação do rearranjo de McLafferty dos íons palmitato de etila (A) e estearato de metila (B).

E observado ainda no espectro do estearato de metila um pico com $m/z = 87$ corresponde a fórmula $[\text{M} - \text{C}_{15}\text{H}_{31}]^+$, como observado na figura 29.

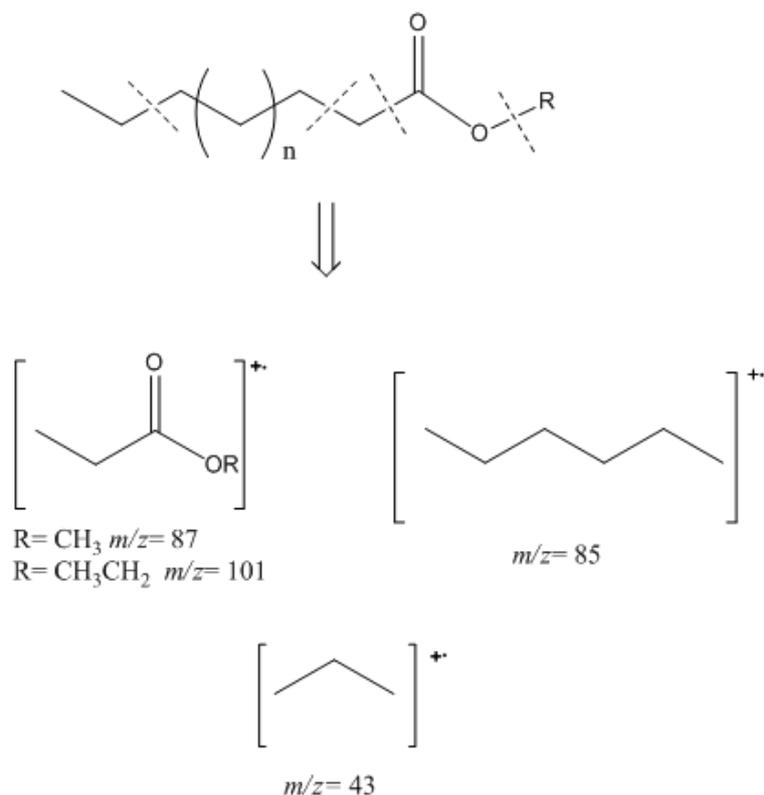


Figura 29. Fragmentação comum aos ésteres de ácido graxo e hidrocarbonetos.

Muitos estudos destacam a presença de ésteres de ácido graxo em madeiras da família leguminosae¹⁰⁸. O palmitato de etila foi identificado em espécies de *Dalbergia odorífera*¹⁰⁹⁻¹¹⁰. Na espécie *Anadenanthera colubrina* foi relatada a presença de palmitato de etila e estearato de metila¹¹¹.

A substância 3 apresenta uma similaridade de 95% com cis 3-metil-4-n-butilbutanolídeo. O espectro de massas desta substância apresenta o íon molecular $[M]^+ = 156$ e tem como pico base $m/z = 99$, que corresponde a quebra da ligação C-C do grupo butila, como observado na figura 30.

¹⁰⁸ Simon, B. F. de Iria Muino, And Estrella Cadahia; *J. Agric. Food Chem.*; **2010**, 58, 9587–9596.

¹⁰⁹ Vichi, S. *et al.*; *Food Chemistry*; **2007**, 102, 1260–1269.

¹¹⁰ Wang, W., Weng, X. e Cheng, D.; *Food chemistry*; **2000**, 71, 45-49.

¹¹¹ Santana, A. L. B. D.; *Estudo Químico, Antitermítico e Antifúngico da madeira de lei Anadenanthera colubrina (Vell.) Brenan var. Cebil (Griseb.) von Reis Alt. (Angico-de-carço)*. Tese de doutorado, UFPE, **2011**.

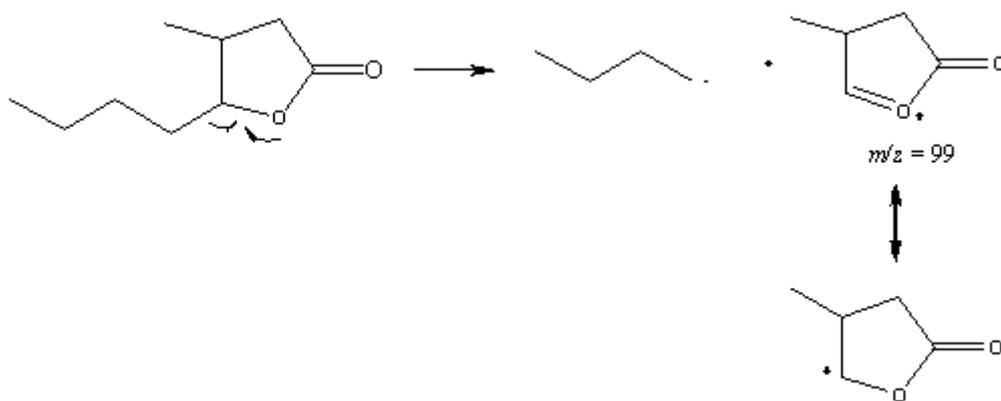


Figura 30. Pico base do íon butanolídeo.

A substância identificada como cis 3-metil-4-N-butilbutanolídeo também chamado de cis- β -metil- γ -octalactona foi encontrada em madeiras de carvalho por Simón e colaboradores (2010) quando realizavam um estudo de caracterização de compostos voláteis em lascas de carvalho.

4.4.2 Elucidação estrutural das substâncias isoladas do extrato em acetato de etila

✓ Estrutural 1.

Na tabela 12 estão representados os dados do espectro de RMN de ^1H e ^{13}C em (Acetona- d_6), bem como dos espectros bidimensionais HSQC e HMBC.

Tabela 12. Dados de RMN de ^1H , ^{13}C , HMBC e HSQC da substância HP-1 em Acetona- d_6 .

C	$^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HSQC		$^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC	
	$\delta ^1\text{H}$ [m, J (Hz)]	$\delta ^{13}\text{C}$	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$
1	7,30 (d, 8)	121,5	-	-
2	6,52 (dd, 8; 2,4)	109,1	-	H-4
3	-	159,5	H-4	H-1
4	6,43 (d, 2,4)	104,2	-	H-2
4a	-	156,2	H-4	H-6, H-1
6	5,54 (s, 2H)	65,5	-	-
6a	-	106,1	H-6	H-7
6b	-	120,1	-	H-6, H-10
7	7,13 (s)	116,2	-	H-4'
8	-	118,9	-	H-3', H-10
9	-	151,7	H-10	H-4', H-7
10	6,93(s)	100,0	-	-
10a	-	155,9	H-10	H-7
11a	-	147,9	-	H-1, H-6
11b	-	109,1	-	H-2, H-4
2'	-	76,7	H-3', 2CH ₃	H4'
3'	6,47 (d, 10)	130,8	-	2 CH ₃
4'	5,74 (d, 10)	122,9	-	H-7
2CH ₃	1,42 (s)	27,6	-	-
OH	8,85 (s)	-	-	-

Os sinais em δ_{H} 2,05 e δ_{H} 2,8 ppm no espectro de RMN de ^1H correspondem aos prótons da acetona e da água, respectivamente.

O espectro de RMN de ^1H para HP-1 apresenta 16 hidrogênios, sendo 5 prótons em região de aromáticos, 4 alifáticos e 6 prótons que correspondem a 2 metilas idênticas.

No espectro de RMN de ^1H para HP-1 (figura 31) observa-se ainda um deslocamento químico na região de 8,65 ppm referente a OH em compostos fenólicos cuja integração corresponde a 1 hidrogênio. Imediatamente após, são observados dubletos em δ_{H} 6,52 e δ_{H} 7,30 ppm que apresentam $J=8 \text{ Hz}$, indicando o acoplamento entre prótons em posição *orto*. Os dubletos em 6,43 e 6,52 ppm com $J= 2,4 \text{ Hz}$

correspondem ao acoplamento entre prótons em posição *meta*. As constantes de acoplamento observadas para a substância HP-1 são típicas das encontradas entre prótons em anel aromático com o seguinte sistema de spins (ABX).

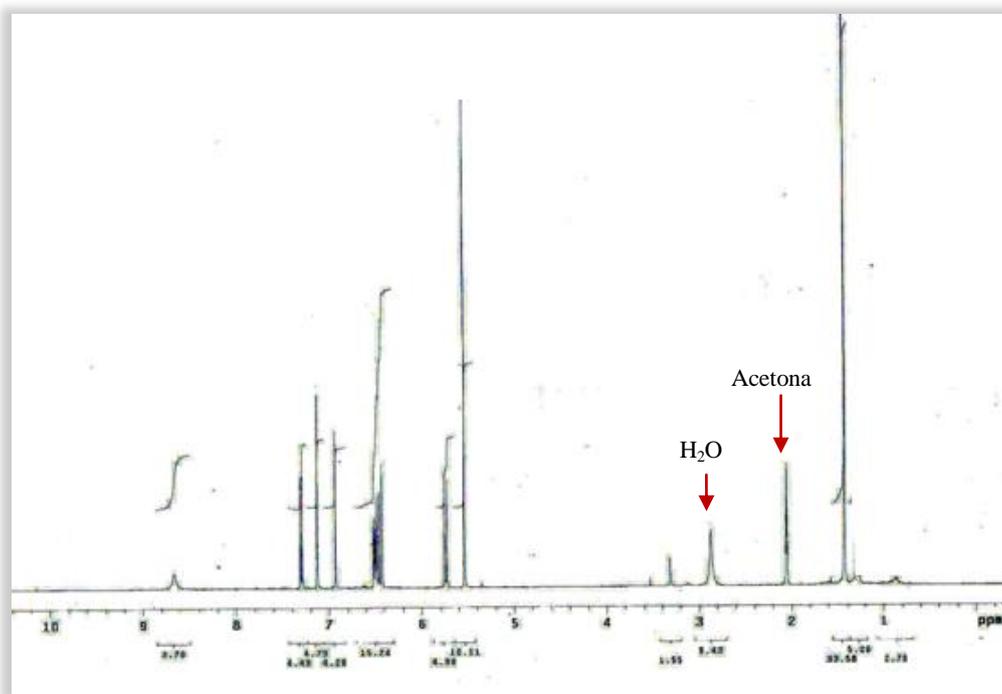


Figura 31. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) da amostra HP-1 em acetona- d_6 .

O singlete em δ_{H} 6,93 corresponde a um próton em anel aromático muito substituído, ficando evidente a presença de um segundo anel aromático.

Em campo alto é observado um singlete em δ_{H} 1,42 correspondente a hidrogênios de metilas cuja integração corresponde a 6 prótons. Em δ_{H} 5,54 observa-se um singlete cuja integração corresponde a 2 prótons que não acoplam entre si. Esta não correlação é confirmada no espectro COSY (Espectro 7 e 8 - em anexo). Os sinais em δ_{H} 6,47 e δ_{H} 5,74 são dubletos que corresponde a prótons vinílicos que acoplam entre si com $J=10$ Hz e, cujo acoplamento pode ser observado no espectro de COSY.

Alguns sinais observados no espectro de RMN de ^{13}C da substância HP-1 são característicos de compostos de fórmula $\text{C}_6\text{C}_3\text{C}_6$ (flavonóides ou seus derivados).

No espectro de RMN de ^{13}C (figura 32) são observados 19 sinais de carbonos, observa-se nele 5 carbonos aromáticos oxigenados, 6 carbonos aromáticos não oxigenados, 2 carbonos alifáticos oxigenados e 4 não oxigenados⁷⁰. O sinal em 27,64 ppm corresponde a carbonos metílicos que pela intensidade do sinal (não foi possível

usar os valores da integração) juntamente com o espectro de massa (ESI-MS; Espectro 11, em anexo) da molécula foi possível afirmar a presença de duas metilas representadas em um mesmo sinal. O espectro de DEPT (Espectro 6 – em anexo) confirma a presença de 2 metilas bem como de 7 carbonos metínicos (CH) e apenas um carbono metilênico (CH₂) logo, pode-se concluir a presença de sinais atribuídos a 10 sinais atribuídos a carbonos quaternários.

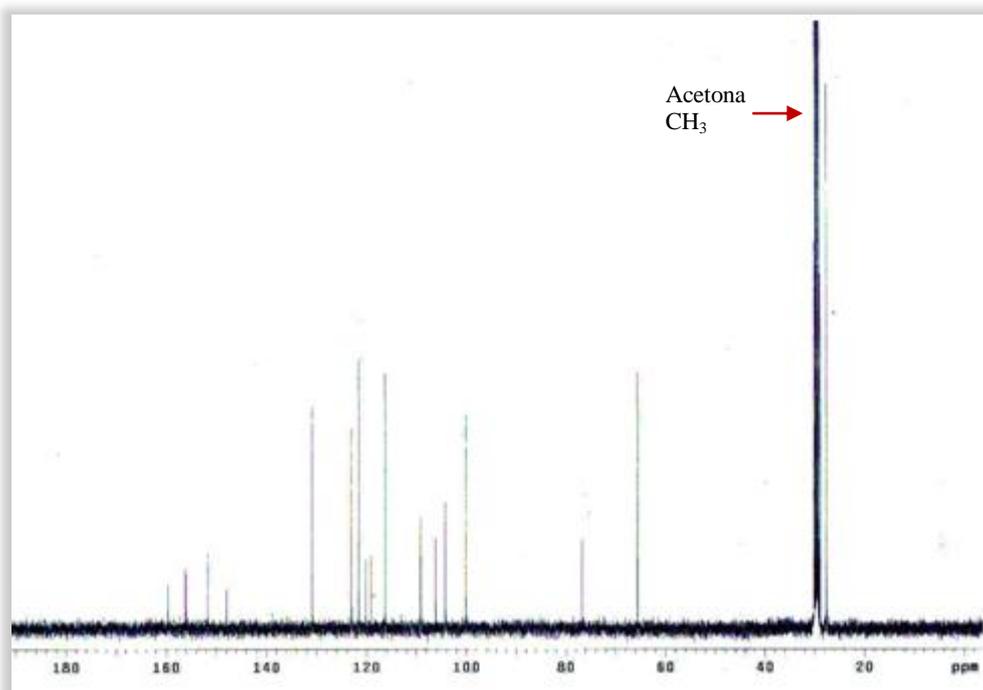


Figura 32. Espectro de RMN de ¹³C (100 MHz) da amostra HP-1 em acetona-d₆.

Os flavonóides apresentam a carbonila na faixa de δ 210-170 ppm⁷⁰, no entanto nenhum sinal correspondente a estes valores foram encontrados. Os compostos que apresentam tais características são isoflavonóides do tipo estrutural coumestano ou pterocarpano⁶⁸, figura 33.

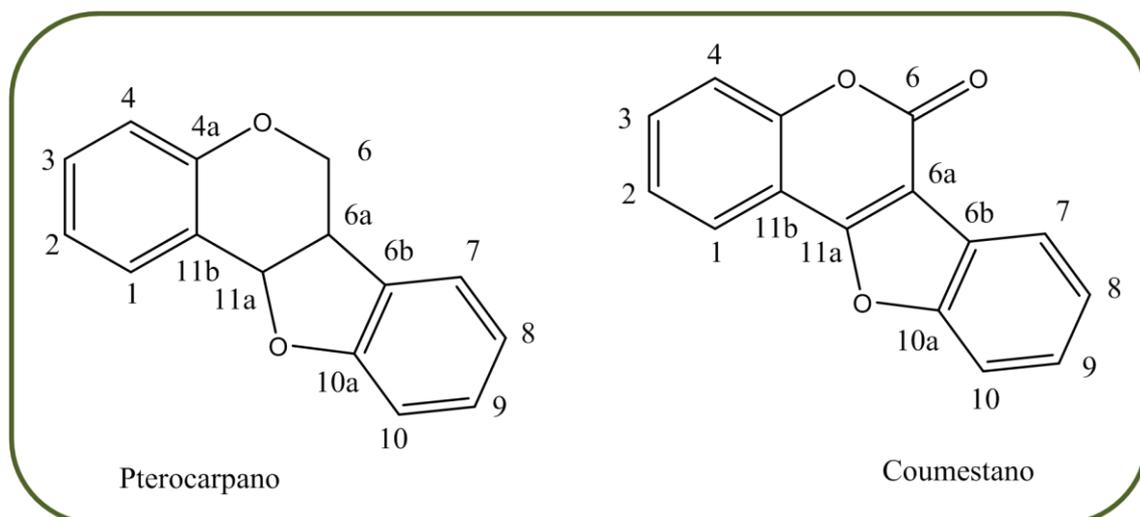


Figura 33: Estrutura básica de pterocarpanos e coumestanos

Na análise de RMN de ^{13}C de HP-1, o maior sinal evidenciado encontra-se em δ_c 159,59 ppm que corresponde, em flavonóides, a absorção de carbonos aromáticos oxigenados. O espectro de RMN de ^{13}C mostrou 3 sinais bem característicos de pterocarpanos: δ 65,5 (C_6); 106,15 (C_{6a}) e 147,91 (C_{11a}). O carbono em 65,5 ppm no espectro de HSQC (Espectro 9 - anexo) está diretamente ligado aos dois prótons cujo deslocamento químico corresponde a δ_H 5,54. Este resultado confirma a presença de um próton metilênico na estrutura do composto HP-1. No espectro de HMBC (Espectro 10 - anexo) os prótons em δ_H 5,54 ligados ao ($\text{C}-6$) acoplam em $^2J_{CH}$ e $^3J_{CH}$ com os carbonos 106,15 ($\text{C}-6a$) e 147,91 ($\text{C}-11a$) ppm, respectivamente, confirmando a estrutura de um pterocarpano para o composto HP-1.

O anel B da estrutura do pterocarpano (figura 33) apresenta os carbonos 8 e 9 ligados a um próton. Porém, pelo espectro da estrutura HP-1 os sinais do carbono não apresentam correlação direta com nenhum próton, estes carbonos apresentam-se na região de carbonos quaternários, como observado pelo HSQC (Espectro 9). Observa-se pelo espectro de RMN de ^1H que os sinais em δ_H 6,47 e 5,74 correspondentes aos prótons H-3' e H-4', prótons esses que não fazem parte da estrutura base do pterocarpano e que acoplam entre si na posição *orto* com uma constante de acoplamento de $J=10$ Hz. É muito comum a esse tipo de estrutura a presença de grupos prenilas ligados tanto ao anel A como ao B⁶⁸. Para o caso da substância HP-1 os sinais correspondente a um novo heterociclo ligado ao anel B do pterocarpano. No espectro bidimensional, HMBC (Espectro 10), é confirmada a presença desse anel, chamado de anel E, pelas correlações observadas, como: $^2J_{CH}$ do C-2' com o próton H-3' e $^3J_{CH}$ com

o próton H-4' e a correlação em $^3J_{CH}$ do C-4' com H-7. O hidrogênio H-7 acopla em $^3J_{CH}$ com o C-6a. É possível assim identificar, com essas características, a localização do grupo prenila ciclizado, ligado ao anel B formando o anel E (Figura 34).

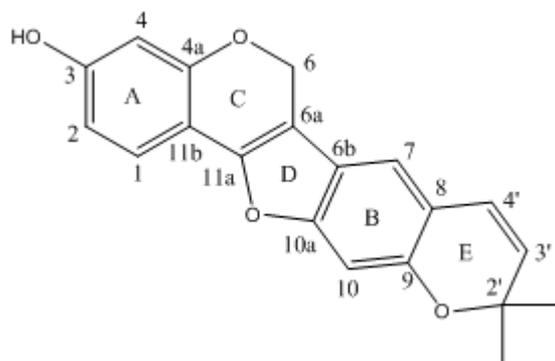


Figura 34. Estrutura do pterocarpano HP-1.

A posição da hidroxila no anel A ligada ao C-3 com deslocamento químico de 159,59 ppm foi confirmada pelas correlações à longa distância no espectro de HMBC (Espectro 10), observa-se nele que o C-3 é quaternário e acopla com os hidrogênios $^2J_{CH}$ H-4 e $^3J_{CH}$ H-1 que absorvem em δ_H 6,43 e δ_H 7,30 respectivamente. Com base nos resultados obtidos e em comparação com os dados da literatura propõem-se que a substância HP-1 seja, um pterocarpano conhecido por 6a,11a-anidrotuberosin ou 6a,11a-dehidrotuberosin.

O espectro de massas (ESI-MS) no modo negativo está apresentado em anexo (Espectro 11), servirá para corroborar a estrutura proposta para a substância HP-1. O íon desprotonado (modo negativo) apresenta o valor de $m/z = 319,0934$ com fórmula $[M-H]^+$, que corresponde a massa da estrutura proposta, com a perda de um próton.

Com base nos resultados obtidos e em comparação com os dados da literatura propõem-se que a substância HP-1 seja, o pterocarpano (Figura 31) conhecido por 6a,11a-anidrotuberosina ou 6a,11a-dehidrotuberosina, uma fitoalexina (phyton = planta, alexin = composto que repele) com atividade antioxidante, antialérgica e antifúngica^{112;113;114}.

¹¹² Botta, B.; *Current Medicinal Chemistry*; **2009**, 16, 3414-3468.

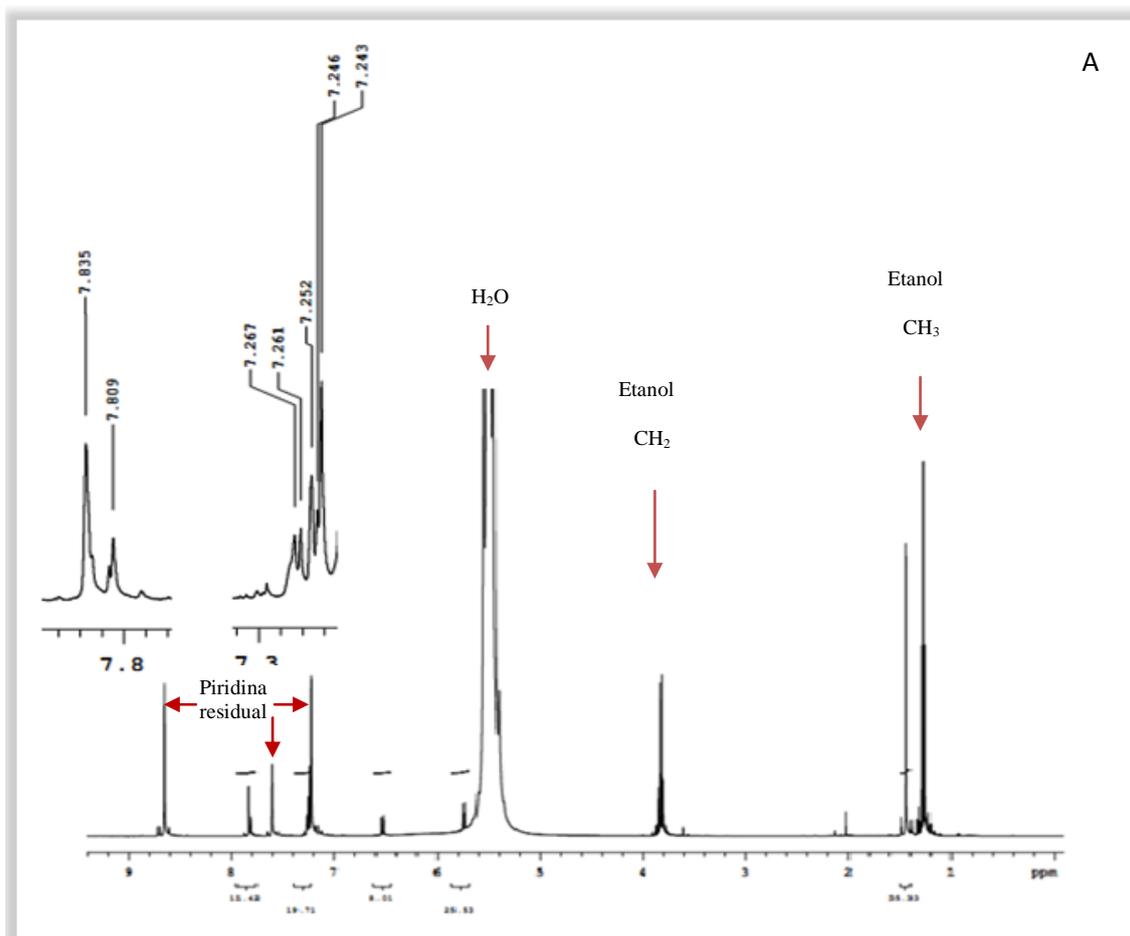
¹¹³ Miyase, T, *et al*; *Phytochemistry*; **1999**, 52, 2:303-310.

¹¹⁴ Arnoldi, A. e Merlini, L.; *J. Agric. Food Chem.*; **1990**, 38, 3:

✓ Estrutura 2

A identificação estrutural da substância HP-2 foi realizada através da espectroscopia de RMN de ^1H e ^{13}C e respectivas análises bidimensionais. A substância HP-2 apresenta-se solúvel em piridina, em vista disso todas as análises espectroscópicas foram realizadas em piridina- d_5 . Os sinais correspondentes ao solvente encontram-se no espectro de RMN de ^1H em (δ_{H} 7,22; δ_{H} 7,6 e δ_{H} 8,6) e no de RMN de ^{13}C em (122; 134 e 147 ppm). Além dos sinais do solvente são observados sinais correspondentes a contaminação com etanol, solvente utilizado na limpeza do tubo de ressonância, em (δ_{H} 1,42 e δ_{H} 3,8) no espectro de RMN de ^1H e em (17, 31 ppm e 57, 17 ppm) no espectro de RMN de ^{13}C .

Observa-se inicialmente que a amostra apresentou sinais nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C (figura 35 A e B) aparentemente semelhantes aos sinais da substância HP-1. E através da análise espectrométrica (ESI-MS), verifica-se que a massa desta substância é maior em 14 unidades do que a massa de HP-1 (Espectro 17 - anexo).



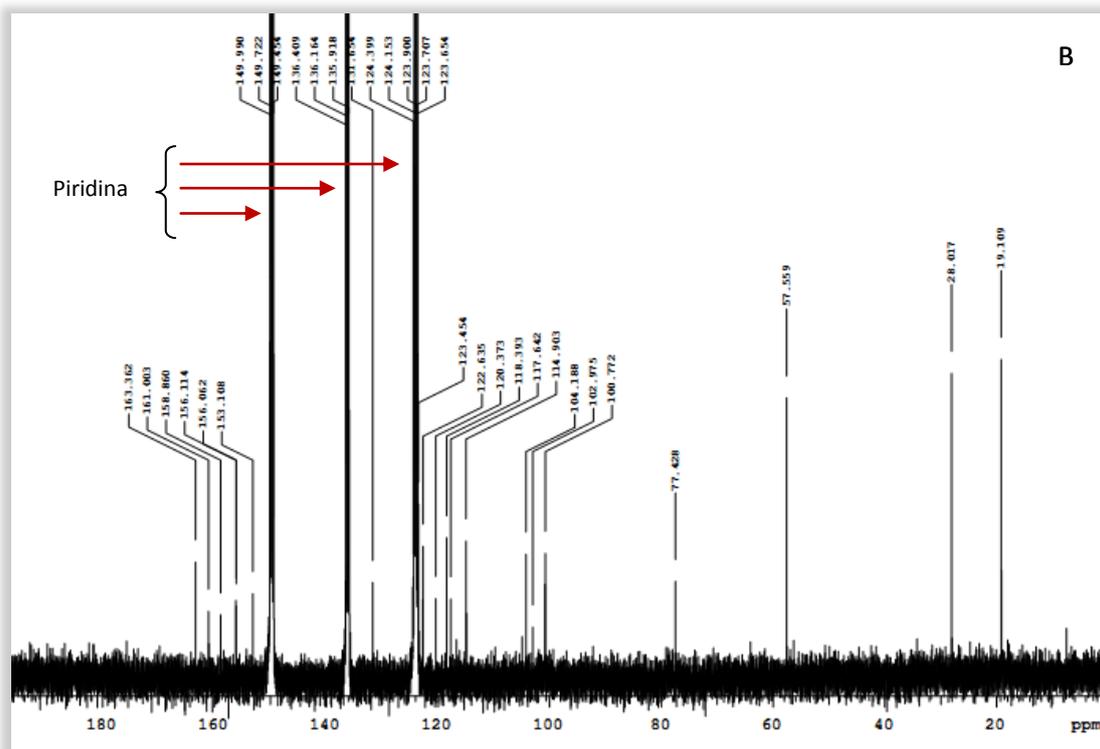


Figura 35. Espectro de RMN de ^1H (A) e ^{13}C (B) da amostra HP-2 (400 MHz e 100 MHz, em piridina- d_5)

O espectro de RMN de ^1H de HP-2 apresenta 13 sinais de hidrogênios sendo 6 prótons que correspondem a 2 metilas idênticas, 5 em região de aromáticos e 2 prótons alifáticos. A integração dos prótons não pôde ser realizada pela interferência dos sinais do solvente (piridina- d_5) que absorvem na mesma região dos prótons aromáticos, da água observada no espectro de RMN de ^1H .

No espectro de RMN de ^1H de HP-2 em campo alto observa-se um singlete em δ_{H} 1,42 correspondente a hidrogênios de metilas que apresenta-se semelhante ao sinal observado na estrutura HP-1 para as 2 metilas. A presença das duas metilas foi confirmada pelos bidimensionais, bem como pelo espectrometria de massa (Espectro 17, em anexo).

Assim como na substância HP-1 observa-se no espectro de RMN de ^1H do composto HP-2 (figura 35A) dois dubletos em δ_{H} 6,53 (d , 10 Hz) e δ_{H} 5,73 (d , 10 Hz) que correspondem a prótons vinílicos que acoplam entre si com $J=10$ Hz e, cujo acoplamento pode ser observado no espectro COSY (Espectro 14 – anexo). De acordo com o espectro HSQC os carbonos aos quais estes hidrogênios estão ligados absorvem em 120,7 ppm e 129,7 ppm respectivamente. As absorções destes prótons no espectro

de RMN de ^1H e carbonos em RMN de ^{13}C comprovam a presença do anel E também em HP-2.

Dois singletos em região de prótons aromáticos não oxigenados podem ser observadas em δ_{H} 7,83 e δ_{H} 7,24, os carbonos aos quais estes prótons estão ligados podem ser observados no espectro de HSQC e correspondem a 116,5 ppm e 98,9 ppm, respectivamente. Estas absorções são muito próximas das obtidas em HP-1.

No espectro de RMN de ^1H observa-se o deslocamento de prótons aromáticos que correspondem a um sistema AMX apresentando acoplamento *orto* ($J=10\text{ Hz}$) e acoplamento *meta* ($J=2,4\text{ Hz}$) indicando que o anel aromático se encontra 1, 2, 4-trissubstituído. Os sinais atribuídos a estes prótons são: δ_{H} 7,82 (*d*, 10,4 Hz); δ_{H} 7,26 (*dd*, 10,4 Hz; 2,4 Hz) e δ_{H} 7,25 (*d*, 2,4). Devido a sobreposição de sinais nesta região do espectro de RMN de ^1H as correlações entre prótons e carbonos foram estabelecidas através da análise dos espectros HSQC e HMBC. No espectro de HSQC se observa que estes prótons estão ligados aos carbonos que absorvem em 121,5 ppm, 113,0 ppm e 102,3 ppm, respectivamente.

No espectro de RMN de ^{13}C (figura 35B) são observados 20 sinais de carbonos, nele observa-se 6 carbonos aromáticos oxigenados, 9 carbonos aromáticos não oxigenados, 1 carbono alifático oxigenado e 2 não oxigenados bem como 2 carbonos metílicos⁷⁰. Além disso, a análise do espectro de HSQC (Espectro 16 - anexo) permitiu confirmar que existem sete prótons metínicos e onze carbonos quaternários, os valores da absorção desses sinais podem ser observados na tabela 13. Ao contrário da estrutura HP-1 a ausência de carbono metilênico, excluí a possibilidade de que HP-2 seja de um pterocarpano, apesar da similaridade nos deslocamentos químicos de alguns prótons e carbonos entre estes dois compostos.

Tabela 13. Dados de RMN de ^1H , ^{13}C , HMBC e HSQC de HP-2 em piridina- d_5 .

C	$^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HSQC		$^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC	
	δ ^1H [m, J (Hz)]	δ ^{13}C	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$
1	7,82 (d, 10,4)	121,5	H-2	-
2	7,26 (dd, 10,4;2,4)	113,0	-	H-4
3	-	161,5	H-2, H-4	H-1
4	7,25 (d, 2,4)	102,3		H-2
4a	-	154,2	H-4	H-1
6	-	157,0	-	-
6a	-	133,7	-	-
6b	-	115,7	-	H-10
7	7,83 (s)	116,5	-	H-4'
8	-	118,5	-	H-3', H-10
9	-	151,2	H10	H-7, H-4'
10	7,24 (s)	98,9	-	-
10a	-	154,2	H-10	H-7
11a	-	159,1	-	H-1
11b	-	101,7	H-1	-
2'	-	75,5	H-3'	H-4'
3'	5,73 (d, 10)	129,8	-	CH ₃
4'	6,53 (d, 10)	120,7	-	H-7
2CH ₃	1,43 (s)	26,2	-	-
OH	-	-	-	-

Os principais sinais que caracterizaram a estrutura HP-1 como um pterocarpano foram os carbonos: C₆ (65,6 ppm); C_{6a} (106,1 ppm) e C_{11a} (147,9 ppm), no entanto em HP-2 estes sinais não são observados. Uma classe que apresenta semelhança estrutural com os pterocarpanos são os coumestanos (Figura 33). Esses compostos são geralmente oxigenados nas posições 3 e 9 e apresentam uma carbonila na posição 6¹¹⁵.

¹¹⁵ Seshadri, T. R.; *Phytochemistry*; **1972**, 11, 881-898.

Baseando-se nos resultados obtidos e associados aos dados da literatura foi encontrada uma similaridade do composto HP-2 com sophoracoumestano A (figura 36)^{116;117}.

Estrutura

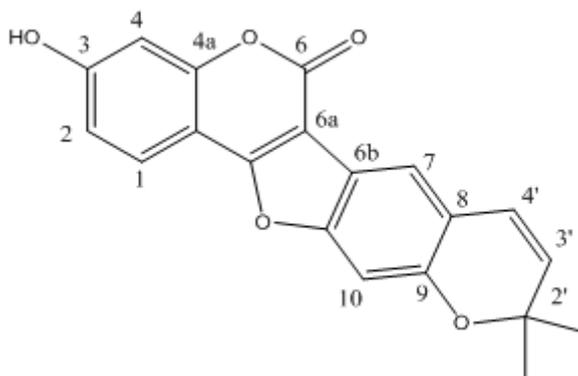


Figura 36. Estrutura proposta para o composto HP-2

Sophoracoumestano A foi pela primeira vez isolada na espécie *Sophora* (Fam. Leguminosae, subfam. Papilionoideae), essa espécie é muito usada na medicina tradicional chinesa e japonesa para o tratamento de fitoterápico de algumas doenças¹¹⁴. Tais como, arritmia ventricular, atividade anti-inflamatória, efeito antiulcerativo entre outros.

✓ Estrutura 3

A identificação estrutural da substância HP-3 foi realizada através da espectroscopia de RMN de ¹H e ¹³C e respectivas análises bidimensionais. A substância HP-3 apresentou-se solúvel em DMSO-d₆, em vista disso todas as análises espectroscópicas foram realizadas neste solvente. Os sinais correspondentes ao solvente encontram-se no espectro de RMN de ¹H em (δ_H 2,5) e no de RMN de ¹³C em (39,7 ppm). Foi observado ainda, que se encontram nestes espectros sinais decorrentes de uma contaminação com acetona cuja carbonila absorve em 206,5 ppm e as metilas em 29,8 ppm no espectro de

¹¹⁶ Gupta, S., et al.; *Phytochemistry*; **1990**, 29, 7: 2371-2373.

¹¹⁷ Komatsu, M., Yokoe, I. e Shirataki, Y.; *Chem, Pharm. Bull.*; **1981**, 29, 2:532-538.

RMN de ^{13}C , no espectro de RMN de ^1H o deslocamento químico das metilas ocorre em δ_{H} 2,1. Além disso, um sinal devido à absorção de H_2O é observado em δ_{H} 3,3.

No espectro de massas (ESI-MS) deste composto obtém-se o íon desprotonado (modo negativo) cujo valor corresponde a $m/z = 267,0261$ com fórmula $[\text{M-H}]^+$, que corresponde a massa com a perda de um próton.

A identificação estrutural de HP-3 foi facilitada pela similaridade dos seus espectros de RMN de ^1H e ^{13}C (figura 37 A e B) com os de HP-1 e HP-2 e seus sinais estão apresentados na tabela 14. Através da integração, foi possível observar a presença de 6 prótons aromáticos e duas hidroxilas fenólicas (Espectro 32). No espectro de RMN de ^1H os acoplamentos entre prótons em *orto* foram medidos, no entanto os acoplamentos em *meta* não puderam ser estabelecidos, devido a sobreposição dos desdobramentos dos sinais.

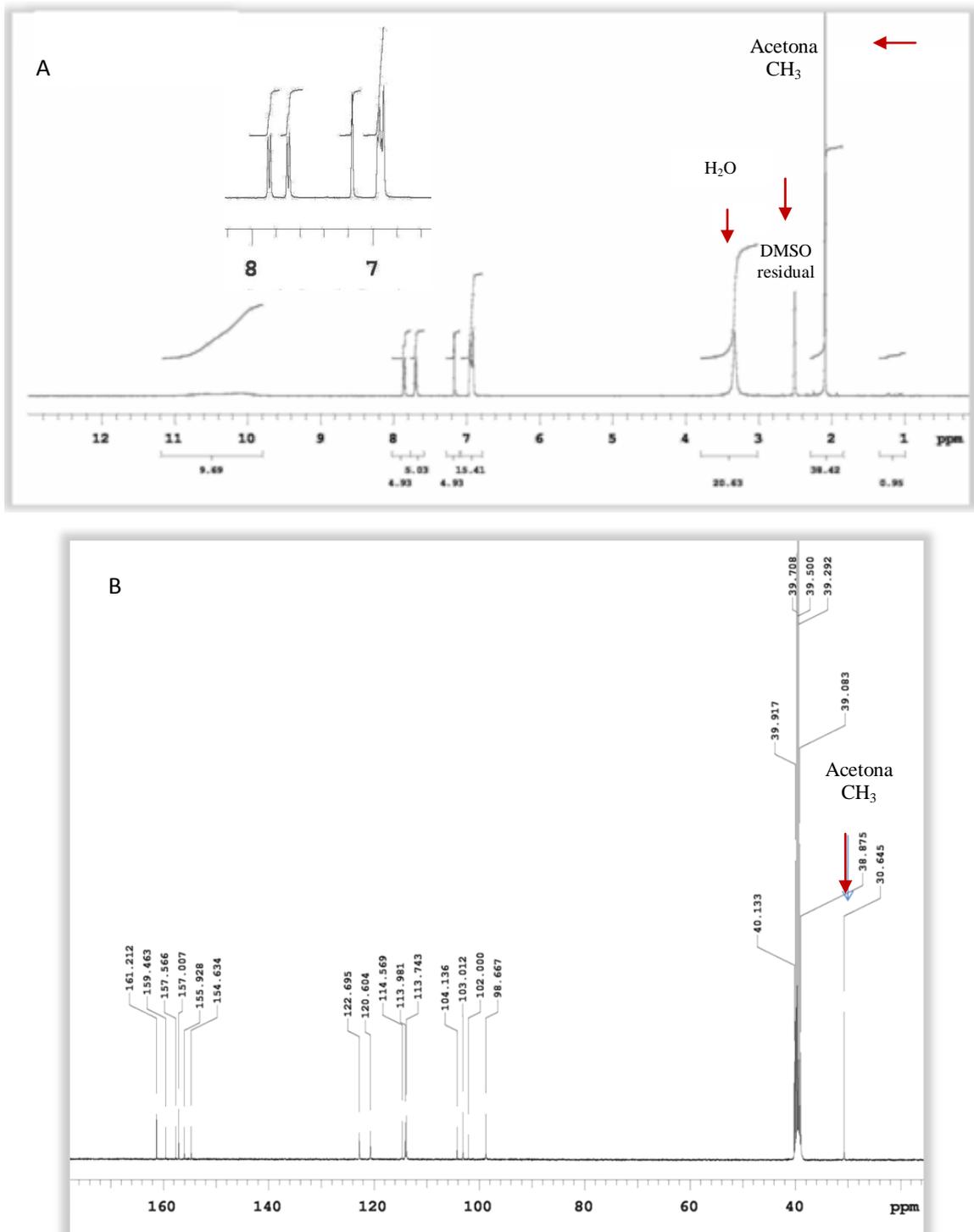


Figura 37. Espectro de RMN de ¹H e ¹³C (A) e ¹³C (B) da substância HP-3 (400 MHz, 100 MHz, em DMSO).

Tabela 14. Dados de RMN de ^1H , ^{13}C , HMBC e HSQC do composto HP-3 em DMSO.

C	$^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HSQC		$^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC	
	δ ^1H [m, J (Hz)]	δ ^{13}C	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$
1	7,85 (<i>d</i> , 8)	122,6	-	-
2	6,44 (<i>dd</i> , 8; 2,1)	113,7	-	-
3	-	161,2	H-2	H-1
4	6,9 (<i>d</i> , 2,1)	103,0	-	H-2
4a	-	155,9	H-4	H-1
6	-	157,5	-	-
6a	-	102,0	-	H-7
6b	-	114,5	-	H-10
7	7,7 (<i>d</i> , 8)	120,6	-	-
8	6,96 (<i>dd</i> , 8; 2,1)	119,0	-	-
9	-	154,6	-	-
10	7,14 (<i>s</i>)	98,6	-	-
10a	-	157,0	H-2	H-7
11a	-	159,4	-	H-1
11b	-	104,1	-	H-2, H-4
OH (C-9)	10,2 (<i>s</i>)	-	-	-
OH (C-3)	10,6 (<i>s</i>)	-	-	-

Analisando-se o espectro de RMN de ^{13}C deste composto são observados 15 sinais dentre os quais, 2 correspondem a carbonos aromáticos oxigenados, 11 a carbonos aromáticos não oxigenados e dois a carbonos alifáticos, sendo um deles oxigenado. No espectro de HSQC pode-se observar a presença de 9 carbonos quaternários na estrutura de HP-3. A análise dos dados de RMN associados aos espectros bidimensionais (HSQC, HMBC, COSY, espectros 18, 19, 20 e 21, anexo) permitiu observar que este composto apresenta o mesmo esqueleto estrutural de HP-2

Baseados nos dados obtidos e comparados com os dados da literatura¹¹⁶ constatou-se que a substância HP-3 é o coumestrol. Essa observação pode ser comparadas com os resultados do composto HP-3 (Tabela 14) e da literatura para o coumestrol (Tabela 15).

Tabela 15. Dados de RMN de ^1H , ^{13}C do coumestrol em DMSO.

C	HP-3		Literatura ¹¹⁸	
	δ ^1H [m, J (Hz)]	δ ^{13}C	δ ^1H [m, J (Hz)]	δ ^{13}C
1	7,85 (d, 8)	122,7	7.85 (d, 8,4)	123.2
2	6,94 (dd, 8; 2,0)	113,7	6.93 (dd, 8,5;2,1)	114.2
3	-	161,2	-	161.7
4	6,9 (d, 2,0)	103,0	6.91 (d, 1,9)	103.5
4a	-	155,9	-	155.1
6	-	157,5	-	158.0
6a	-	102,0	-	102.5
6b	-	114,5	-	115.0
7	7,7 (d, 8)	120,6	7.69 (d, 8,4)	121.1
8	6,96 (dd, 8; 2,0)	119,0	6.95 (dd, 8,3; 2,1)	114.4
9	-	154,6	-	156.4
10	7,14 (s)	98,6	7.17 (d, 1,9)	99.1
10a	-	157,0	-	157.5
11a	-	159,4	-	160.0
11b	-	104,1	-	104.6
OH	10,4 (s)	-	-	-

Estrutura

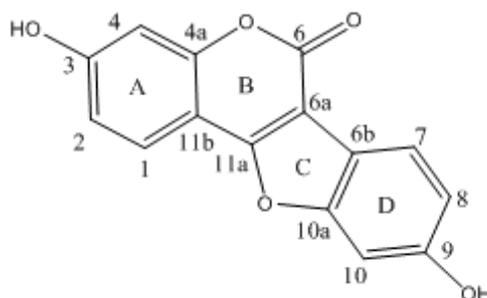


Figura 38. Estrutura proposta para o composto HP-3

Os primeiros relatos do isolamento desse composto em madeiras foram nas espécies papilionoideae (*Pterocarpus*, *Phaseolus vulgaris* e *Dalbergia*)¹¹⁹

¹¹⁸ Agrawall, P. K.; *Carbon- 13 NMR of flavonoids: Studies in organic chemistry* 39. Lucknov, India, Elsevier, 1989

Coumestrol é uma fitoalexina¹²⁰ e segundo Arnoldi e Merlini (1990) ele apresenta atividade fungicida frente aos fungos *Aphanomyces euteiches* e *Fusarium solani*. e *F. cucurbitae*.

De acordo com Wonga e colaboradores (2011)¹²¹ este composto foi utilizado em pacientes com diabetes e problemas cardíacos. Lee e colaboradores (2006) observaram que o coumestrol apresenta uma significativa atividade antioxidante¹²².

✓ Estrutura 4

A identificação estrutural da substância HP-4 foi realizada através da espectroscopia de RMN de ¹H e ¹³C e respectivas análises bidimensionais. A substância HP-4 apresentou-se solúvel em DMSO-d₆, em vista disso todas as análises espectroscópicas foram realizadas neste solvente. Os sinais correspondentes ao solvente encontram-se em δ_H 2,5 (RMN de ¹H) e em 39,7 ppm (RMN de ¹³C). Um sinal devido à absorção de H₂O é observado em δ_H 3,3 no espectro de RMN de ¹H.

Após análise dos espectros de RMN de ¹H e ¹³C (Figura 39 A e B) observou-se que a substância HP-4 tratava-se de uma mistura. Em vista disso, foram considerados no espectro de hidrogênio apenas os sinais de maior intensidade e que por integração estabeleciam uma relação. Foi observado também que todos os sinais encontravam-se na região de prótons aromáticos. Estes sinais são característicos de um sistema aromático para substituído (AA'BB'), representado por dois dubletos correspondentes aos dois pares de átomos que absorvem em δ_H 7,6 (*d*) e em δ_H 6,78 (*d*), que provavelmente correspondiam aos hidrogênios do anel B de flavonóides que acoplam através da interação spin-spin em posição *orto* e um sistema AMX característico do anel A dos isoflavonóides substituídos no carbono 7.

¹¹⁹ Al-Hazimi, H.M.G.; Alkathlan, H.Z.; *J. King saud Univ.* **2000**, 12,2: 93-122.

¹²⁰ Seshadri, T. R.; *Phytochemistry*; **1972**, 11, 881-898.

¹²¹ Wonga, K. H.; *Journal of Ethnopharmacology*; **2011**,

¹²² Lee, J. H., et al.; *J. Agric. Food Chem.*; **2006**, 54, 2057–2063.

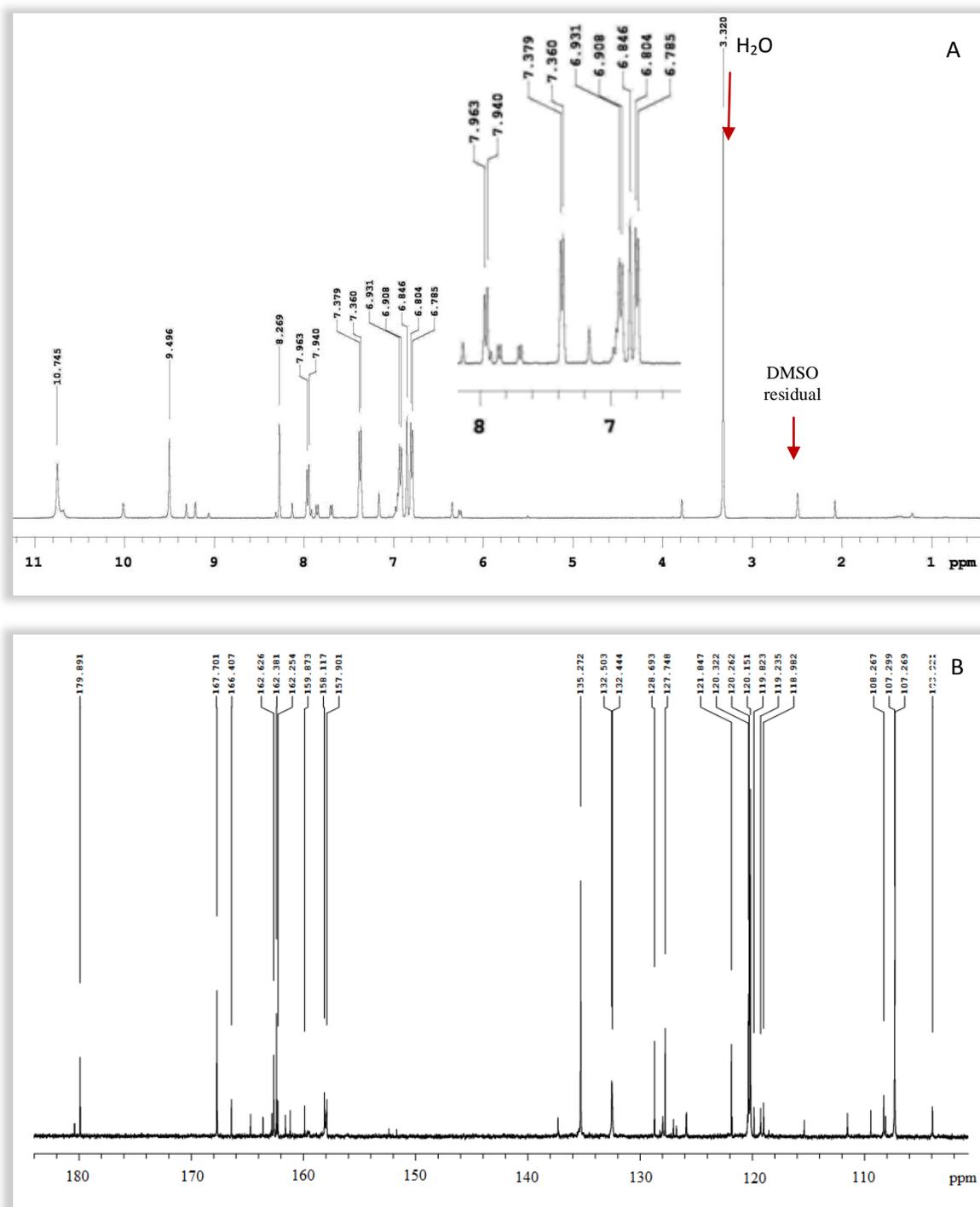


Figura 39. Espectro de RMN de ¹H (A) e ¹³C (B) da amostra HP-4 (400 MHz e 100 MHz, em DMSO).

Este espectro mostrou também dois dubletos em 7,9 e 6,9 ppm, correspondente aos prótons do anel A. Esses prótons acoplam com ($J = 9,2 \text{ Hz}$, acoplamento *orto*). No espectro de correlação heteronuclear HSQC (espectro 25) verifica-se a correlação ¹H x ¹³C em (1J).

No espectro de RMN de ^{13}C (figura 39B) foi observado um sinal em 179,9 ppm que é característico de um deslocamento químico de carbonila em flavonóides¹²³, sobretudo carbonila em isoflavonóides.

No espectro de RMN de ^{13}C observa-se sinal em 167,0 ppm, devido a ligação de um carbono com uma hidroxila (OH) cujo próton absorve em δ_{H} 10,74 (s). Uma segunda hidroxila têm seu sinal atribuído em δ_{H} 9,4 ppm.

O singlete em δ_{H} 8,27 é um sinal característico de isoflavonas, no espectro HSQC ($^1\text{J}_{\text{CH}}$) acopla como carbono que absorve em 158,2 ppm. Este próton está localizado no anel C da isoflavona, pois a correlação heteronuclear em (^3J) com a carbonila confirma essa posição.

No espectro de HMBC (anexo, espectro 28) foi possível atribuir a correlação ($^3\text{J}_{\text{CH}}$) entre o carbono ($^3\text{J}_{\text{CH}}$) e os prótons aromáticos dos anéis desta isoflavona. O espectro de correlação e sua expansão $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ COSY (Espectro 25 e 26) mostra o acoplamento dos prótons H-2' e H-6' com os prótons H-3' e H-5', como também os prótons do anel A H-5 e H-6.

Assim, considerando que a substância é uma isoflavona de massa 270 e com fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_4$, é possível identificar a provável substância como uma 4',7-diidroxiiisoflavona também chamada de daidzeína. Os dados corroboram com os obtidos por Demuner e colaboradores (2003) que isolaram este constituinte químico da espécie de leguminosae *Mucuna*¹²⁴

A tabela 16 apresenta os sinais de RMN de ^1H e ^{13}C do composto HP-4, identificado da mistura.

¹²³ Silva, T. M., et al.; *Quimica nova*; **1999**, 1-10.

¹²⁴ Demuner, A. J.; *Quim. Nova*; **2003**, 26, 3: 335-339.

Tabela 16. Espectro de RMN de ^1H , ^{13}C , HMBC e HSQC da isoflavona em DMSO.

C	$^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HSQC		$^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC	
	δ ^1H [m, J (Hz)]	δ ^{13}C	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$
2	8,27 (s)	158,1	-	-
3	-	128,6	H-2	H-2', H-6'
4	-	179,8	-	H-2, H-5
4a	-	121,8	-	H-6, H-8
5	7,95 (d, 9,2)	132,5	-	-
6	6,91 (d, 9,2)	120,3	-	H-8
7	-	167,7	H-6, H-8	H-5
8	6,91 (d, -)	107,2	-	H-6
8a	-	162,6	H-8	H-2, H-5
1'	-	127,7	-	H-3', H-5'
2'	7,36 (d, 7,6)	135,2	-	-
3'	6,78 (d, 7,6)	120,1	-	-
4'	-	162,2	H-3', H-5'	H-2', H-6'
5'	6,78 (d, 7,6)	120,1	-	-
6'	7,36 (d, 7,6)	135,2	-	-
OH (C-7)	10,89 (s)	-	-	-
OH (C-4')	9,54 (s)	-	-	-

Estrutura

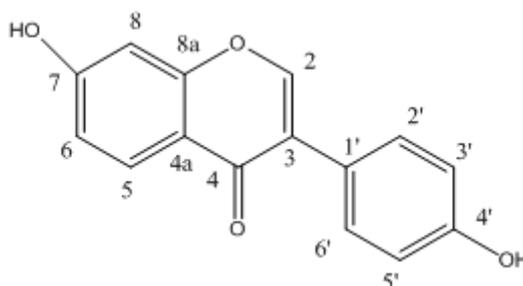


Figura 40. Estrutura proposta para o composto HP-4.

Estudos realizados por Lee e colaboradores (2006) observaram que a daidzeína isolada da raiz de *Glycine max* apresentou elevada atividade antioxidante ¹²².

Considerada um fitoestrogênio apresenta atividade contra várias doenças dentre elas doenças do sistema cardíaco e para alívio de sintomas da menopausa¹²⁵.

4.5 Bioensaio

4.5.1 Atividade fungicida

A influência dos extrativos no crescimento dos fungos, bem como a influência da lignina é observada nos resultados obtidos para o teste fungicida. No estudo realizado com cinco fungos da podridão branca: *Phanerochaete chrysosporum*, *Pycnoporus sanguineus*, *Schizophyllum commune*, *Lentinula edodes* e *Trametes vellosa* foi observado que a madeira *H. petraeum* foi resistente ao ataque de todos os fungos testados, tanto no teste com a madeira livre dos extrativos – MSE, quanto para a madeira com extrativos – MCE (figura 40). Sendo assim, a resistência ao ataque dos fungos testados deve-se não apenas a presença de extrativos, mas também ela está relacionada à presença de compostos que ainda não foram removidos da madeira, neste caso a lignina. Oliveira e colaboradores (2010) avaliou a resistência de 4 madeiras: *M. huberi*, *H. stignocarpa*, *A. colubrina* e *D. regia* frente a *P. chrysosporium*. Eles verificaram que algumas madeiras como *A. colubrina* os extrativos são fundamentais na defesa da madeira frente a estes fungos. O crescimento do fungo foi totalmente inibido pela madeira não extraída, porém quando a madeira estava livre dos extrativos o crescimento do fungo se tornava intenso. Também foi verificado que a MSE e MCE de *M. huberi* inibiu completamente o crescimento do fungo, destacando a presença de da lignina na defesa dessa madeira¹⁵. O comportamento da madeira *H. petraeum* se assemelha ao da madeira *M. huberi* e a resistência para ambas as madeiras não está relacionada apenas aos metabólitos secundários, mais também a lignina. Oliveira e colaboradores (2005) investigaram a durabilidade natural da madeira através do efeito da extração, por diferentes solventes, para as madeiras: candeia (*Vanillosmopsis erythropappa*), cedro (*Cedrela fissilis*), cerejeira (*Amburana cearensis*), jacarandá-caviúna (*Machaerium scleroxylon*), eucalipto citriodora (*Corymbia citriodora*) e *Eucalyptus gummifera*, sobre a resistência ao apodrecimento causado pelo fungo

¹²⁵ Duncan, A. M., Phipps, W. R. e Kurzer, M. S.; *Phyto-oestrogens*; Best Pract Res Clin Endocrinol Metab; **2003**, *17*: 253-271.

Gloeophyllum trabeum, fungo da podridão parda. Eles verificaram que mesmo modificando os solventes para remoção de diferentes compostos presentes nas madeiras, estas ainda apresentaram alta resistência ao fungo. A madeira cerejeira (*Amburana cearensis*), espécie da papilionoideae apresentou os mesmos resultados para a madeira com extrativos e sem os extrativos¹²⁶. Os resultados foram semelhantes com os obtidos por *H. petraeum*.

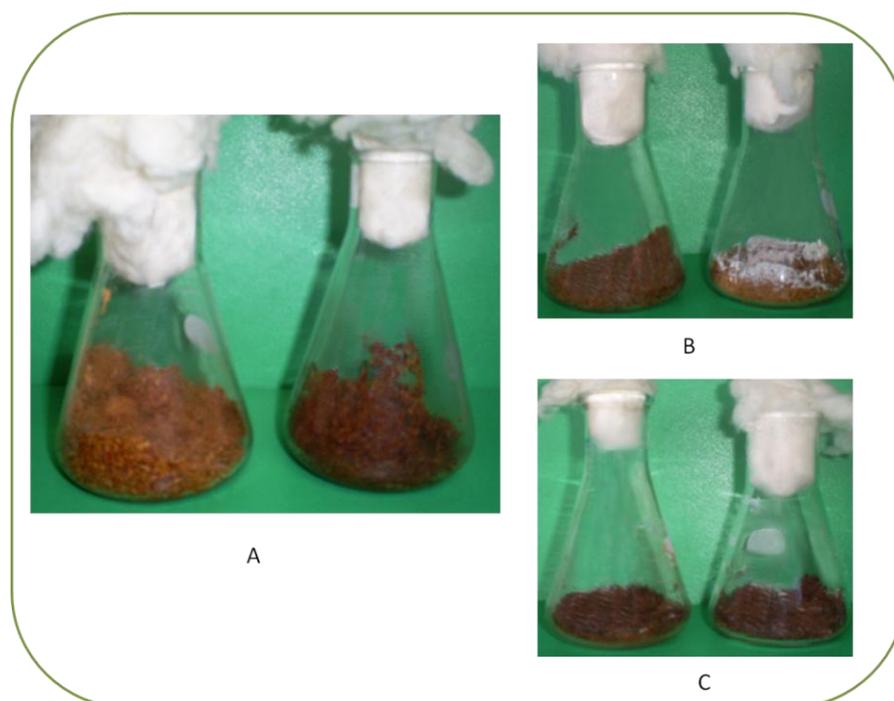


Figura 41. (A) *H. petraeum*; Teste realizado por Oliveira e colaboradores (2010), (B) *A. colubrina* e (C) *M. huberi*; Iniciando a esquerda MCE e MSE.

4.5.2 Bioensaios preliminares das substâncias isoladas

Uma análise com três concentrações diferentes do extrato (10, 50 e 100 ppm) foi realizada, tendo por finalidade determinar em que faixa de concentração as substâncias testadas causariam ou não a mortalidade das larvas. Também foram realizados os ensaios para as quatro substâncias identificadas no extrato em acetato de etila da madeira *H. petraeum*. Foram observados que duas apresentaram atividade tóxica frente as larvas de *A. egypti*, no estágio 4, uma não apresentou atividade nas concentrações

¹²⁶ Oliveira, J. T. da S., et al; *R. Árvore*; **2005**, 29, 5: 819-826.

analisadas e um apresentou resultados problemáticos. Os percentuais de mortalidade, estão descritas abaixo:

❖ O percentual de mortalidade das larvas frente ao extrato em acetato de etila foi de 100 % nas concentrações (10, 100 e 250 ppm).

❖ A amostra HP-2 apresentou uma mortalidade de 8 ± 2 % na concentração de 10 ppm e nas demais concentrações a mortalidade de larvas não ocorreu. É importante acrescentar que esta substância apresentou dificuldade de solubilização. Baseados neste fato, pode-se deduzir que nas concentrações de 50 e 100 ppm as larvas não sofreram a ação da substância testada e desta forma não houve mortalidade.

❖ A substância HP-1 apresentou mortalidade de $71 \pm 8\%$ na concentração de 100 ppm, $43 \pm 6\%$ para 50 ppm e $18 \pm 2\%$ para 10 ppm.

❖ A substância HP-4 com concentração de 10 ppm matou $88 \pm 2\%$ das larvas, e nas concentrações de 50 ppm e 100 ppm a mortalidade foi máxima. Essa substância apresentou a melhor atividade entre todas as substâncias testadas, frente às larvas do mosquito *Aedes aegypti*. É importante acrescentar aqui, que esta substância apresenta-se impura. A purificação desta mistura se faz necessário para avaliar-se melhor se a atividade larvicida deve-se a daidzeína, ou a substância que encontra-se associada a ela, ou se este efeito é devido as duas substâncias juntas.

❖ A substância HP-3 não apresentou atividade tóxica nas concentrações de 10, 50 e 100 ppm.

Os resultados sugerem que HP-2 e HP-4 são promissores agentes larvicidas naturais, frente a *Aedes aegypti*. Para que estes resultados sejam conclusivos faz-se necessário a determinação da LC_{50} destas substâncias.

Estudos realizados com plantas contendo isoflavonoides revelaram que estas plantas apresentam potencial inseticida e justificam a sua utilização como defensivo agrícola, e sendo uma alternativa ecologicamente viável para a erradicação ou controle da dengue¹²⁷

¹²⁷ Yenesew, A. et al; *Bull. Chem. Soc. Ethiop.* **2009**, 23, 3: 409-414.

5 CONCLUSÃO

- ✓ A abordagem fitoquímica indicou a presença de flavonóides, alcalóides, terpenos e esteróides na madeira *H. petraeum*.
- ✓ O extrato em acetato de etila de *H. petraeum* possui atividade larvicida frente as larvas do mosquito *Ae. Egypti*.
- ✓ A madeira *H. petraeum* apresenta resistência a alguns fungos responsáveis pela podridão branca nas condições da madeira livre dos extrativos (substâncias responsáveis pela defesa das plantas) bem como para a madeira com os extrativos.
- ✓ Todos compostos isolados são inéditos na madeira *H. petraeum*, uma vez que não há estudos anteriores desta planta.
- ✓ A substância HP-1 é uma substância pertencente a classe dos pterocarpanos e identificada como anidrotuberosina
- ✓ As substâncias HP-2 e HP-3 foram identificadas como coumestanos, sendo HP-2 identificada como sophoracoumestano A e HP-3 coumestrol.
- ✓ HP-4 não estava pura e apresentou como seu constituinte majoritário uma isoflavona conhecida como daidzeína.
- ✓ Os compostos que apresentaram atividade larvicida frente ao *Ae. Aegypti* foram HP-2 e HP-4
- ✓ A madeira *H. petraeum* apresentou concentrações relativamente altas de fenóis totais e lignina.
- ✓ A lignina da madeira *H. Petraeum* apresenta um teor de grupos guaiacila/siringila (60:40), que são típicos de madeiras de folhosas.

6. PERSPECTIVAS

- ✓ Realizar análise de RMN de ^{13}C da lignina e propor a estrutura final da lignina
- ✓ Isolar e identificar outros compostos do extrato em acetato de etila, bem como dos demais extratos.
- ✓ Determinar o LC_{50} das substâncias que apresentaram atividade larvicida abaixo de 100 ppm, como também da fração problema (HPAc-A25-27);
- ✓ Testar a atividade das frações iniciais que apresentaram ésteres derivados de ácido graxo.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ❖ Agrawal, P. K.; *Carbon- 13 NMR of flavonoids: Studies in organic chemistry 39*. Lucknov, India, Elsevier, **1989**
- ❖ Al- Hazimi, H. M. G.; Alkathlan, H. Z.; *Naturally occurring pterocarpanoids and related compounds*, J. King Saud. Univ. **2000**, 12, 2: 93-122.
- ❖ Alday, E.; Gómez, M.; Ojeda, P.; Caballero, M. L.; Moneo, I.; *IgE-mediated asthma associated with a unique allergen from Angelim pedra (*Hymenolobium petraeum*) wood*, Journal of Allergy and Clinical Immunology **2005**, 115, 3: 634-636.
- ❖ Arnoldi, A.; Merlini, L. *Lipophilicity-Antifungal Activity Relationships for Some Isoflavonoid Phytoalexins*. J. Agric. Food Chem. **1990**, 38, 3: 834-838.
- ❖ Balandrin, M. F.; Robbins, E. F.; Kinghorn, A. D.; *Alkaloid distribution in some species of the papilionaceous tribes thermopsidaeae and genisteae*, Biochemical Systematics and Ecology **1982**, 10, 4: 307-311.
- ❖ Barrichelo, L. E. G.; Britto, J. O.; *Química da madeira - Manual Didático*. Centro Acadêmico “Luiz de Queiróz”, USP – Piracicaba, **1989**.
- ❖ Botta, B.; Menendez, P.; Zappia, G.; Lima, R. A. de; Torge, R.; Monache, G. D.; *Prenylated Isoflavonoids: Botanical Distribution, Structures, Biological Activities and Biotechnological Studies. An Update (1995–2006)*. Current Medicinal Chemistry **2009**, 16, 3414-3468.
- ❖ Boudet, A. M. *Lignins and lignification: selected issues*. Plant Physiology and Biochemistry **2000**, 38, 1/2: 81-96.
- ❖ Brossi, A.; *The alkaloids*; United Kingdom edition, academic press London, **1986**, v. 29.
- ❖ Burger, L.M.; Richter, H. G.; *Anatomia da Madeira*. Nobel, São Paulo, **1991**, 154 p.
- ❖ Busche, L. R.; *The Klason lignin determination as applied to aspenwood with special reference to acid-soluble lignin* (Doctor's Dissertation). The Institute of Paper Chemistry, Appleton, Wisconsin, **1960**.

- ❖ Calixto, J. B.; Santos, A. R. S.; Filho, V. C.; Yunes, R. A.; *A review of the plants of the genus Phyllanthus: Their chemistry, pharmacology and therapeutic potential*. Medicinal Research Review **1998**, 18, 225-258.
- ❖ Chen, C. L.; Robert, D.; *Characterization of lignin by ¹H and ¹³C NMR spectroscopy*. Methods in Enzymology **1988**, 161, 137-175.
- ❖ Costa, A. F.; *Farmacognosia*. Fundação Calouste Gulbenkian, v. 2, 2ª ed., Lisboa, **1982**.
- ❖ Costa, A. F.; *Farmacognosia*; Fundação Calouste Gulbenkian, v. 2, 4ª ed, Lisboa, **1994**.
- ❖ Cruz, H.; *Patologia, avaliação e conservação de estruturas de madeira*. Núcleo de Estruturas de Madeira, Laboratório Nacional de Engenharia- Lisboa, **1994**.
- ❖ Cseke, L. J.; Kirakosyan, A.; Kaufman, P. B.; Warber, S. L.; Duke, J. A.; Brielmann, H. L.; *Natural products from plants*. 2ª ed., Taylor e Francis ed., London, **2006**, cap. 1.
- ❖ Clapauch, R. *et al*; *Fitoestrogênios: Posicionamento do Departamento de Endocrinologia Feminina da Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia (SBEM)*; Arq Bras Endocrinol Metab **2002**, 46, 6: 679-695.
- ❖ Demuner, A. J.; *Isolamento e avaliação da atividade nematicida de Constituintes Químicos de Mucuna cinerea contra Meloidogyne incognita e Heterodera glycines*; Quim. Nova; **2003**, 26, 3: 335-339.
- ❖ Dewick, P. M.; *Medicinal Natural Products: A biosynthetic Approach*. 3ª ed., John Wiley and Sons, London, **2009**, 187p.
- ❖ Dewick, P.M.; *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*. Chichester: 2ª ed. John Wiley & Sons, **2001**, 5 e 6p.
- ❖ Dubois, J. L.; Sneden, A. T.; *Ferreirinol, a New 3-Hydroxyisoflavanone from Swartzia polyphylla*. J. Nat. Prod. **1996**, 59, 9: 902-903.
- ❖ Duncan, A. M.; Phipps, W. R.; Kurzer, M. S.; *Phyto-oestrogens*; Best Pract Res Clin Endocrinol Metab **2003**, 17: 253-271.
- ❖ Evans, W. C.; *Estudo fitoquímico de Lonchocarpus latifolius - Isolamento, identificação, determinação estrutural, testes biológicos e análise sazonal-Campinas* (Tese doutor em ciência). Instituto de química, Unicamp, **1998**.
- ❖ Fahey, J. G. C.; McLaren, G. A.; Williams, J. E.; *Lignin Digestibility by Lambs Fed both Low Quality and High Quality Roughage*; Journal of Animal Science **1979**, 48, 4: 941.

- ❖ Faix, O.; *Classification of Lignins from Different Botanical Origins by FTIR Spectroscopy*. *Holzforschung* **1991**, 45, 21-27.
- ❖ Fengel, D.; Wegener, G.; *Wood Chemistry, Ultrastructure and Reactions*, 1^a ed., Walter de Gruyter: Berlin, **1989**.
- ❖ Ferreira, A. B. de H.; *Novo Dicionário da Língua Portuguesa*. 2. ed. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, **1986**. 755 p.
- ❖ Ferreira, G. C.; Gomes, J. I.; Hopkins, M. J. G.; *Estudo anatômico das espécies de Leguminosae comercializadas no estado do Pará como "angelim"*. *Acta Amazônia* **2004**, 34, 3: 387 – 398.
- ❖ Filho, V. C.; *Principais avanços e perspectivas na área de produtos naturais ativos: estudos desenvolvidos no Niqfar/Univali*. *Química Nova* **2000**, 23, 5: 680-685.
- ❖ Fiocruz; *Manutenção de Aedes aegypti em laboratório*. Laboratório de fisiologia e controle de artrópodes vetores. Rio de Janeiro, **2007**.
- ❖ Gonçalves, A. R.; Schuchardt, U.; Bianchi, M. L.; Curvelo, A. A. S.; *Piassava Fibers (Attalea funifera): NMR Spectroscopy of their Lignin*. *J. Braz. Chem. Soc.* **2000**, 11, 5: 491-494.
- ❖ Gonzaga, A. L.; *Madeira: Uso e conservação*; Caderno técnico 6, IPHAN/Monumenta, DF- Brasília, **2006**, 246p.
- ❖ Grayer, R. J. e Kokubum, T.; *Plant fungal interations: The search for phytoalexins and other antifungal compounds from higher plants*; *Phytochemistry*; **2001**, 56, 3: 253-263.
- ❖ Guerra, A.; Mendonça, R.; Ferraz, A.; Lu, F.; Ralph J.; *Structural Characterization of Lignin during Pinus taeda Wood Treatment with Ceriporiopsis subvermispora*. *Applied and Environmental Microbiology* **2004**, 70, 7: 4073–4078.
- ❖ Gupta, S.; Jha, B. N.; Gupta, G. K.; Gupta, B. K.; Dhar, K. L.; *Coumestan from seeds of Psoralea corylifolia*. *Phytochemistry* **1990**, 29, 7: 2371-2373.
- ❖ Harbone, J.B.; Baxter, H.; *Phytochemical dictionary: a handbook of bioactive compounds from plants*. Taylor & Francis, London, **1995**.
- ❖ Harbone, J.B.; *Phytochemical Methods: A guide to modern techniques of plantsanalysis*. Chapman and Hall, London, **1973**.
- ❖ Harbone, J.B.; *The flavonoids advances in research since 1986*, Chapman e Hall, London, **1994**, cap. 5.

- ❖ Hegnauer, R.; Grayer-Barkmeyer, R. J.; *Relevance of seed polysaccharides and flavonoids for the classification of the leguminosae-A chemotaxonomic Approach*. *Phytochemistry* **1993**, 1, 34: 3-16.
- ❖ Herathu, H. M. T. B.; Silva, S. de; *New constituents from *Gliricidia sepium**; *Fitoterapia* **2000**, 71, 722-724.
- ❖ Hesse, M.; Meier, H.; Zeeh, B.; *Spektroskopische methoden in der organischen chemie*. Georg Thieme verlag Stuttgart, New York, **1995**.
- ❖ Heywood, V. H.; *The leguminosae- A systemic purview*. In: Harbone, J. B.; Boulter, D., Turner, B. L. (ed) *Chemotaxonomy of the leguminosae*. Academic Express, London, **1971**, cap. 1.
- ❖ Ibarra, D.; Del Rio, J. C.; Gutierrez, A.; Rodriguez, I. M.; Romero, J.; Martinez, M. J.; Martinez, A. T.; *Chemical characterization of residual lignins from eucalypt paper pulps*. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* **2005**, 74: 116–122.
- ❖ Joseph, B.; Priya, R. M.; *Phytochemical and biopharmaceutical aspects of *Psidium guajava* (L.) essential oil: A review*. *Res. J. Med. Plant* **2011**, 5: 432-442.
- ❖ Joshi, B. S.; Kamat, V. N.; *Tuberosin: A new pterocarpan from *Pueraria tuberosa* DC*. *J Chem Soc Perkin 1* **1973**, 9: 907-911.
- ❖ Kaar, W. E.; Cool, L. G.; Merriman, M. M.; Brink, D. L.; *The complete analysis of wood polysaccharides using HPLC*. *J. Wood Chem. Technol* **1991**, 11:447–463.
- ❖ Kamida, H.M.; Durran, T.L.R.; Monteiro, R.T.R.; Armas, E.D.; *Biodegradação de efluente têxtil por *Pleurotus sajor-caju**. *Química Nova* **2005**, 28, 629-632.
- ❖ Kirk, T. K.; Cullen, D.; *Em Environmentally Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry*. John Wiley & Sons, Young, R., Akhtar, M. (eds.), New York, **1998**, cap. 9.
- ❖ Klock, U.; Muñiz, G. I. B. de; Hernandez, J. A.; Andrade, A. S. de.; *Química da madeira*. 3ª. Ed., Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Agrárias, Departamento de Engenharia e Tecnologia Florestal, **2005**.
- ❖ Komatsu, M.; Yokoe, I.; Shirataki, Y.; *Studies on the constituents of *Sophora* species XIV. Constituents of the roots of *Sophora franchetiana* Dunn*. *Chem. Pharm. Bull.* **1981**, 29, 2: 532-538.
- ❖ Lamb. C.; Dixon. R. A.; *The oxidative burst in plant disease resistance*; *Annual Review of plant Physiology and Plant molecular biology* **1997**, 48: 251-275.

- ❖ Lee, J. H., Lee, B. W., Kim, J. H., Jeong, T. S., Kim, M. J., Lee, W. S. e Park, K. H.; *LDL-Antioxidant Pterocarpanes from Roots of Glycine max (L.) Merr.*; J. Agric. Food Chem.; **2006**, 54, 2057–2063.
- ❖ Lemos, S. A. de; Morais, E. A. do N.; Mello D. C. de; *Análise da madeira do Pinus oocarpa parte II : caracterização estrutural da lignina de madeira moída*. R. Árvore **2005**, 29, 3: 461-470.
- ❖ Lenz, B.L.; *Application of nuclear magnetic resonance spectroscopy to characterization of lignin*. Tappi Journal, Atlanta, **1968**, v.51, 511-519 p.
- ❖ Lewis, G.P.; Schrire, B.; Mackinder, B.; Lock, M.; *Legumes of the world*. The Royal Botanic Garden. Kew Publishing, **2005**, 592 p.
- ❖ Lim, S. Y.; Dence. C. W.; *Methods in lignin chemistry*; Springer Verlag, Berlin, **1992**, 578p.
- ❖ Luna, J.S.; Santos, A.F.; Lima, M.R.F.; Omena, M.C.; Mendonça, F.A.C.; Bieber, L.W.; Sant’Ana, A.E.G.; *A study of the larvicidal and moluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil*. Journal of Ethnopharmacology **2005**, 97: 199-206.
- ❖ Lundquist, K; *NMR Studies of Lignin 3. ¹H NMR Spectral Data for Lignin Model Compounds*; Acta chemical Scandinavia, **1979**, B33: 418-420.
- ❖ Magalhães, A. F.; Tozzi, A. M. G. A.; Santos, C. C.; Magalhães, E. G.; *Chemical indexes calculated for 8,11,13-trienabietane diterpenoids isolated from swartzia species*. Eclética química **2010**, 35, 3: 169-177.
- ❖ Mainieri, C.; Primo, B.L.; *Madeiras denominadas “angelim” estudo anatômico macro e microscópico*. Anu. Bras. Econ. Flor. **1968**, 19: 39-87.
- ❖ Malan, E.; Swinny, E.; *Flavonoids and Isoflavonoids From The Heartwood Of Virgilia Orobooides*. Phytochemzstry **1990**, 29, 10: 3307-3309.
- ❖ Marqui, S. R. de; Lemos, R. B.; Santos, L. Á.; Castro-Gamboa, I.; Cavalheiro, A. J.; Bolzani, V. da S.; Silva, D. H. S.; *Saponinas Antifúngicas de Swartzia Langsdorffii*. Quim. Nova **2008**, 31, 4: 828-831.
- ❖ McCarthy, J. L.; Islam, A.; *Lignin Chemistry, Technology, and Utilization: A Brief History*. American Chemical Society. Washington, **2000**, Cap. 1, 2–99p.
- ❖ Mello, J. P. C.; Santos, S. C.; *Em Farmacognosia: da planta ao medicamento*; Simões, C. M. O.; Schenckel, E. P., orgs.; 3ª ed., Ed. UFSC: Porto Alegre, **2001**.

- ❖ Miller, R. B.; *In Wood Handbook- Wood as an engineering material*. In: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Forest Products Laboratory, Madison, **1999**, 463p.
- ❖ Miller, R. B.; *Characteristics and availability of commercially important woods*. In *Wood Handbook-wood as an engineering material*. Department of Agriculture, Forest Service, Forest Products Laboratory, Madison, **1999**, 463p.
- ❖ Miyase, T.; Sano, M.; Nakai, H.; Muraoka, M.; Nakazawa, M.; Suzuki, M.; Yoshino, K.; Nishi-hara, Y.; Tanai, J.; *Antioxidants from Lespedeza homoloba*. *Phytochemistry* **1999**, 52, 2: 303-310.
- ❖ Morais, S. A. L. de; Nascimento, E. A. do; Melo, D. C. de; *Análise da madeira de Pinus oocarpa. Parte I – Estudo dos constituintes macromoleculares e extrativos voláteis*. *Revista Arvore* **2005**, 29, 3:461-470.
- ❖ Moriya, R.; Gonçalves, A.; Duarte, M.; *Ethanol/water pulps from sugar cane straw and their biobleaching with xylanase from Bacillus pumilus*. *Applied biochemistry and biotechnology* **2007**, 137–140, 1-12: 505.
- ❖ Morrison, I.M.; *Isolation and analysis of lignin-carbohydrate complexes from Lolium multiflorum*. *Phytochemistry* **1973**, 12: 2979.
- ❖ Murkies, A.L.; Wilcox, G.; Davis, S.R.; *Phytoestrogens*; *J Clin Endocrinol Metab* **1998**, 83:297-303.
- ❖ Nakatsu, T.; Junior, A. T. L.; Junior, J. W. C.; Kang, R. K. L.; *Biological activity of essential oils and their constituents*; Atta-ur-Rahman (Ed.) *Studies in Natural Products Chemistry*, Takasago Institute for Interdisciplinary Science, U.S. A., **2000**, v.21.
- ❖ Neto, V. S. G.; Rebelo, J. M. M.; *Aspectos epidemiológicos do dengue no município de São Luis*, FIOCRUZ, Maranhão, **2004**.
- ❖ Oliveira, A. M. F.; Lepage, E. S.; *Controle de qualidade*. In: LEPAGE, E.S. (coord). *Manual de preservação da Madeira*; São Paulo IPT, SICCT, 1, 5: 99-278, **1986**.
- ❖ Oliveira, J. T. da S.; Souza, L. C. de; Lucia, R. M. D.; Júnior, W. P. de S.; *Influência dos extrativos na resistência ao apodrecimento de seis espécies de madeira*. *R. Árvore* **2005**, 29, 5: 819-826.
- ❖ Oliveira, J. T. S.; Della Lúcia, R. M.; *Teores de extrativos de 27 espécies de madeiras nativas do Brasil ou aqui introduzidas*; Viçosa, MG: Sociedade de Investigações Florestais, Boletim Técnico, 9, **1994**, 5 p.

- ❖ Oliveira, L. S.; Santana, A. L. B. D.; Maranhão, C. A.; Miranda, R. de C.; Lima, V. L. A. G. de; Silva, S. I. da; Nascimento, M. S.; Bieber, L.; *Natural resistance of five woods to Phanerochaete chrysosporium degradation*. International Biodeterioration & Biodegradation **2010**, 64, 8:711-715.
- ❖ Oliveira, L. Z. de; Cesarino, F.; Pantoja, T. de F.; Môro, F. V.; *Aspectos morfológicos de frutos, sementes, germinação e plântulas de Hymenolobium petraeum*. Ciência Rural **2010**, 40, 8: 1732-1740.
- ❖ Onuorah, E.O.; *The wood preservative potentials of heartwood extracts of Milicia excelsa and Erythrophleum suaveolens*. Bioresource Technology; **2000**, 75: 171-173.
- ❖ Pandey, K.K.; *A study of chemical structure of soft and hardwood and wood polymers by FTIR spectroscopy*. Journal of Applied Polymer Science; **1999**, 71, 12: 1969-1975.
- ❖ Pansera, M. R.; Santos, A. C. A.; Paese, K.; Wasum, R.; Rossato, M.; Rota, L. D.; Pauletti, G. F.; Serafini, L. A.; *Análise de taninos totais em plantas aromáticas e medicinais cultivadas no Nordeste do Rio Grande do Sul*. Rev. Bras. Farmacogn.; **2003**, 13, 1:17-22.
- ❖ Pastore, T. C. M.; Oliveira, C. C. K. de; Rubim, J. C.; Santos, K. de O.; *Efeito do intemperismo artificial em quatro madeiras tropicais monitorado por espectroscopia de infravermelho (DRIFT)*. Quim. Nova **2008**, 31, 8: 2071-2075.
- ❖ Patton, A. R.; Gieseker, L.; *Seasonal changes in the lignin and cellulose content of some Montana grasses*. J. Anim. Sci.; **1942**, 1, 22.
- ❖ Pereira, J. C. D.; Sturion, J. A.; Higa, A. R.; Higa, R. C. V.; Shimizu, J. Y.; *Características da madeira de algumas espécies de eucalipto plantadas no Brasil*; Colombo: Embrapa Florestas, (Embrapa Florestas. Documentos, 38), **2000**, 113 p.
- ❖ Perez, J.; Munoz-Dorado, J.; De La Rubia, T.; Martinez, J.; *Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: na overview*. Int. Microbiology **2002**, 5, 53-63.
- ❖ Petrucci, E. G. R.; *Materiais de Construção*. 4ª ed., Porto Alegre: Globo, **1979**.
- ❖ Philipp, P.; D'Almeida, M. L. O.; *Celulose e papel: Tecnologia de fabricação da pasta celulósica*, 2ª ed., IPT: São Paulo, **1988**.
- ❖ Pietta, P. G.; *Flavonoids as antioxidants*. Journal of natural products **2000**, 63, 1035-1042.

- ❖ Pio-Corrêa, M.; *Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. Imprensa Nacional, v.3, p.238-239, Rio de Janeiro, **1984**, v.5, 108-129 p.
- ❖ Plomion, C.; Leprovost, G.; Stokes, A.; *Wood formation in trees*. Plant Physiology **2001**, 127: 1513-1523.
- ❖ Prasad, A. V. K.; Kapil, R. S.; Popli, S. P.; *Structures of pterocarponoids: Anhydrotuberosin, 3-O-methylanhidrotuberosin and tuberostan from Pueraria tuberosa*. Indian Journal of chemistry **1985**, 24B, 236-239.
- ❖ Prasad, A. V. K.; Kapil, R. S.; Popli, S. P.; *Structures of pterocarponoids: Anhydrotuberosin, 3-O-Methylanhidrotuberosin e tuberostan from Pueraria tuberosa*. Indian Journal of chemistry **1985**, 24B, 236-239.
- ❖ Queiroz, C. R. A. dos A.; Morais, S. A. L. de; Nascimento, E. A. do; *Caracterização dos taninos da aroeira-preta (Myracrodruon urundeuva)*. Rev. Árvore **2002**, 26, 4: 493-497.
- ❖ Ramos, L. P.; *The Chemistry Involved In The Steam Treatment Of Lignocellulosic Materials*. Quim. Nova; **2003**, 26, 6: 863-871.
- ❖ Reynaud, J. E.; Guilet, D.; Terreux, R.; Lussignol, M.; Walchshofer, N.; *Isoflavonoids in non-leguminous families: an update Received (in Cambridge, UK)*. Nat. Prod. Rep. **2005**, 22: 504 -515.
- ❖ Rio, R. G. W.; *Métodos de controle químico de amostras de própolis* (Dissertação de mestrado). Universidade de São Paulo, São Paulo, **1996**.
- ❖ Rocha, G. J. M.; *Deslignificação de Bagaço de cana-de-açúcar assistida por oxigênio* (Teses de doutorado). Universidade de São Paulo, São Carlos, **2000**.
- ❖ Rowell, R.M.; Pettersen, R.; Han, J.S.; Rowell, J.S.; Tshabalala, M.A.; *Cell wall chemistry. In Handbook of wood chemistry and wood composites*. Roger M.Rowell (ed.), Washington, **2005**.
- ❖ Saliba, E. de O. S.; Rodriguez, N. M.; Morais, S. A. L.; Piló-Veloso, D.; *Ligninas – Métodos de Obtenção e Caracterização Química*. Ciência Rural **2001**, 31, 5: 917-928.
- ❖ Santana, A. L. B. D.; Maranhão, C. A.; Santos, J. C.; Cunha, F. M.; Conceição, G. M.; Bieber, L. W.; Nascimento, M. S.; *Antitermitic activity of extractives from three Brazilian hardwoods against Nasutitermes corniger*. International Biodeterioration & Biodegradation **2010**, 64, 7-12.

- ❖ Santana, A. L. B. D.; *Estudo Químico, Antitermítico e Antifúngico da madeira de lei Anadenanthera colubrina (Vell.) Brenan var. Cebil (Griseb.) von Reis Alt. (Angico-de-carço)* (tese de doutorado), UFPE, Recife, **2011**.
- ❖ Santana, M. A. E.; Rodrigues, L. C.; *Metodologia para determinação do teor de sílica em materiais lignocelulósicos via espectrometria no Ultravioleta-visível*. Ver. floresta e ambiente **2005**, 12, 1: 57 – 62.
- ❖ Santana, M. A. E.; Okino, E. Y. A.; *Chemical composition of 36 Brazilian Amazon forest wood species*. Holzforschung **2007**, 61, 469–477.
- ❖ Sarkanen, K. V.; Ludwig, C. H.; *Lignins: Occurrence, formation, structure and reactions*. John Wiley ed., New York, **1971**, 916.
- ❖ Schimitt, U.; Singh, A.P.; Thieme, H.; Friedrich, P.; Hoffmann, P.; *Electron microscopic characterisation of cell wall degradation of the 400,000-year-old wooden Shöningen spears*. Holz Roh Werkst **2005**, 63: 118-122.
- ❖ Schultz, T.P.; Nicholas, D. D.; *Naturally durable heartwood: evidence for a proposed dual defensive function of the extractives*. Phytochemistry **2000**, 54: 47-52.
- ❖ Schultz, T.P.; Harms, W.B.; Fisher, T.H.; McMurtrey, K.D.; Minn, J. e Nicholas, D.D.; *Durability of angiosperm heartwood- the importance of extractives*. Holzforschung **1995**, 49: 29-34.
- ❖ Seshadri T. R.; *Polyphenols of pterocarpus and Dalbergia woods (Review)*. Phytochemistry **1972**, 11, 881- 898.
- ❖ Silva, B. P. da, Velozo, L. S. M.; Parente J. P.; *Biochanin A triglycoside from Andira inermis*. Fitoterapia **2000**, 71, 663-667.
- ❖ Silva, F. T.; *Obtenção de insumos químicos a partir do aproveitamento integral do bagaço de cana (Tese de Doutorado)*. UNICAMP/Instituto de Química, Campinas, **1995**.
- ❖ Silva, T. M.S.; Carvalho, M. G.; Braz-filho, R.; *Estudo espectroscópico em elucidação estrutural de flavonóides de Solanum Jabrense Agra e Nee e S. paludosum moric*. Quimica nova **1999**, 1-10.
- ❖ Silverstein, R. M.; Bassler, G. C.; Morrill, T. C.; *Identificação espectrométrica de compostos orgânicos*, 5ª Ed., Guanabara Koogan, **1991**.
- ❖ Simon, B. F. De; Muino, I.; Cadahia, E.; *Characterization of volatile constituents in commercial oak wood chips*. J. Agric. Food Chem. **2010**, 58, 9587–9596.

- ❖ Simpson, W.; TenWold, A.; Physical properties and moisture relations of Sjostrom, E.; *Wood Chemistry: Fundamentals and applications*. London: Academic Press, **1981**.
- ❖ Sjostrom, E.; *Wood Chemistry: Fundamentals and applications*. London: Academic Press, **1981**. 71p.
- ❖ Souza, T. J. T.; Apel, M. A.; Bordignon, S.; Matzenbacher, N. I.; Zuanazzi, J. Â. S.; Henriques, A. T.; *Composição química e atividade antioxidante do óleo volátil de Eupatorium polystachyum DC.*, Brazilian Journal of Pharmacognosy **2007**, 17, 3: 368-372.
- ❖ Sousa, C. M. de M.; Silva, H. R. e G.; Vieira-Jr., M.; Ayres, M. C. C.; Costa, C. L. S. da; Araújo, D. S.; Cavalcante, L. C. D.; Barros, E. D. S.; Araújo, P. B. de M.; Brandão, M. S.; Chaves, H. M.; *Fenóis Totais e Atividade Antioxidante de Cinco Plantas Mediciniais*. Quim. Nova **2007**, 30, 2:351-355.
- ❖ Sun, R.; Tomkinson, J.; Wang, S.; Zhu, W.; *Characterization of lignins from wheat straw by alkaline peroxide treatment*. Polymer Degradation and Stability **2000**, 67, 101-109.
- ❖ Swain, T.; *Flavonoids*; ARC Laboratory of Biochemical Systematics, Royal Botanic Gardens, England, **1976**.
- ❖ Syaf, W.; Yoshimoto, T.; Samejima, M.; *Effect of lignin structure on decay resistance of some tropical wood*. Bulletin of Tokyo University Forest **1988**, 69-77 p.
- ❖ Tahara, S.; Ibrahim, R. K.; *Prenylated isoflavonoids-an update*. Phytochemistry **1995**, 38, 5: 1073-1094.
- ❖ Tai, D.S.; Chen, C.L.; Gratzl, J. S.; *Lignin biodegradation products from birch wood by Phanerochaete chrysosporium*. Wood Chem Technol **1990**, 10, 111.
- ❖ Tauil, P.L.; *Urbanização e ecologia do dengue*, Cad. Saúde Pública, v.17(Suplemento), **2001**, 99-102 p.
- ❖ Technical Association of the Pulp and Paper Industry (TAPPI). Atlanta TAPPI Press, **1993**.
- ❖ Trevisan, H.; Marques, F. M. T.; Carvalho, A. G. de; *Degradação natural de toras de cinco espécies florestais em dois ambientes*. Rev. floresta **2008**, 38, 1: 33-42.
- ❖ Tuomela, M.; Vikman, M.; Hatakka, A.; Itavaara, M.; *Biodegradation of lignin in a compost environment: a review*. Bioresource Technology **2000**, 72, 169-183.

- ❖ Veloso, D. P.; Nascimento, E. A.; Morais, S. A. L. de; *Isolamento e análise estrutural de lignina*. Química nova **1993**, 16, 5: 435-448.
- ❖ Vichi, S.; Santini, C.; Natali, N.; Riponi, C.; Lopez-Tamames, E.; Buxaderas, S.; *Volatile and semi-volatile components of oak wood chips analysed by Accelerated Solvent Extraction (ASE) coupled to gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS)*. Food Chemistry **2007**, 102, 1260–1269.
- ❖ Vincken, J. P.; Heng, L.; Groot, A. de; Gruppen, H.; Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry* **2007**, 68: 275-297.
- ❖ Wang, W.; Weng, X.; Cheng, D.; *Antioxidant activities of natural phenolic components from Dalbergia odorifera T. Chen.*. Food Chemistry **2000**, 71, 45-49.
- ❖ Waterman, P. G.; Simon, M.; *Analysis of phenolic plant metabolites (Ecological Methods and Concepts)*. Oxford ed., London, **1994**, 17-20 p.
- ❖ Wiedenhoft, A. C.; Miller, R. B.; *Structure and function of wood. In Handbook of wood chemistry and wood composites*. Roger M. Rowell (ed.), Washington, **2005**, 9-33p.
- ❖ Wonga, K. H.; Li, G. Q.; Li, K. M.; Naumovski, V. R.; Chana, K.; *Kudzu root: Traditional uses and potential medicinal benefits in diabetes and cardiovascular diseases* (review). Journal of Ethnopharmacology **2011**, no prelo.
- ❖ Yenesew, A.; Twinomuhwezi, H.; Kabaru, J. M.; Akala, H. M.; Kiremire, B. T.; Heydenreich, M.; Peter, M. G.; Eyase, F. L.; Waters, N. C.; Walsh, D. S.; *Antiplasmodial and larvicidal flavonoids from derris trifoliata*; Bull. Chem. Soc. Ethiop. **2009**, 23, 3: 409-414.
- ❖ Yuk, H. J.; Lee, J. H.; Curtis-Long, M. J.; Lee, J. W.; Kima, Y. S.; Ryu, H. W.; Park, C. G.; Jeong, T. S.; Park, K. H.; *The most abundant polyphenol of soy leaves, coumestrol, displays potent α -glucosidase inhibitory activity*; Food chemistry **2011**, 126, 1057-1063.
- ❖ W.H.O. *Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides*. World Health Organization, VBC 81.807, **1985**.
- ❖ Zabel, R. A.; Morrel, J. J.; *Wood microbiology decay and its prevention*; Academic Press, New York, **1992**, 432p.

8 ANEXOS

8.1 Composição dos principais reagentes utilizados na abordagem fitoquímica

❖ Reagente de Mayer

Mistura-se em um balão volumétrico de 100 mL, 1,36 g de HgCl_2 para 60 mL de água e 5 g de KI para 10 mL de água, completa-se para 100 mL com água destilada.

❖ Reagente de Dragendorff:

Solução A: dissolveram-se 1,7 g de nitrato de bismuto (III) e 20 g de ácido tartárico em 80 mL de água.

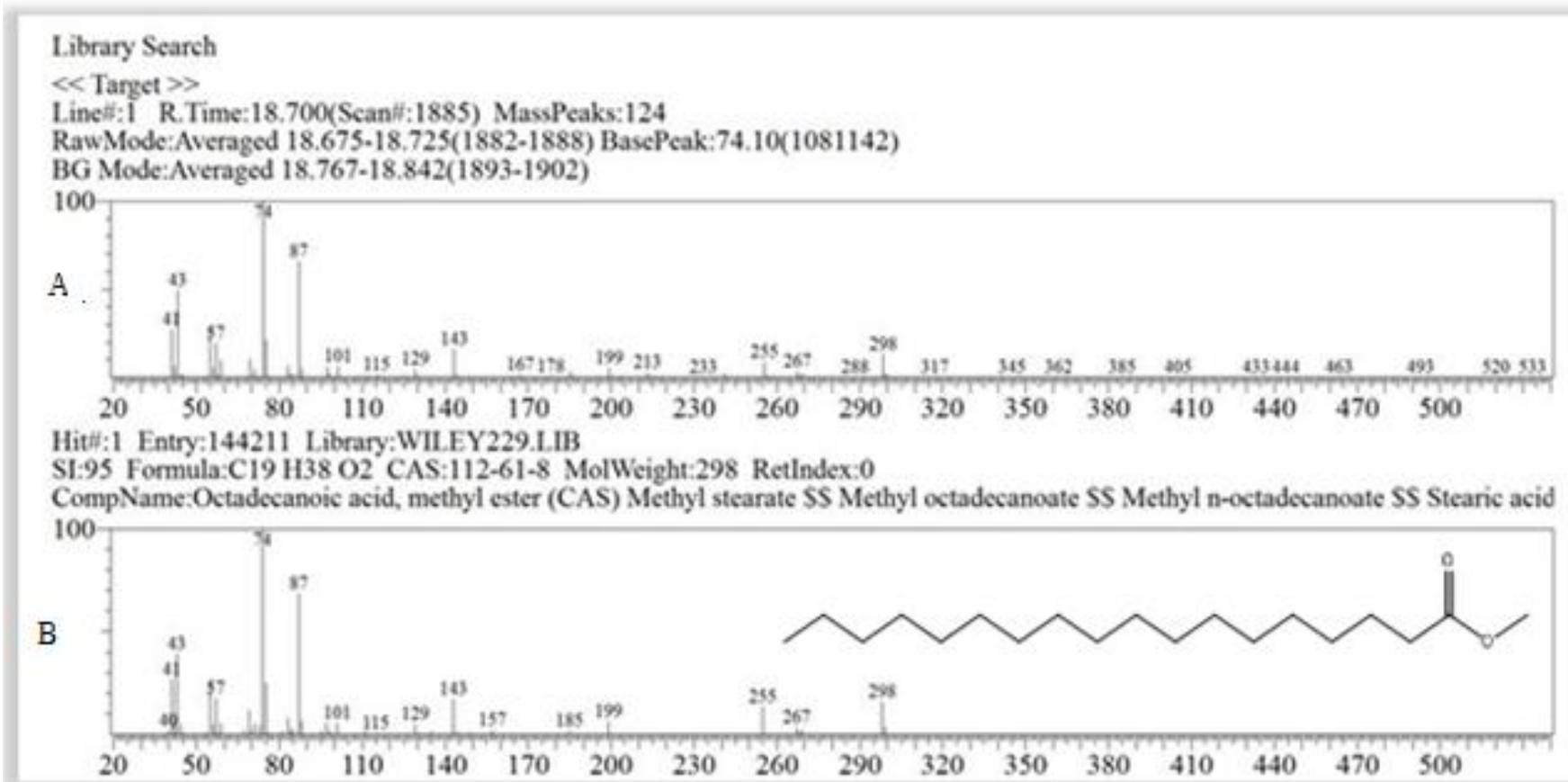
Solução B: dissolveram-se 16 g de iodeto de potássio em 40 mL de água

Reagente: misturam-se 40mL da solução A com 40 mL da solução B.

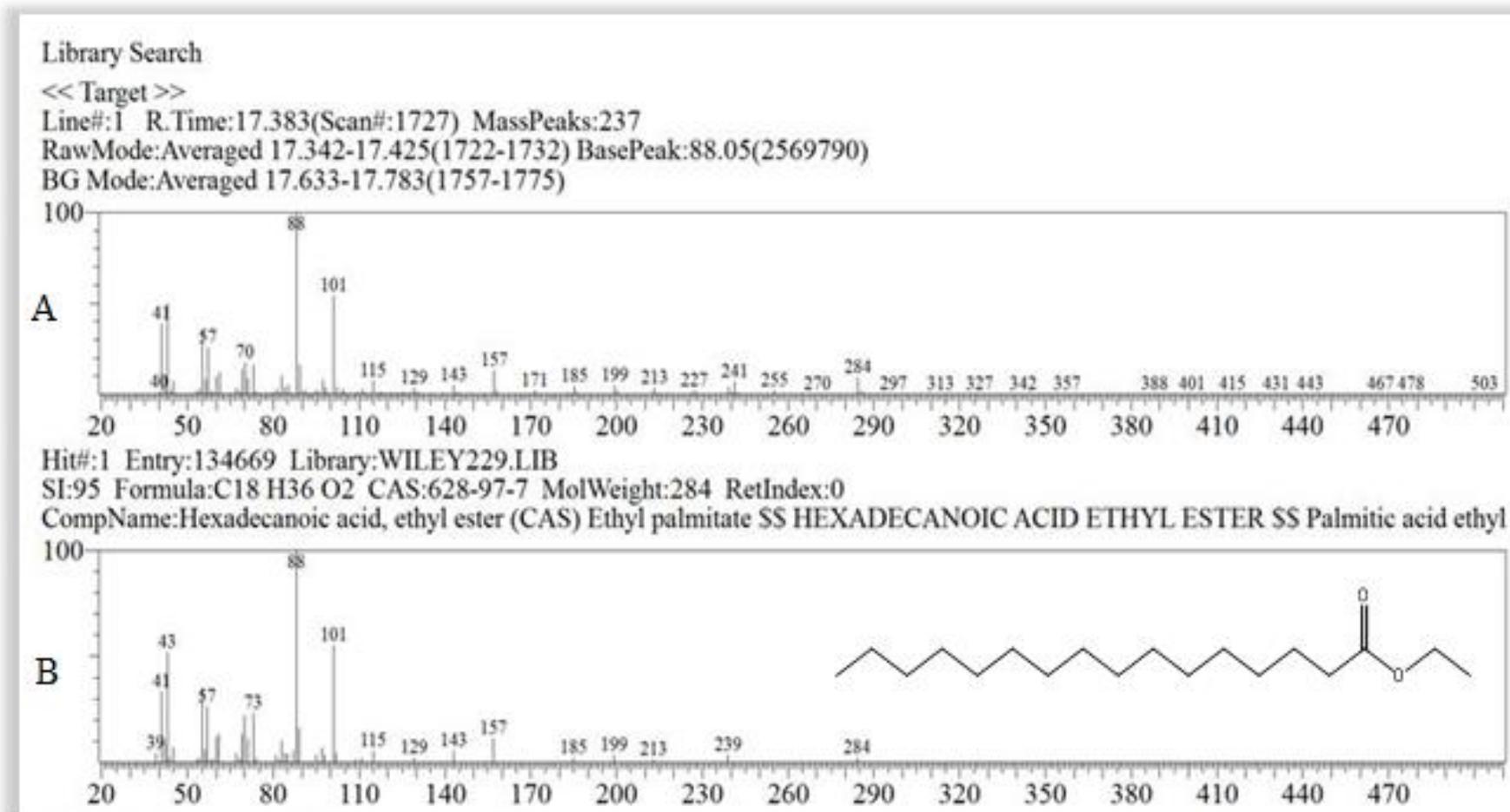
❖ Reagente de Liebermann-Burchard:

Mistura-se 10 mL de anidrido acético e duas gotas de ácido sulfúrico concentrado.

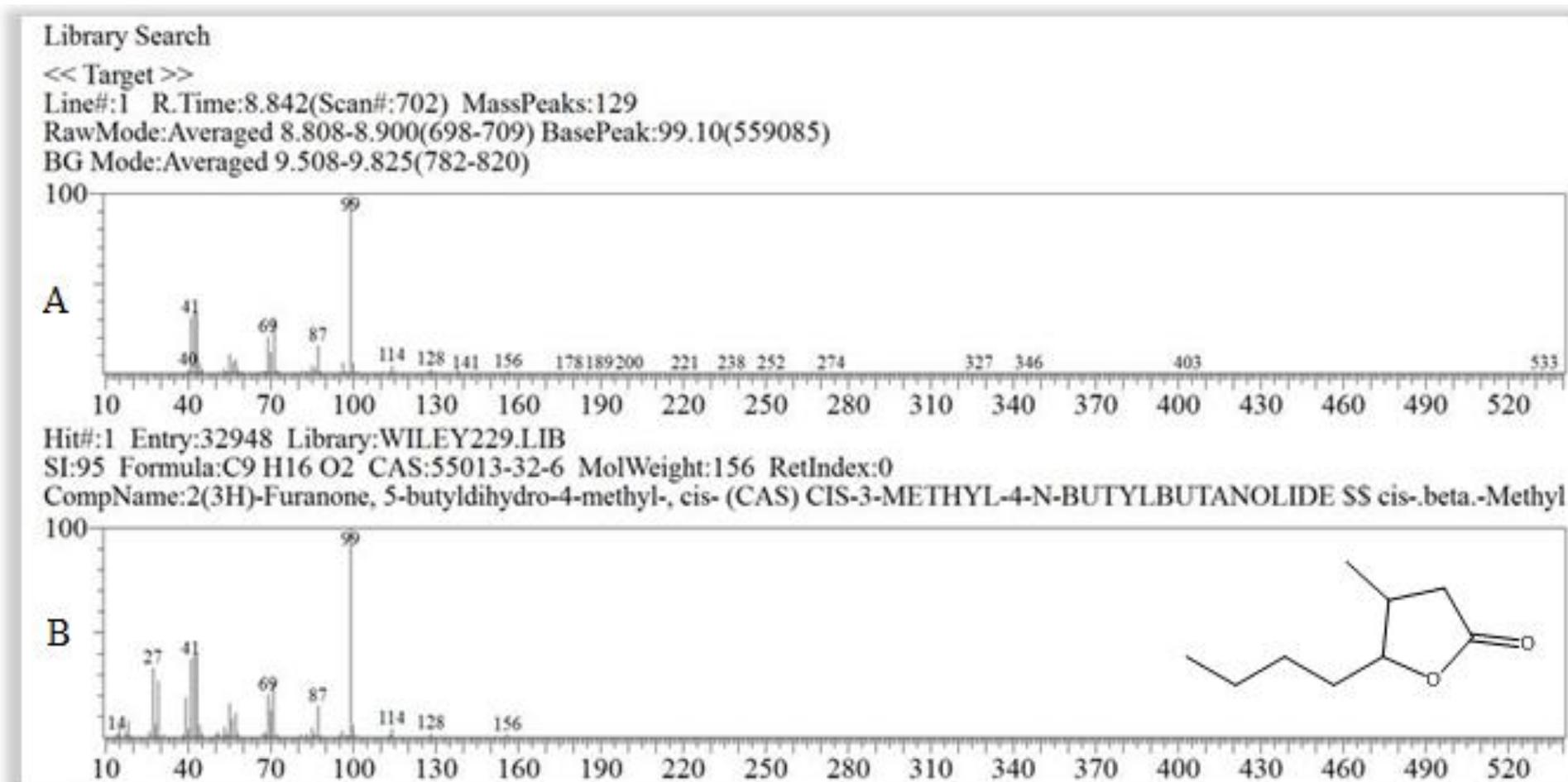
8.2 Cromatograma da análise de GC/MS das frações HPac-A (2-10)



Espectro 01: Espectro de massa da fração 2 (A); espectro de massa da biblioteca WILEY229 (B).



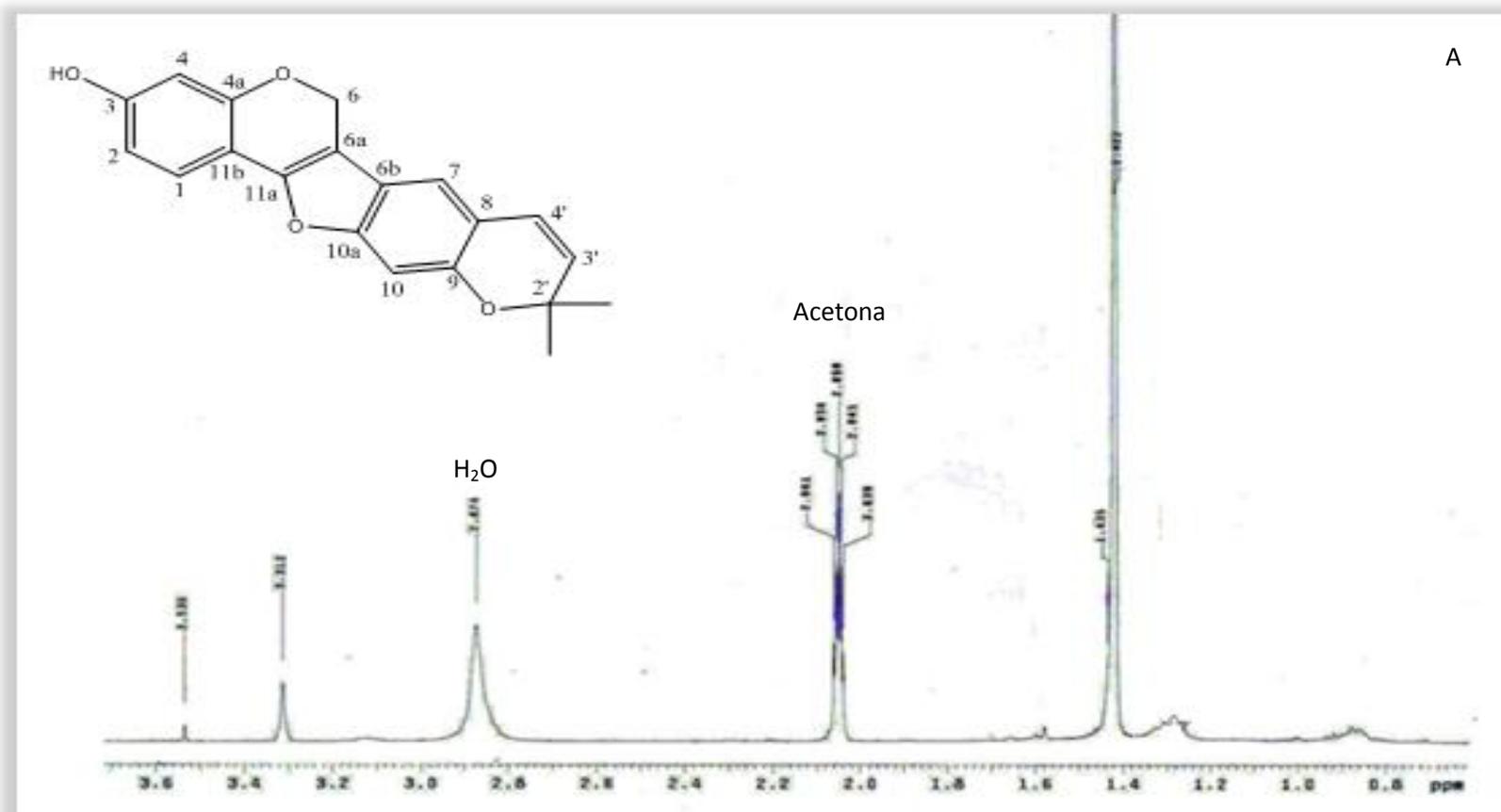
Espectro 02: Espectro de massa da fração 2- 4(A); espectro de massa da biblioteca WILEY229 (B).

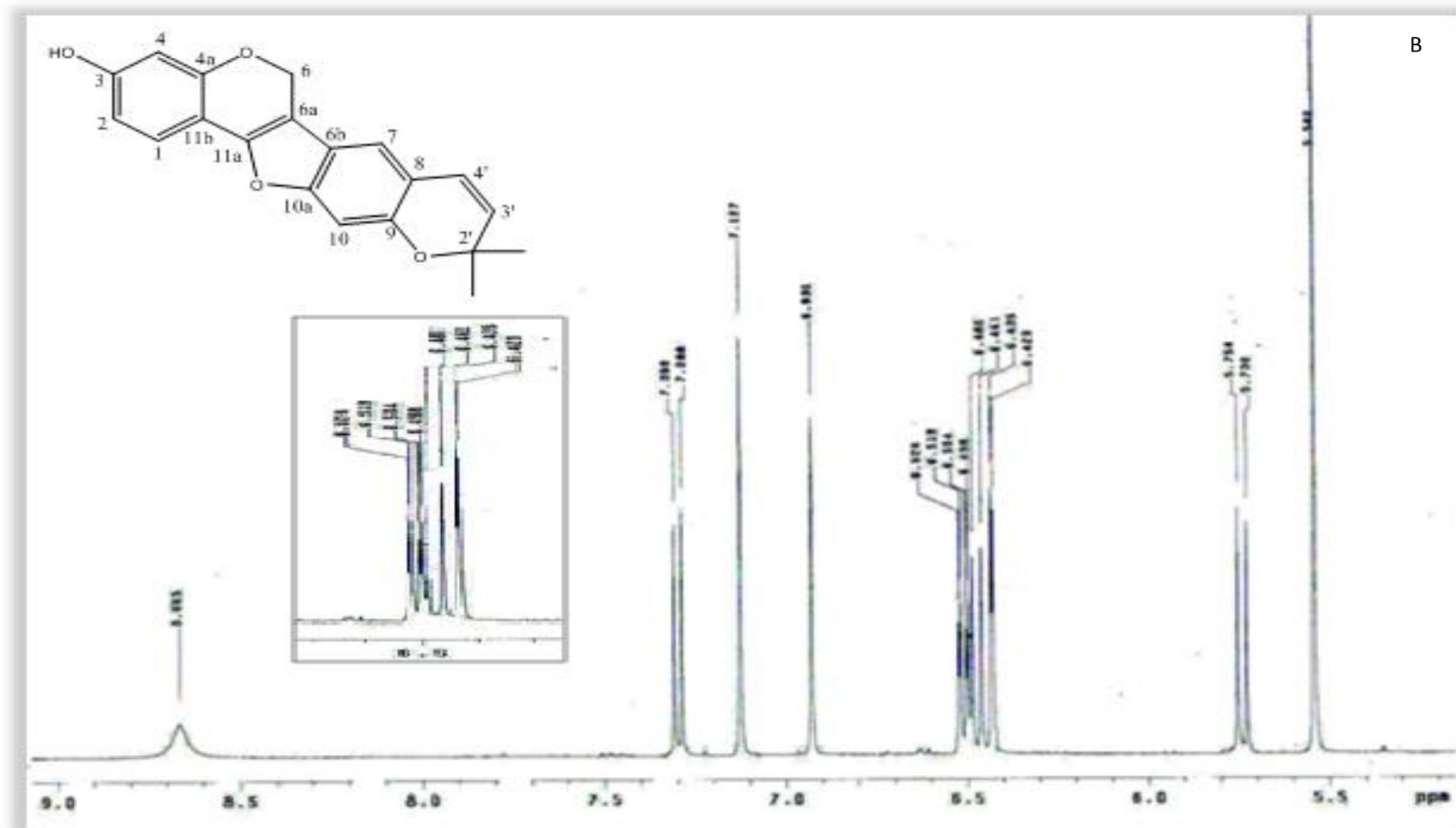


Espectro 03: Espectro de massa da fração 6-10(A); espectro de massa da biblioteca WILEY229 (B).

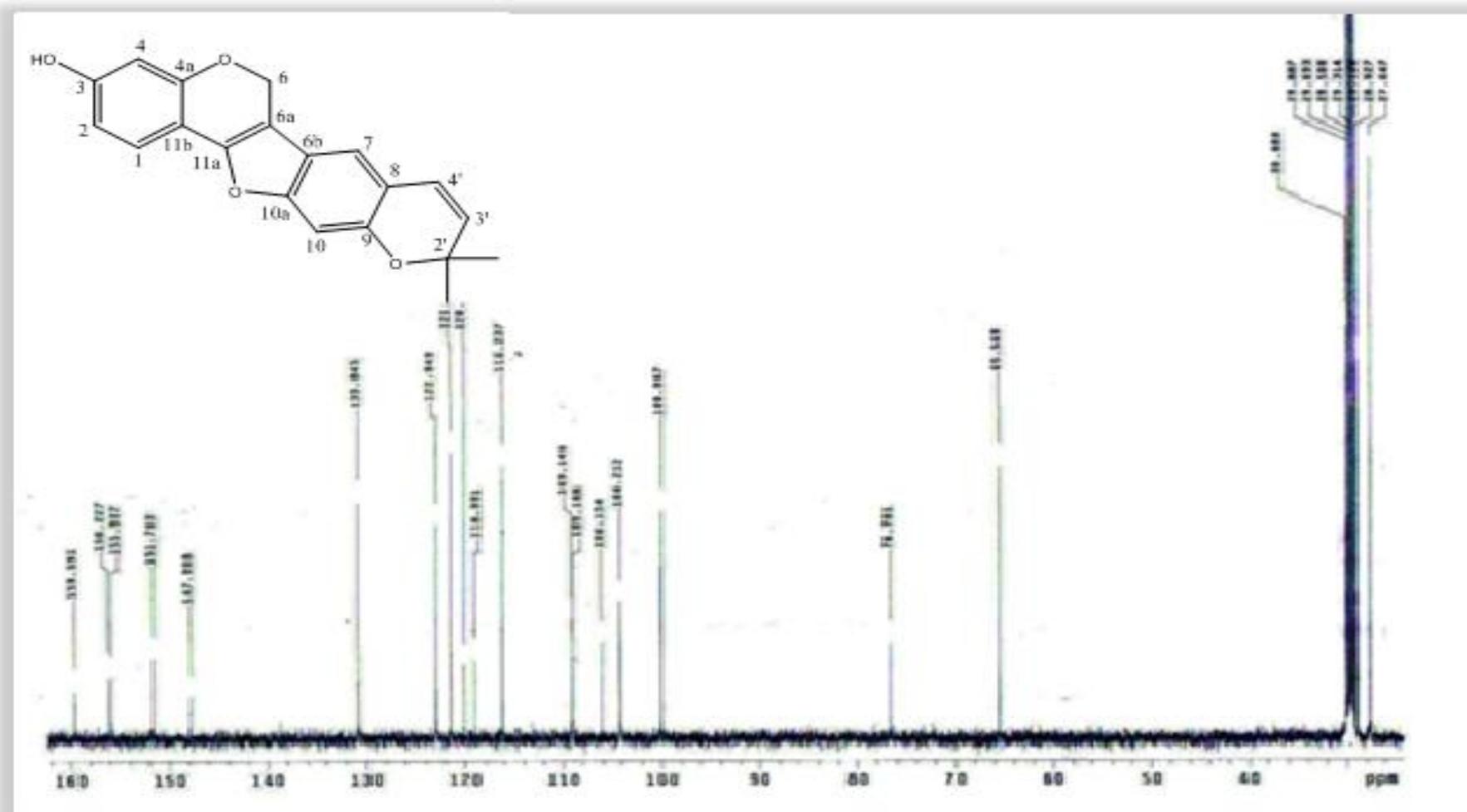
8.3 Espectros das substâncias elucidadas

8.3.1 HP-1

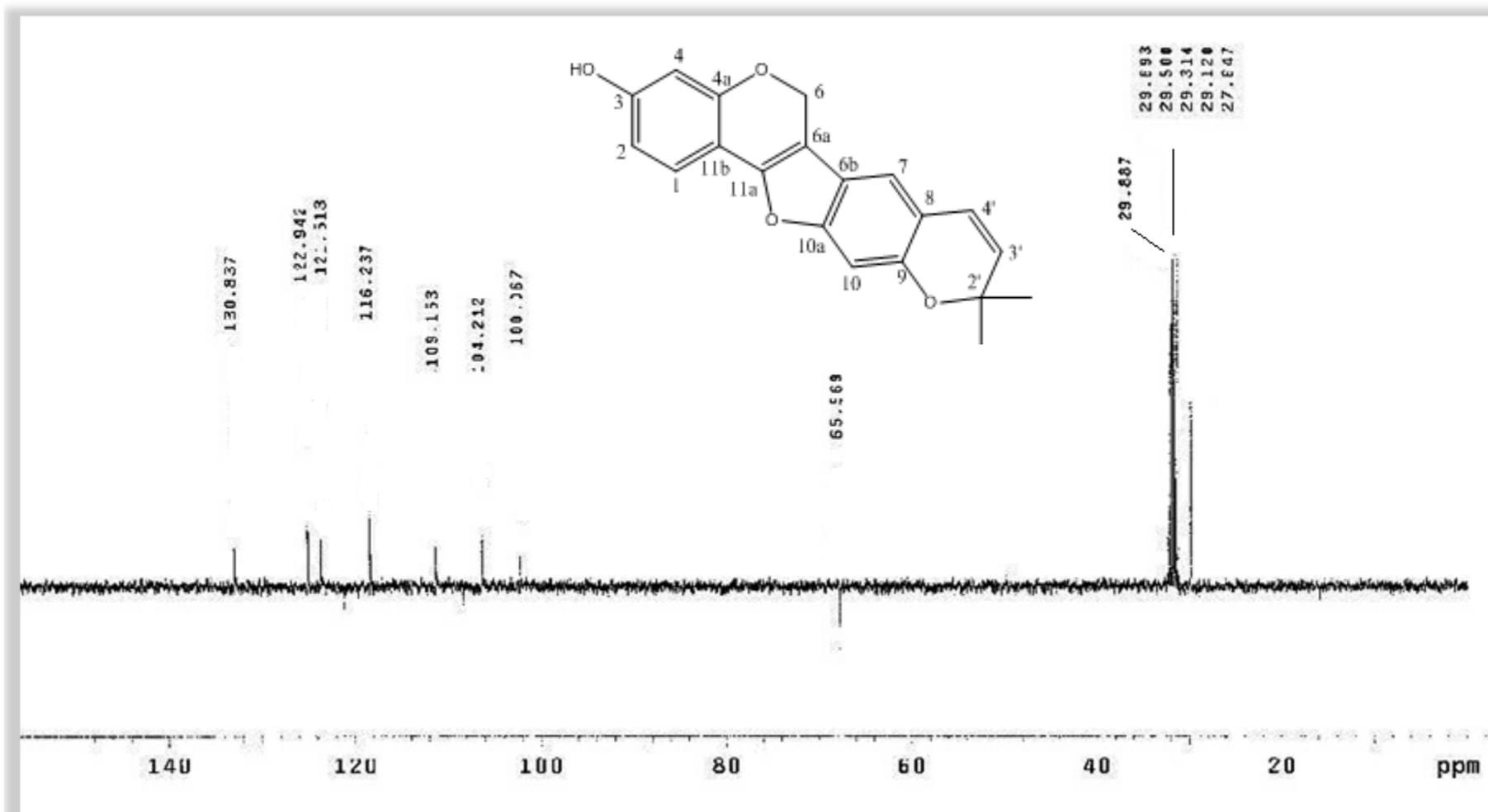


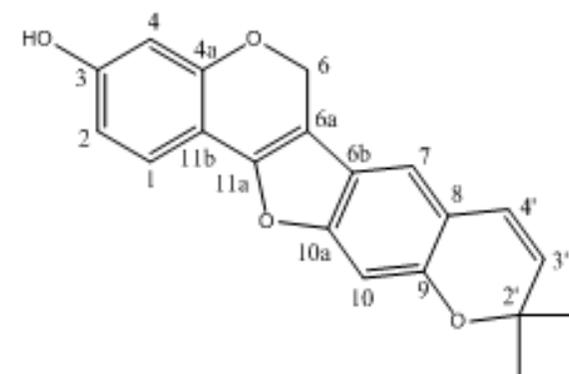
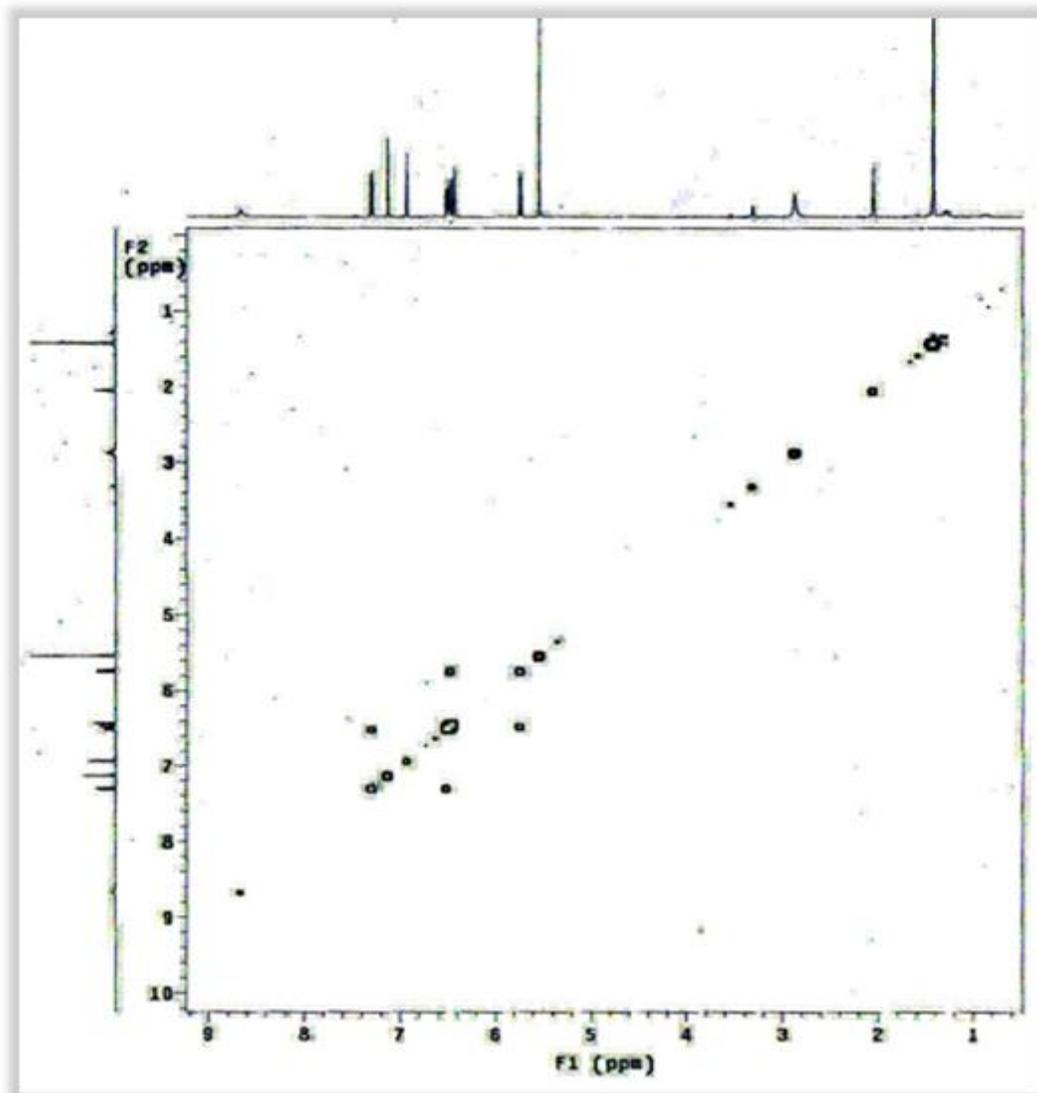


Espectro 04: Ampliação do espectro de RMN de ¹H da amostra HP-1 A e B (400 MHz, acetona-d₆).

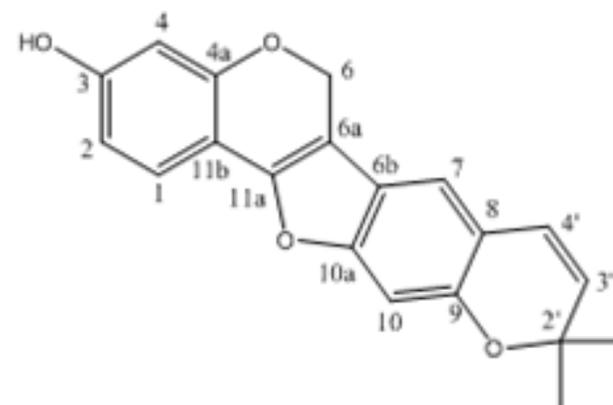
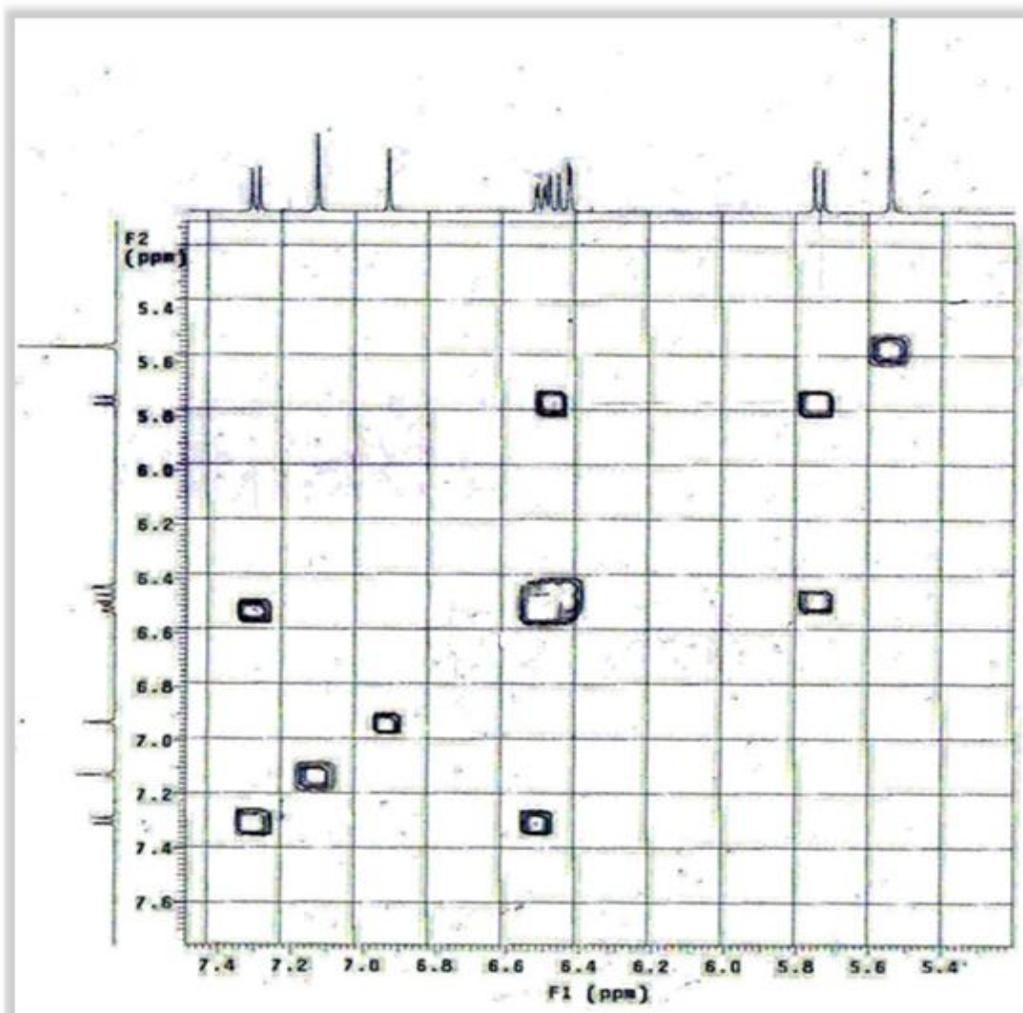


Espectro 05: Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da amostra HP-1 (100 MHz, acetona- d_6)

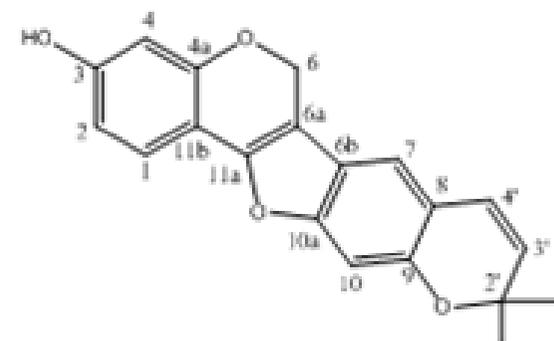
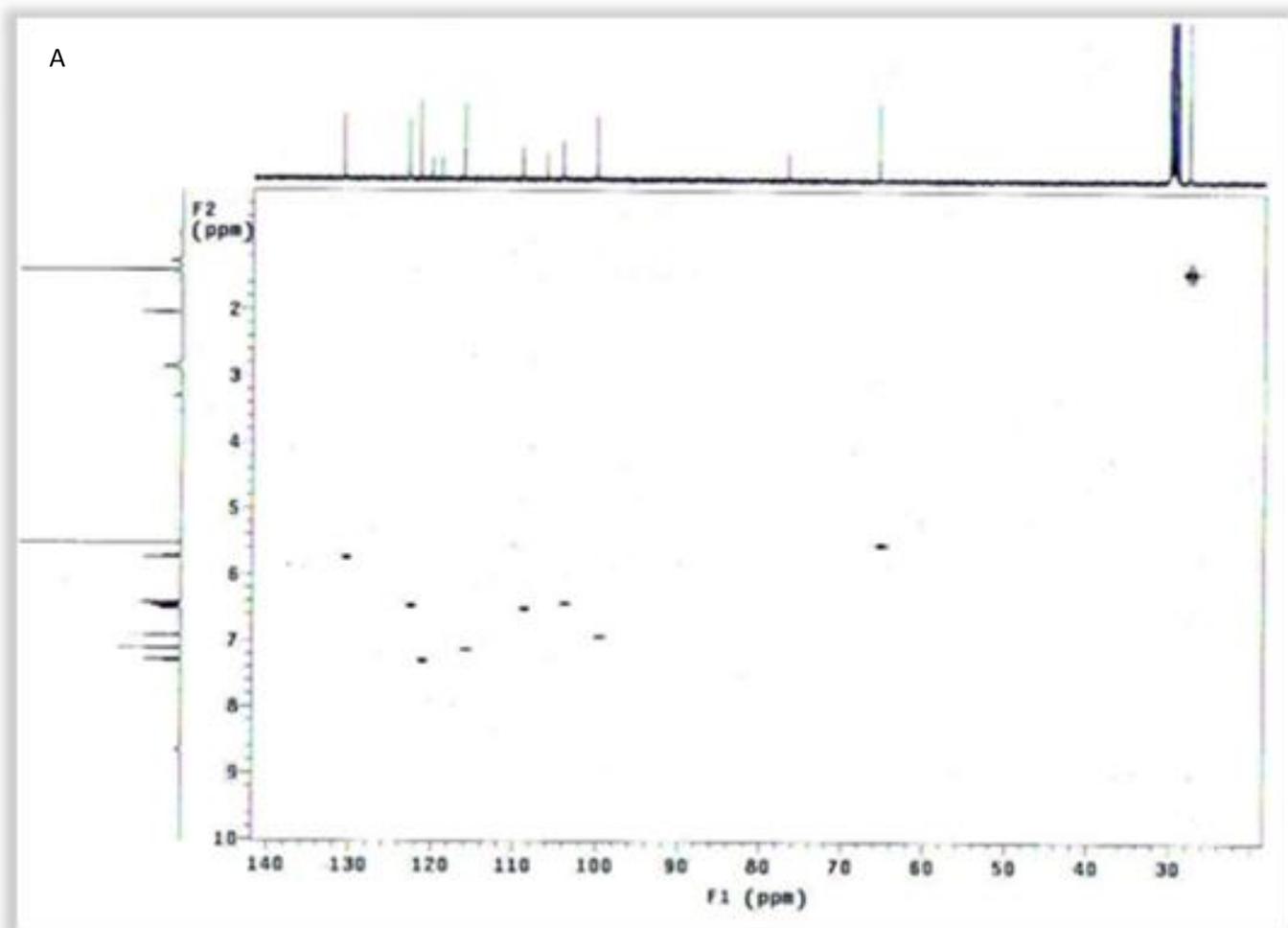
Espectro 06: Espectro do DEPT 135 da amostra HP-1 (100 MHz, acetona-d₆).

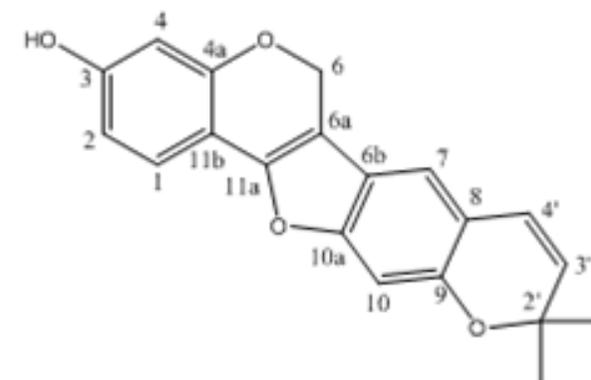
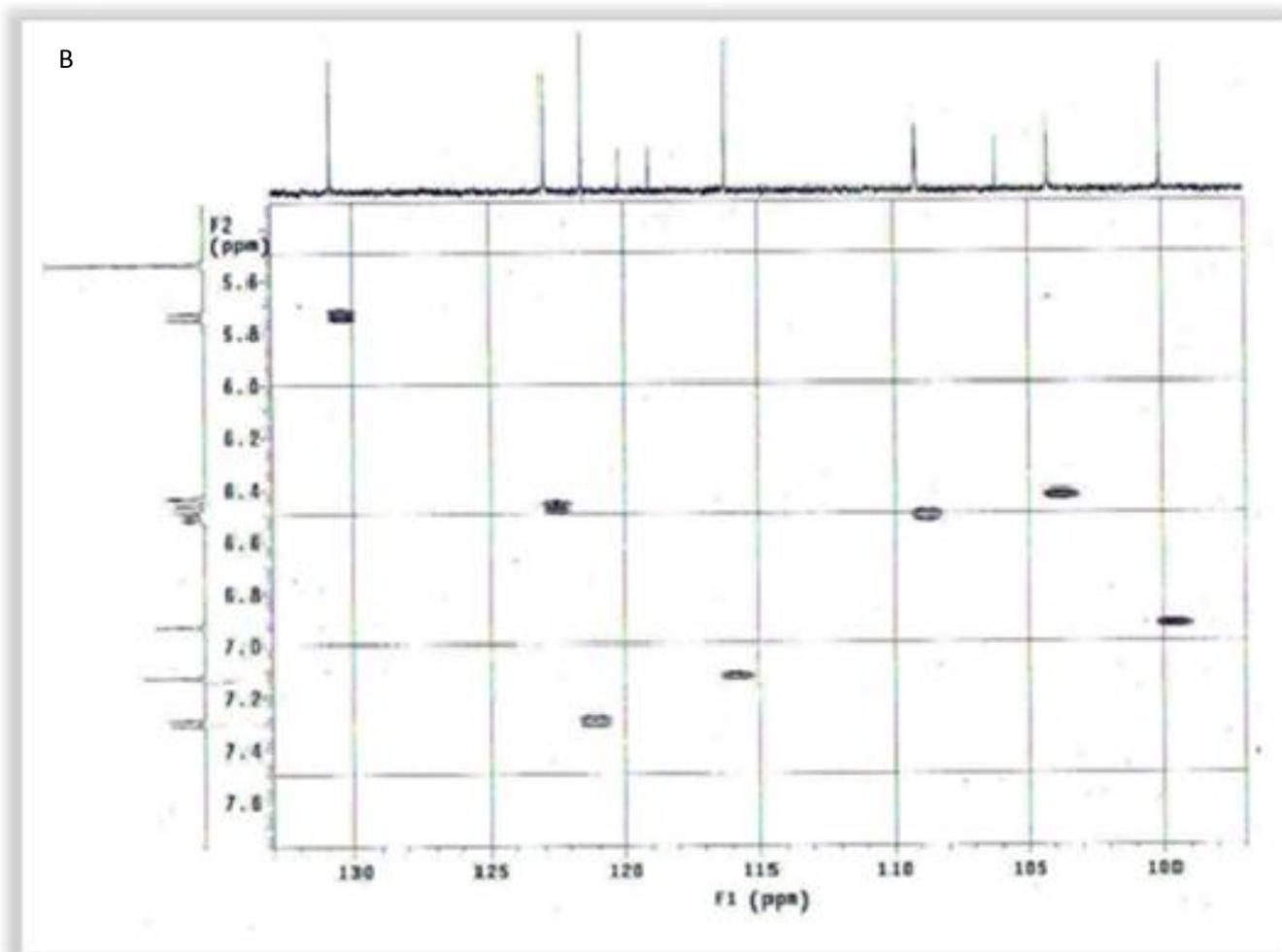


Espectro 07: Espectro ^1H - ^1H COSY da HP-1 (400 MHz, acetona- d_6).

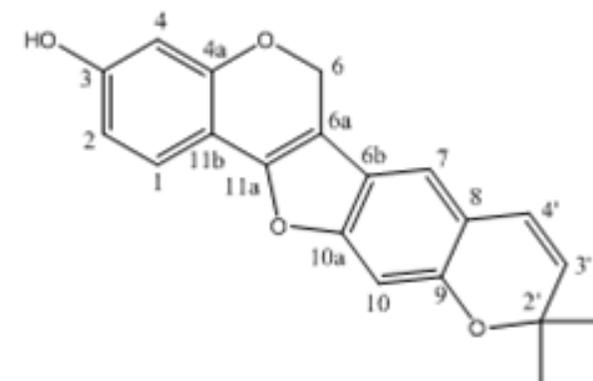
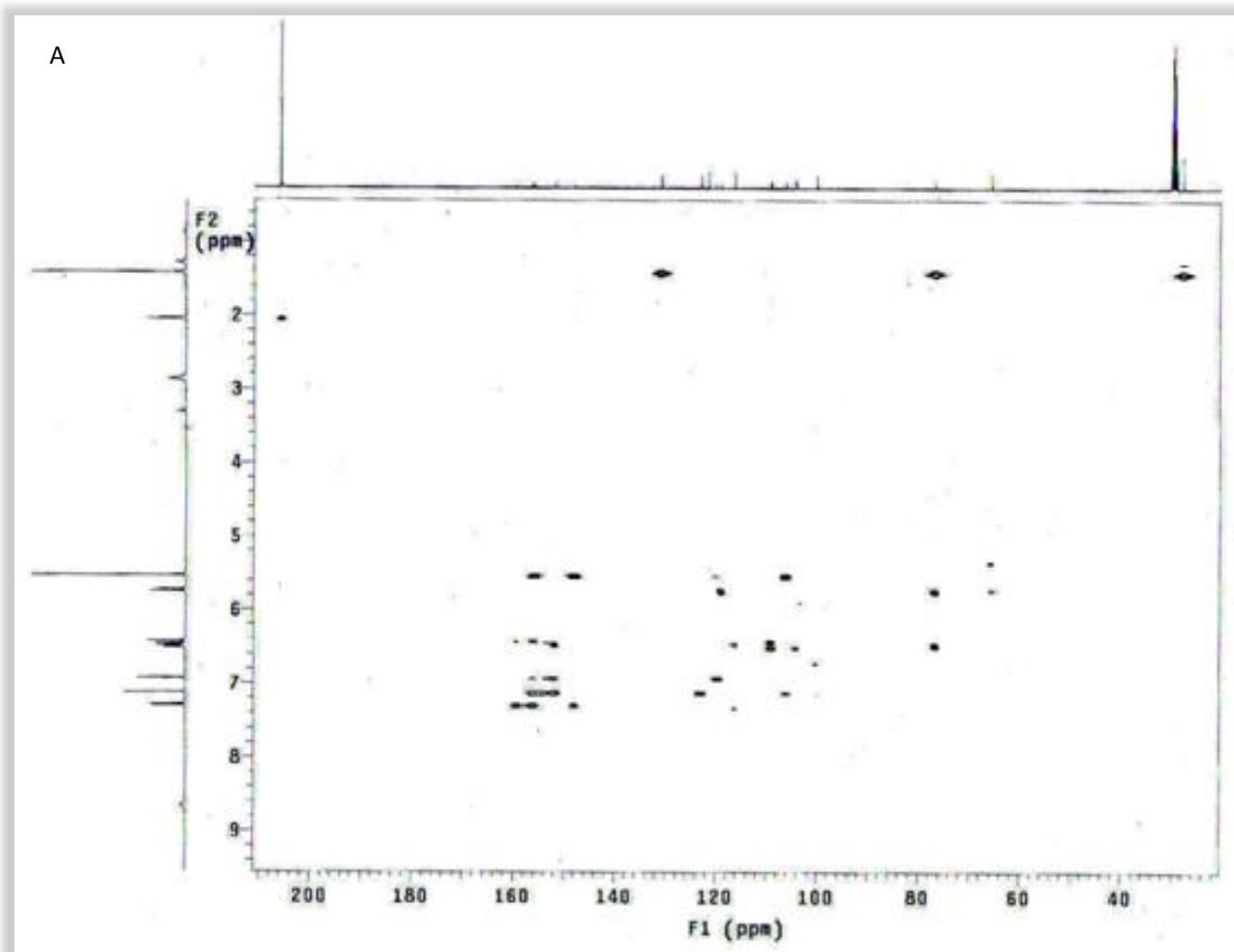


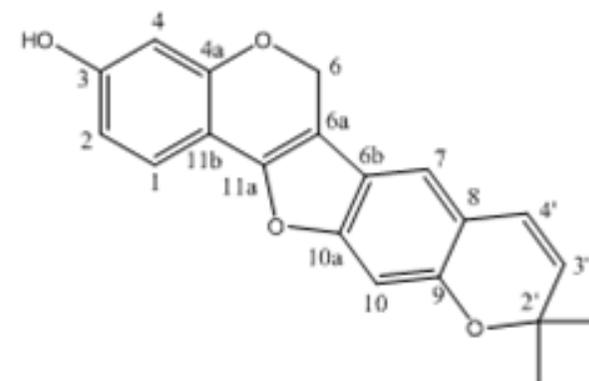
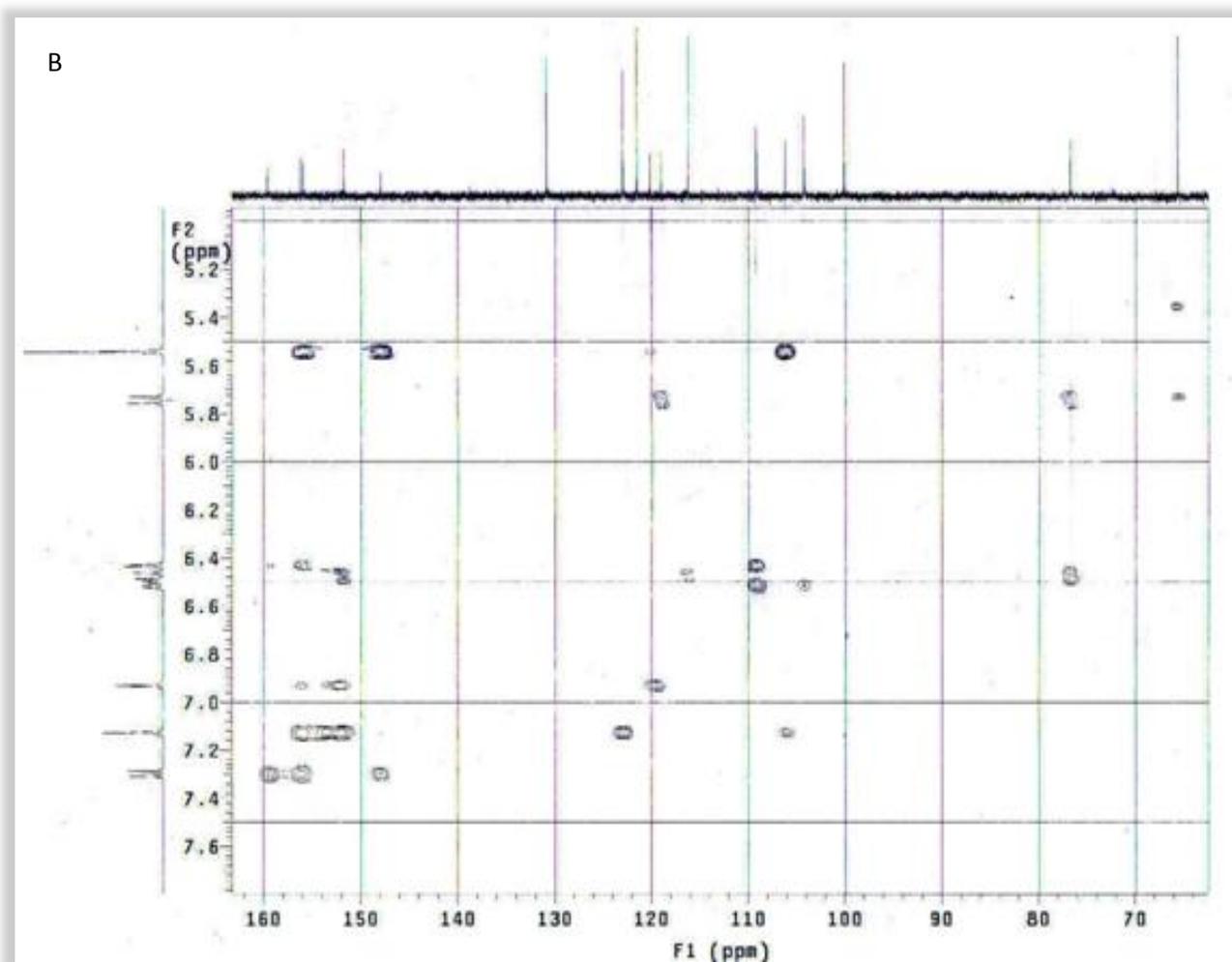
Espectro 08: Ampliação do espectro ^1H - ^1H COSY da amostra HP-1 (400 MHz, acetona- d_6)



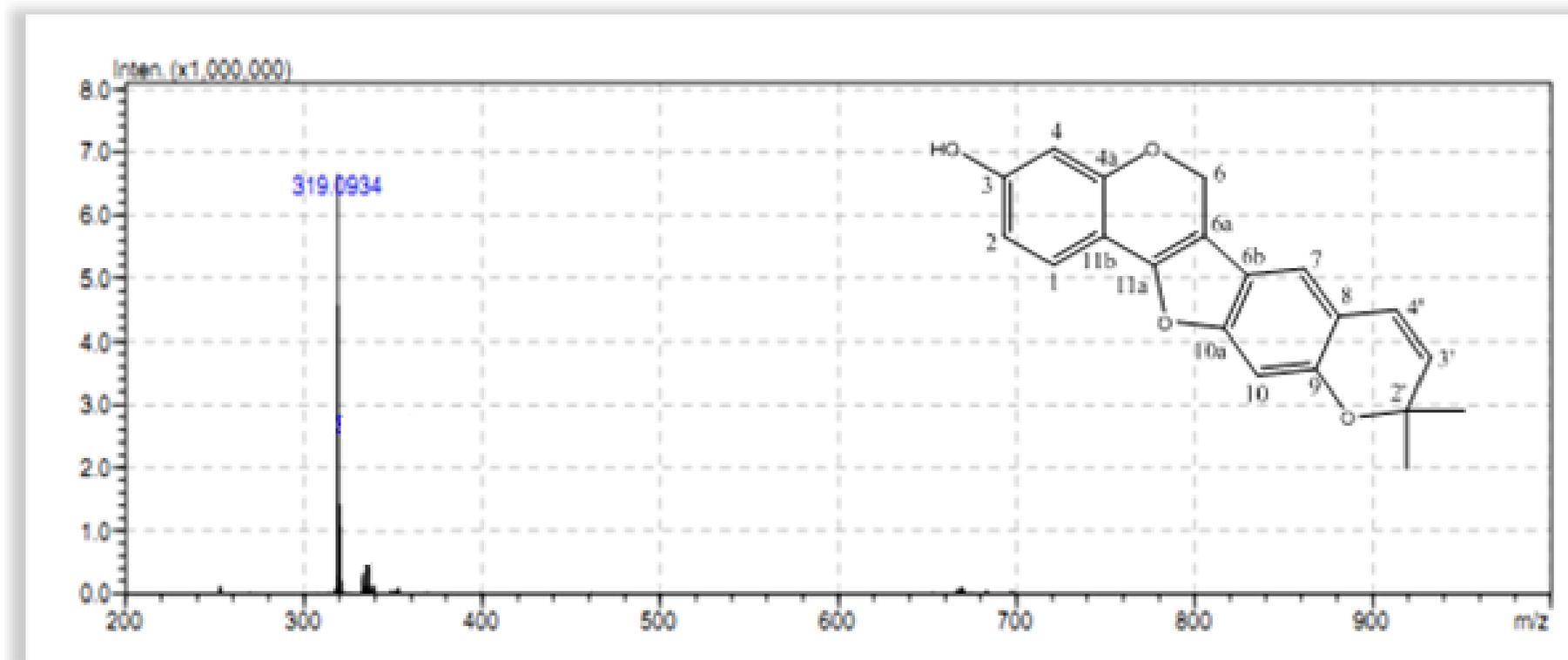


Espectro 09: Espectro HSQC (A) e ampliação do espectro HSQC (B) da amostra HP-1 (acetona- d_6)



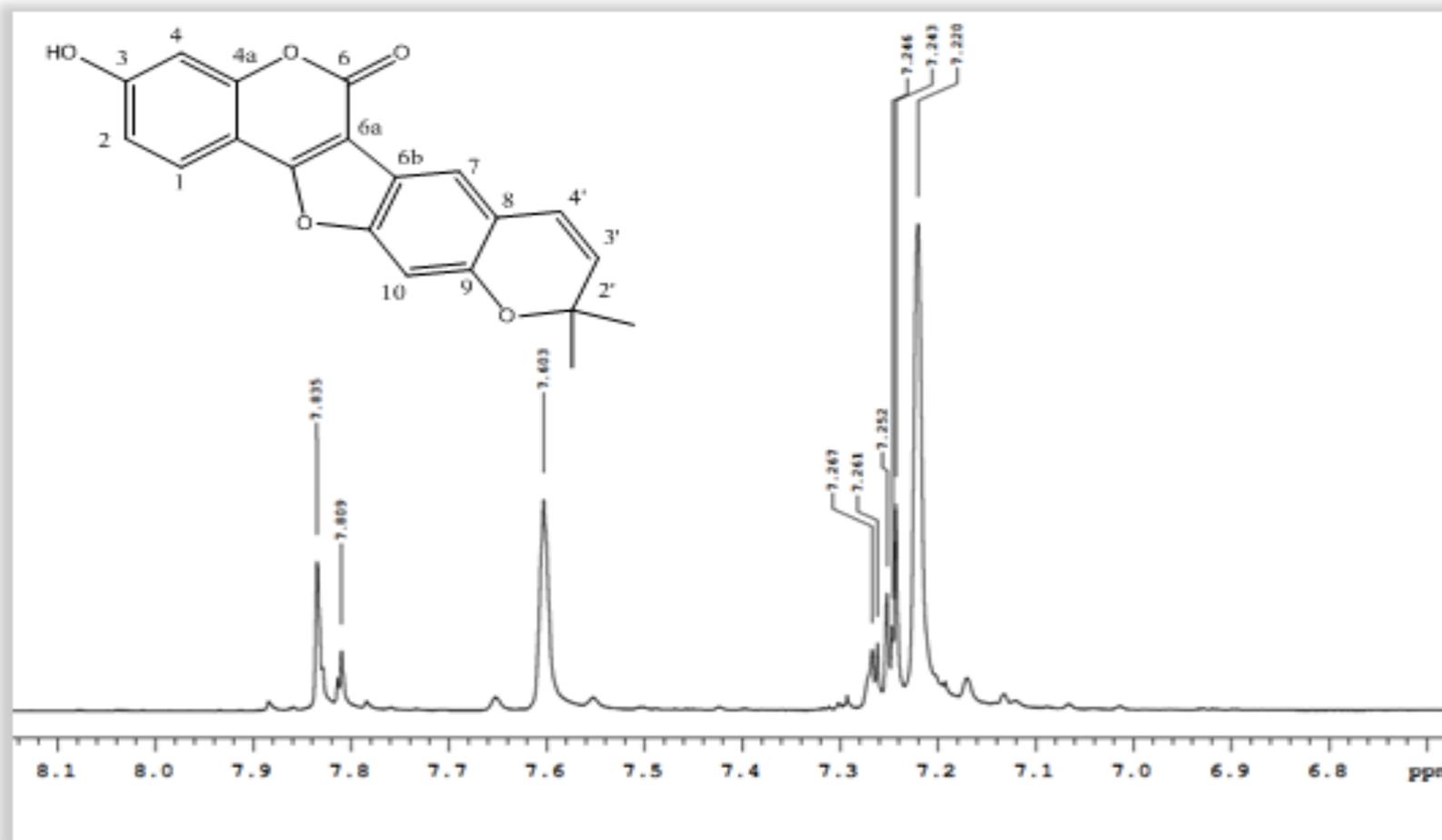


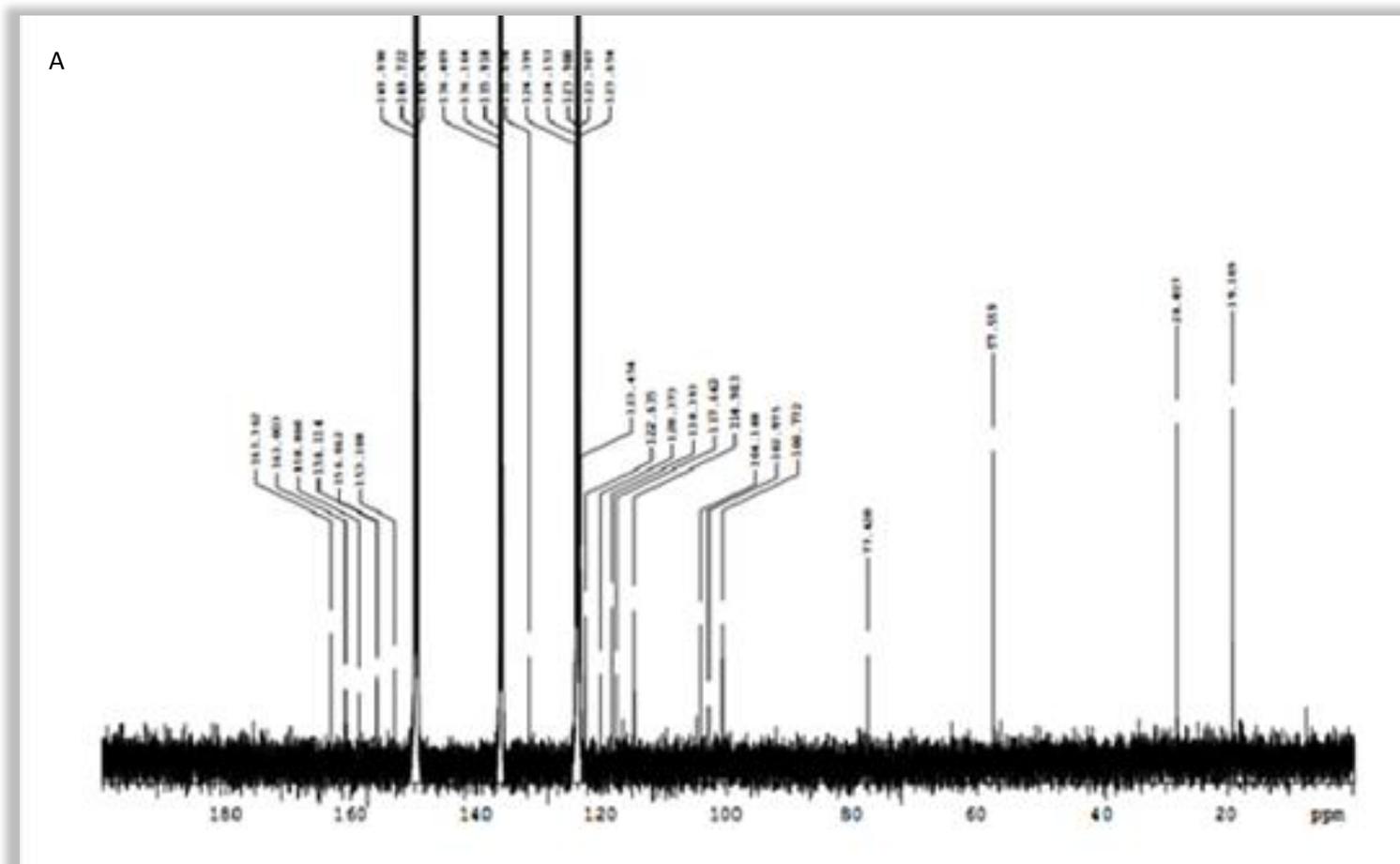
Espectro 10: Espectro HMBC (A) e ampliação do espectro HMBC (B) da substância HP-1 (acetona- d_6)

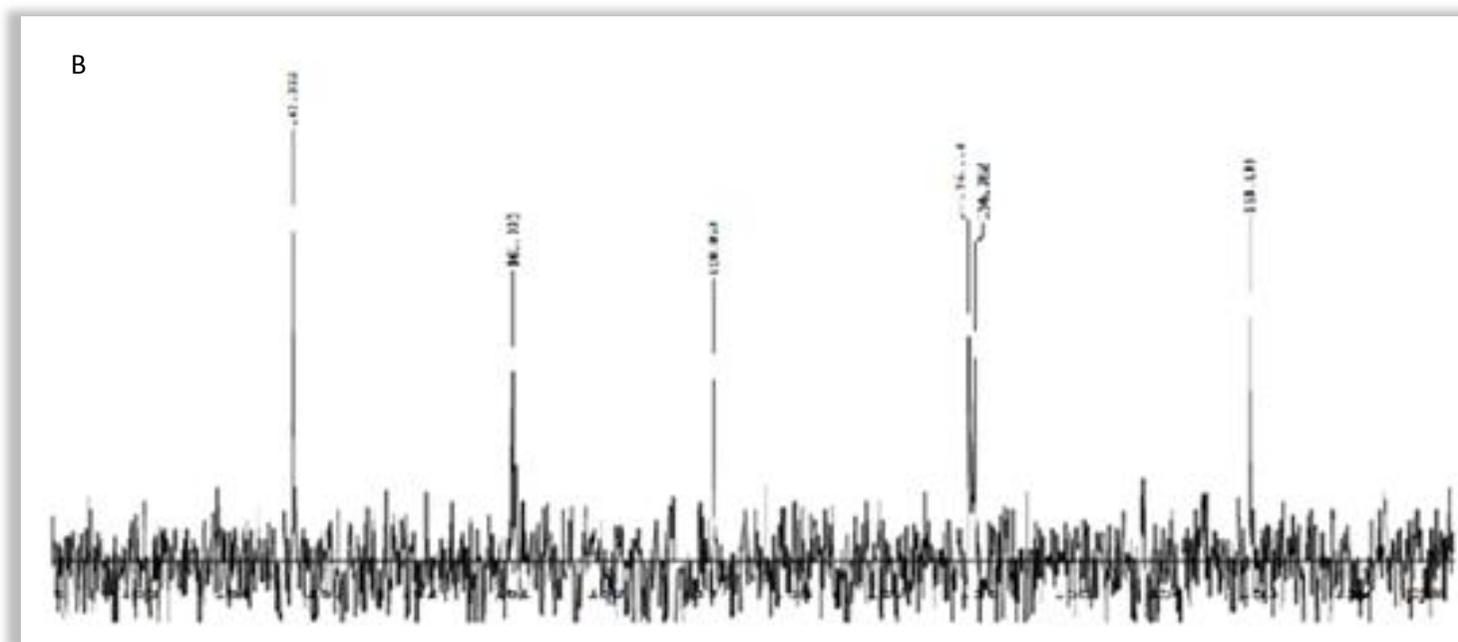
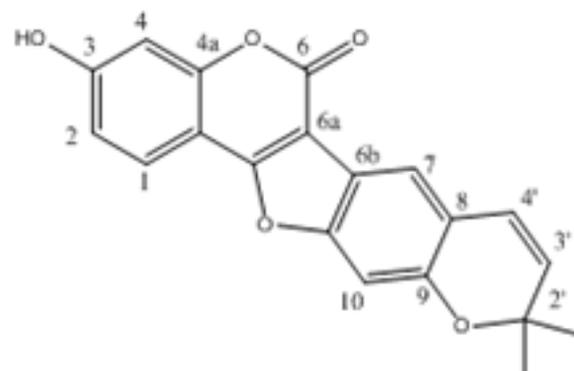


Espectro 11: Espectro de massa (ESI-MS) no modo negativo da substância HP-1.

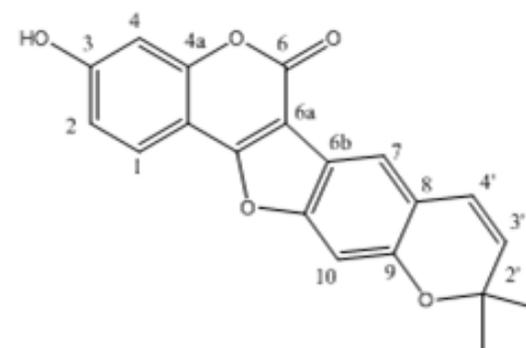
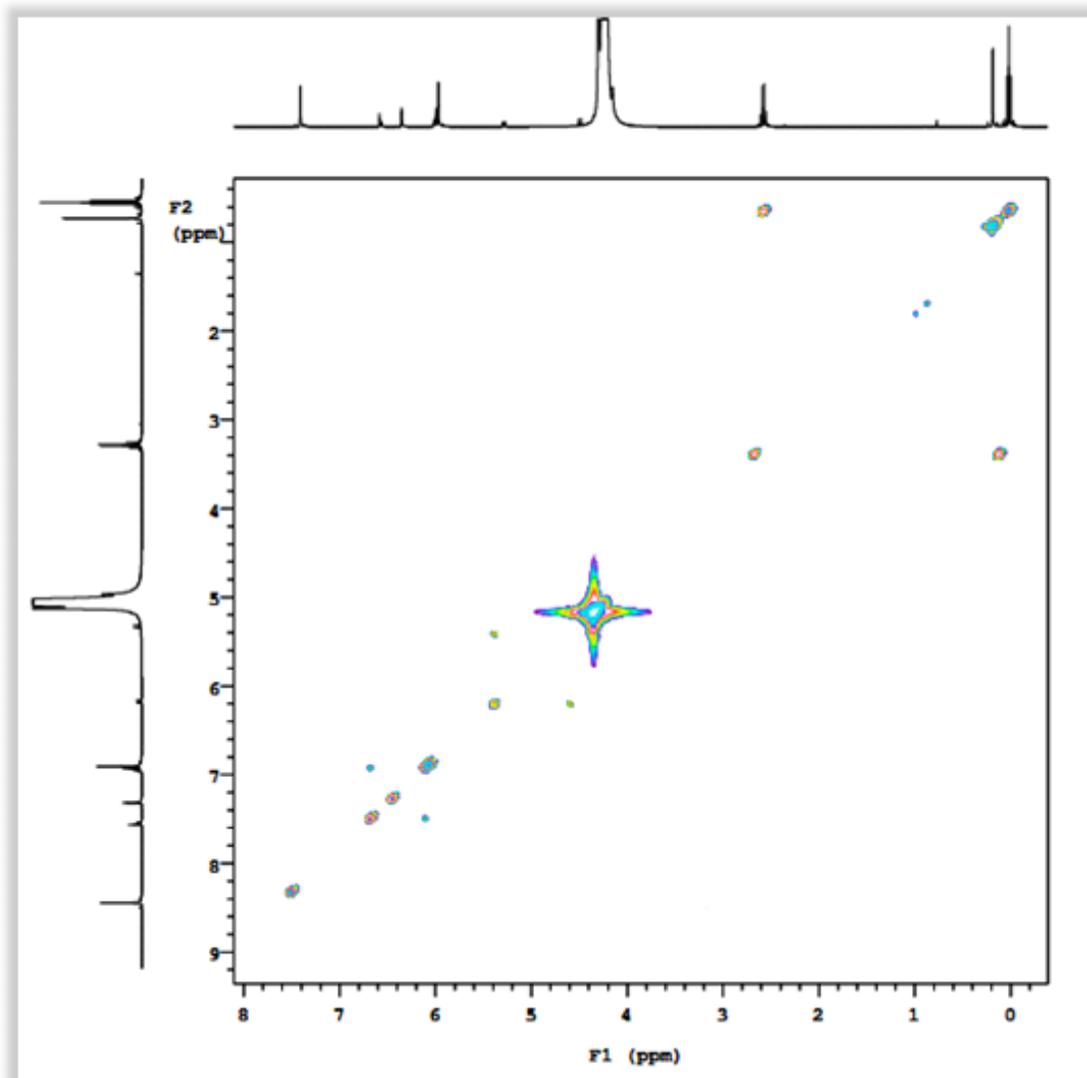
8.3.2 HP-2

Espectro 12: Ampliação do espectro de RMN de ^1H da amostra HP-2(400 MHz, Piridina- d_5).

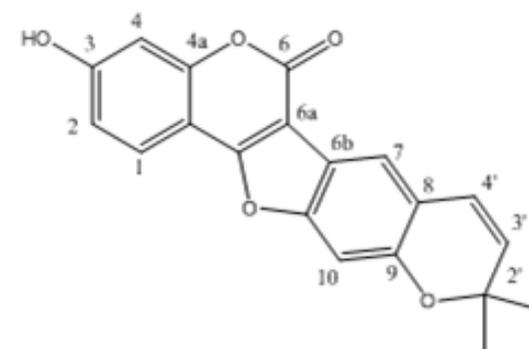
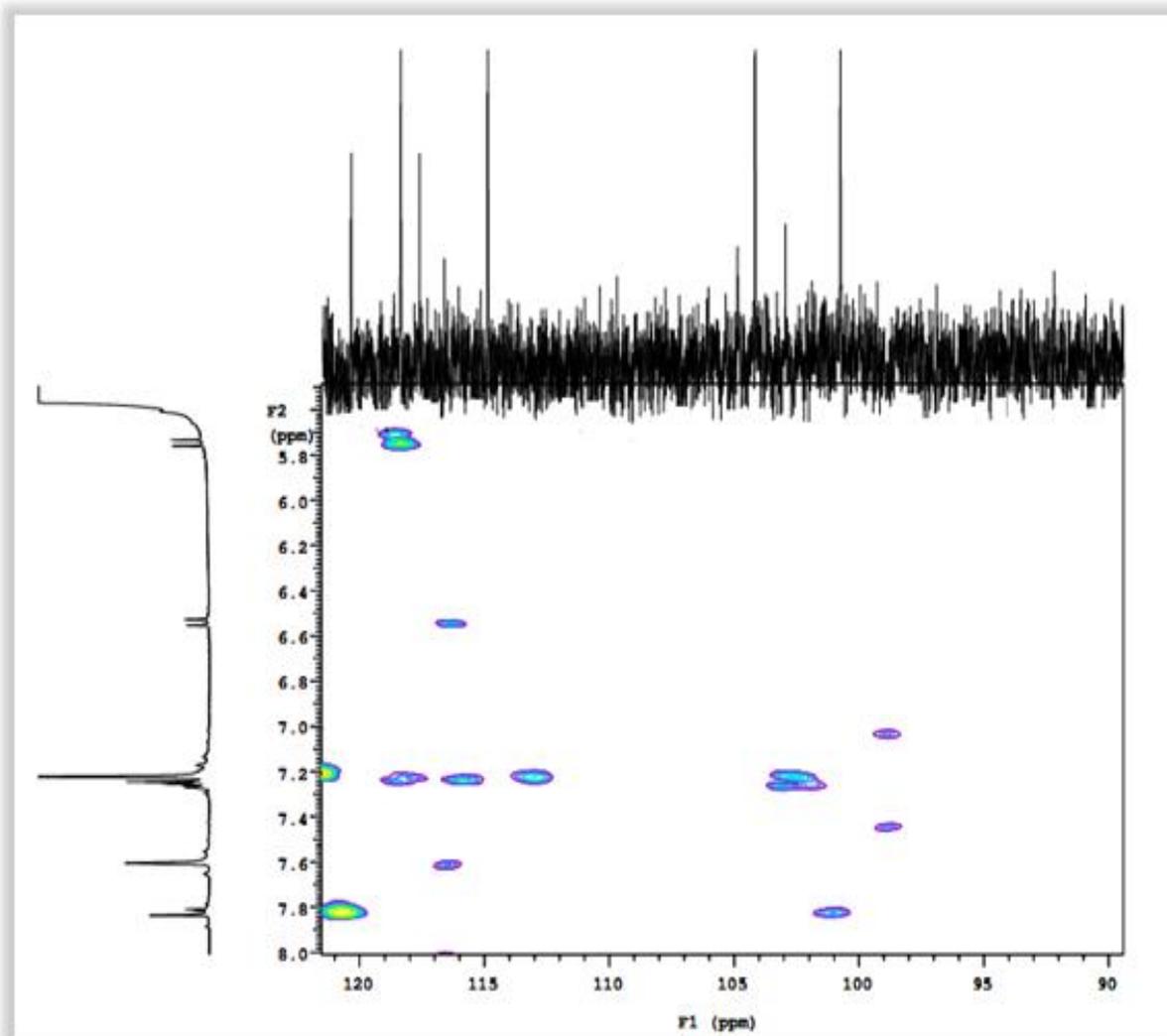




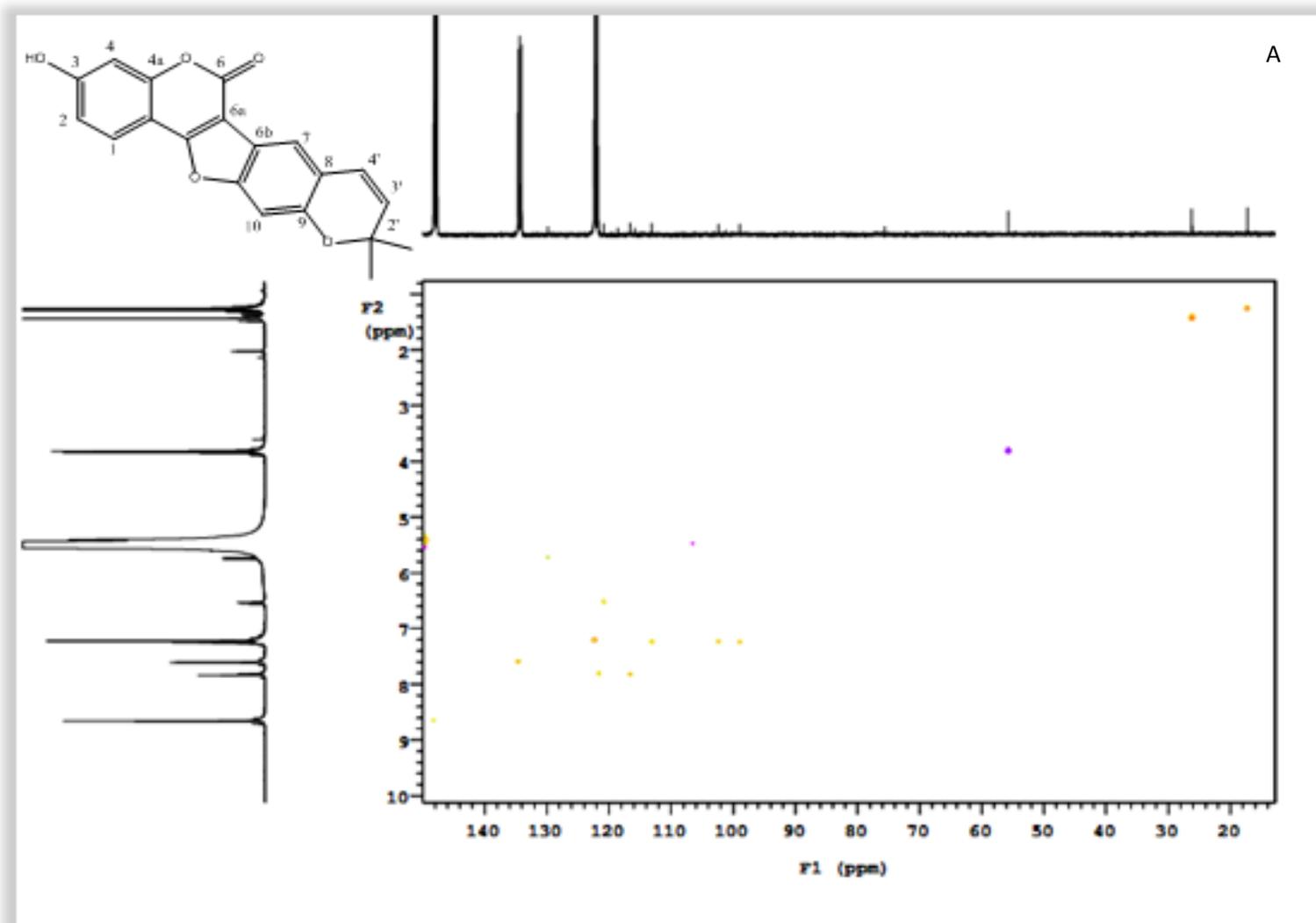
Espectro 13: Espectro de RMN de ^{13}C (A) e ampliação do espectro de ^{13}C (B) da amostra HP-2 (100 MHz, Piridina- d_5).

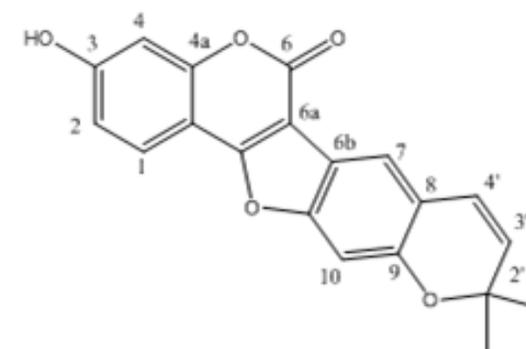
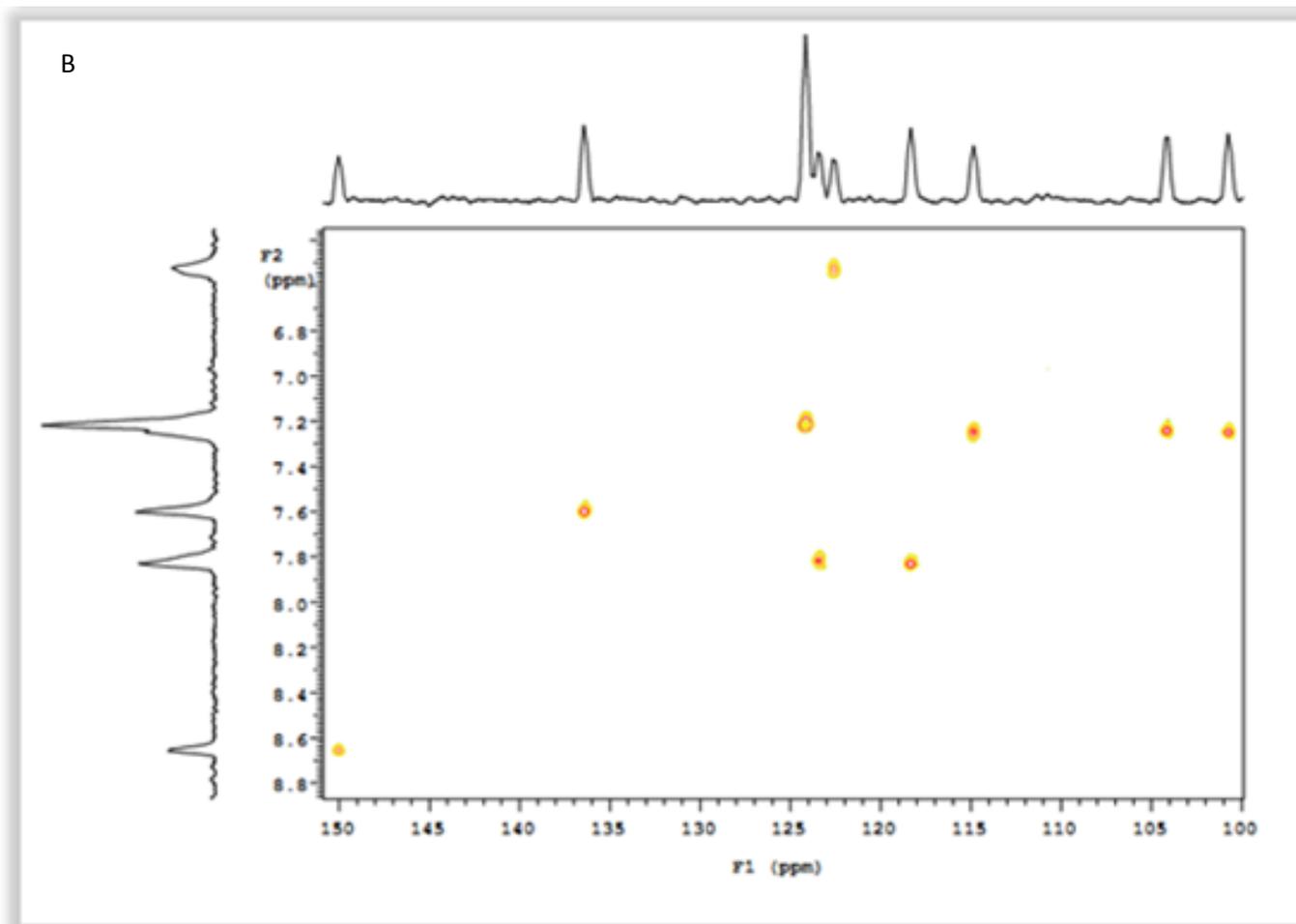


Espectro 14: Espectro ^1H - ^1H COSY da amostra HP-2 (400 MHz, Piridina- d_5).

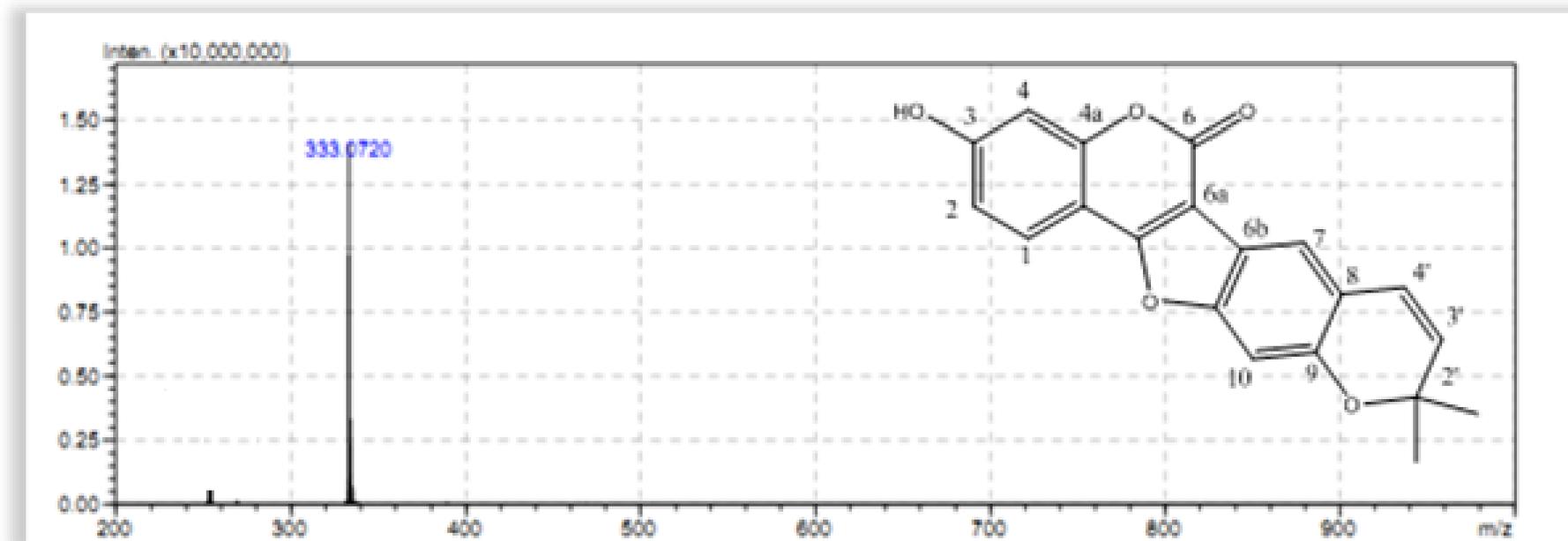


Espectro 15: Espectro de HMBC da substância HP-2 (Piridina-d₅).



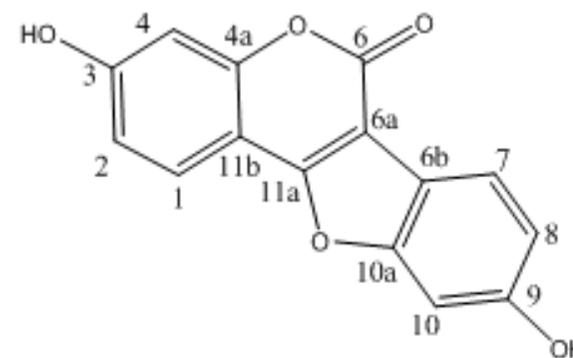
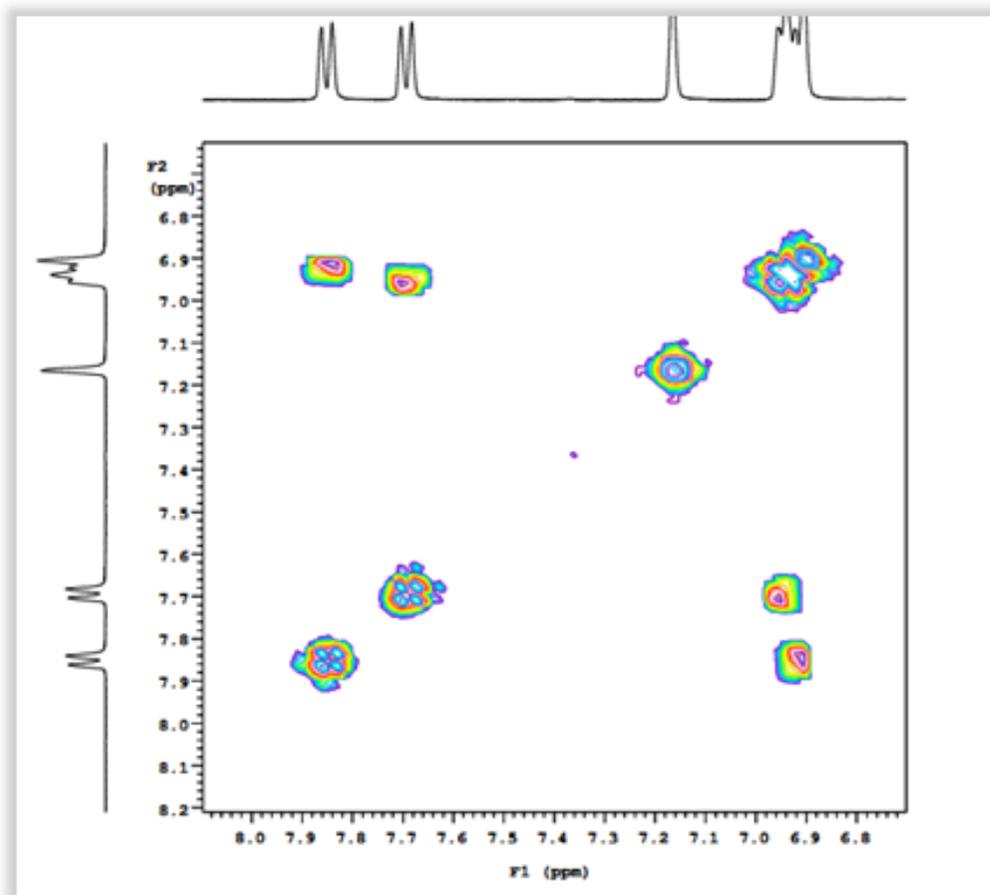


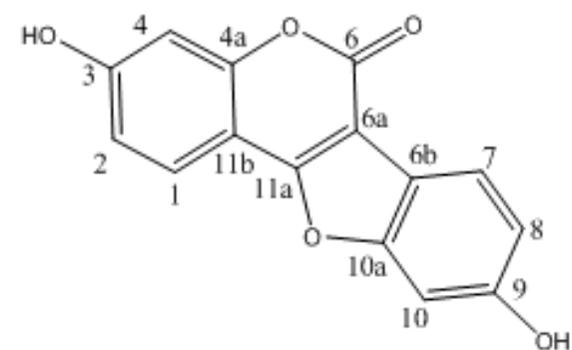
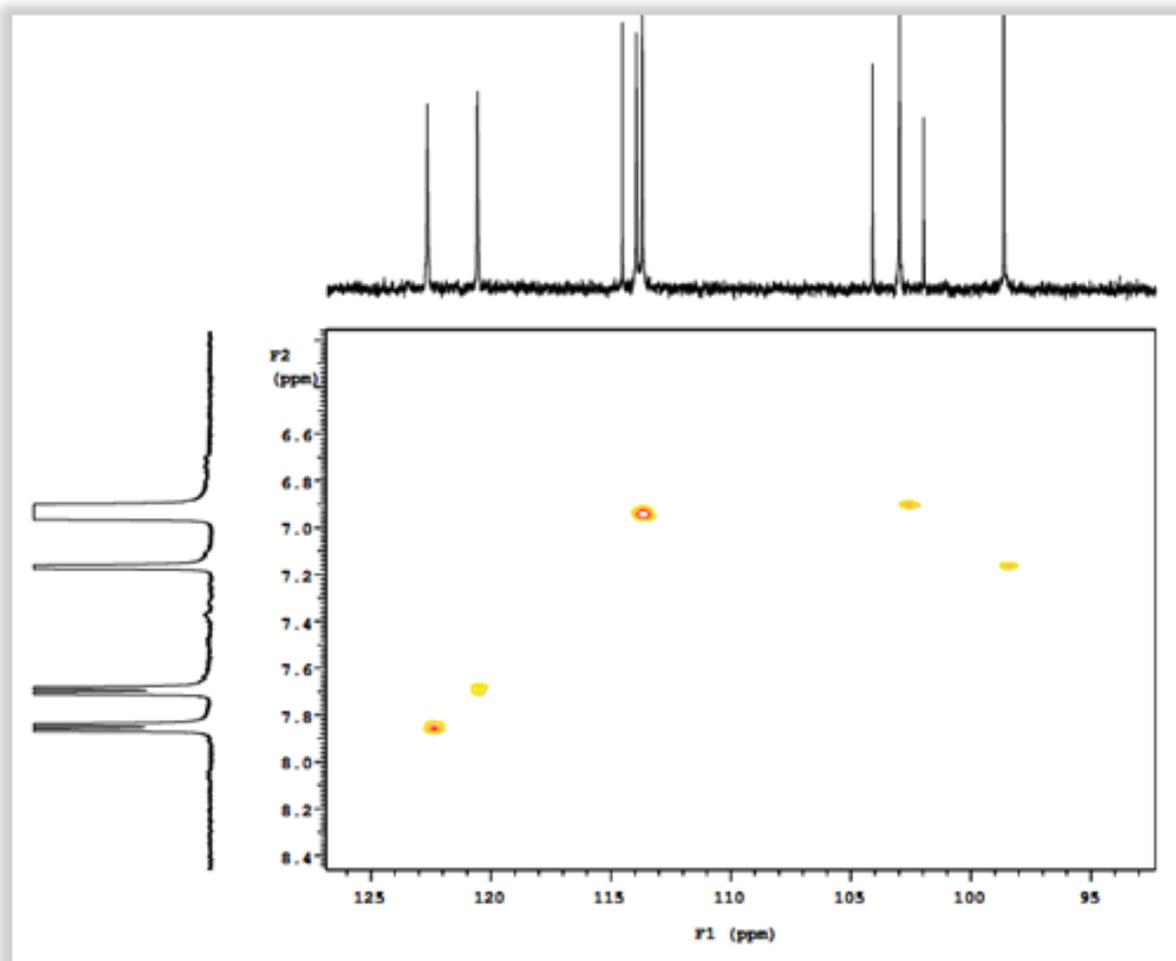
Espectro 16: Espectro de HSQC (A) e ampliação do espectro HSQC (B) da substância HP-2 (Piridina-d₅).

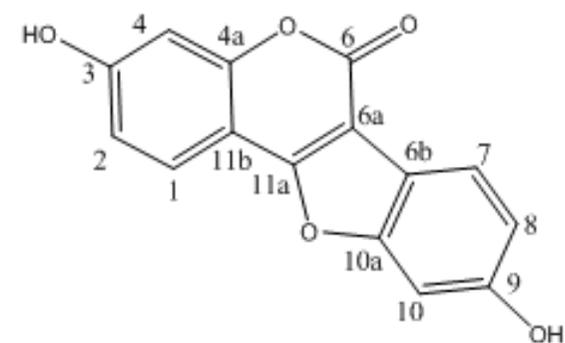
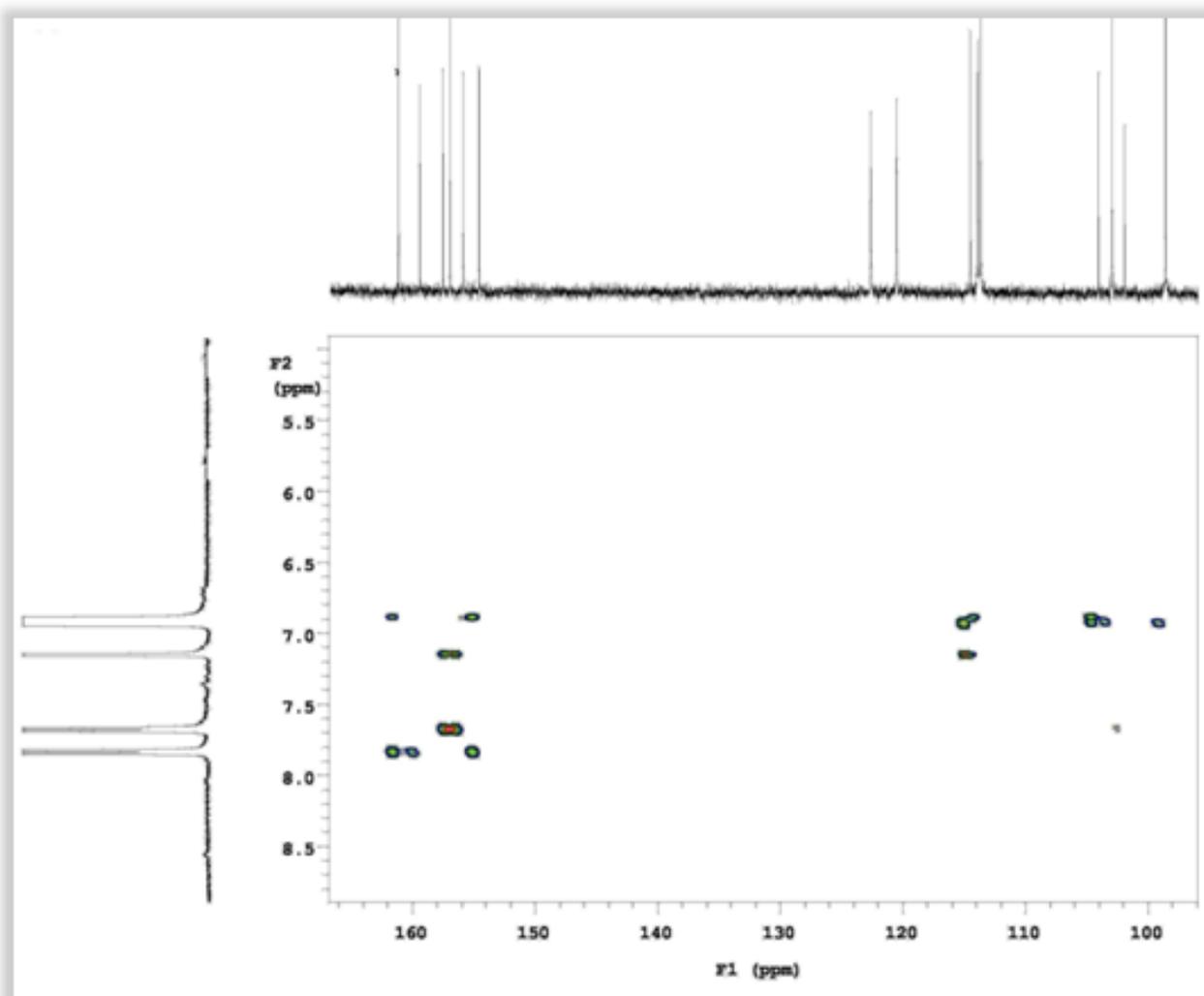


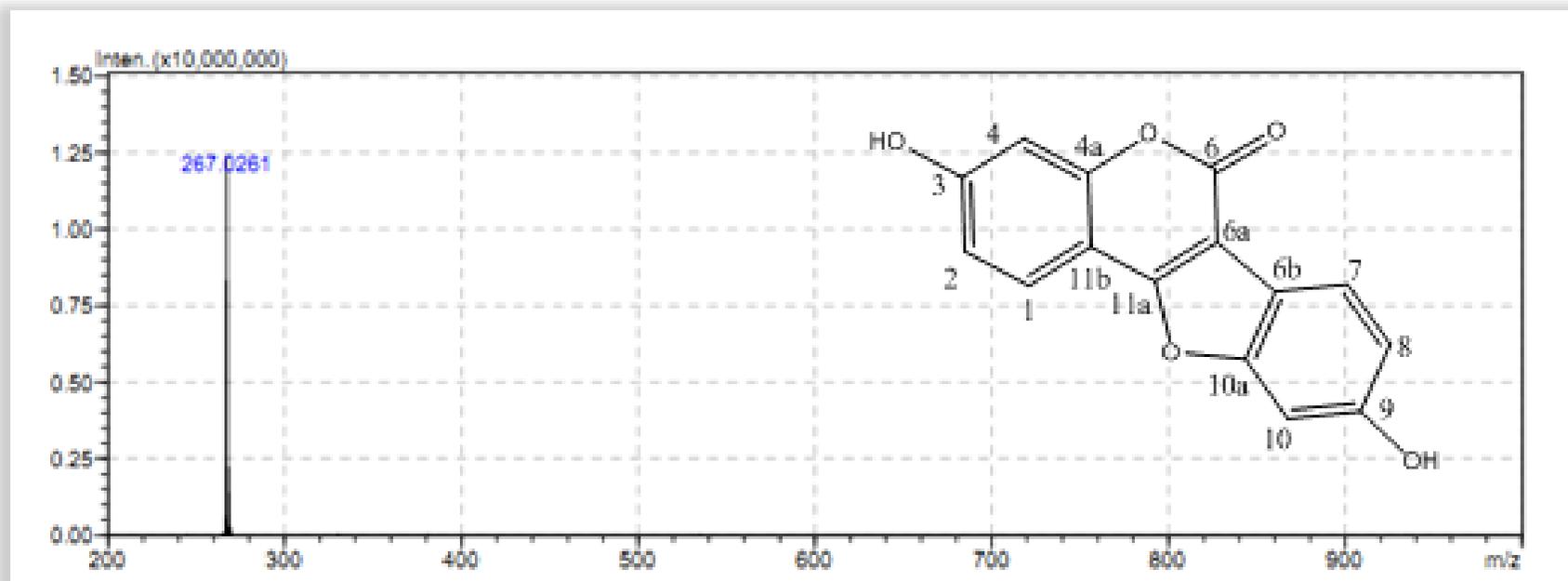
Espectro 17: Espectrometro de massa (ESI-MS) da amostra HP-2 no modo negativo.

8.3.3 HP-3

Espectro 18: Espectro ^1H - ^1H COSY da amostra HP-3 (400 MHz, DMSO- d_6).

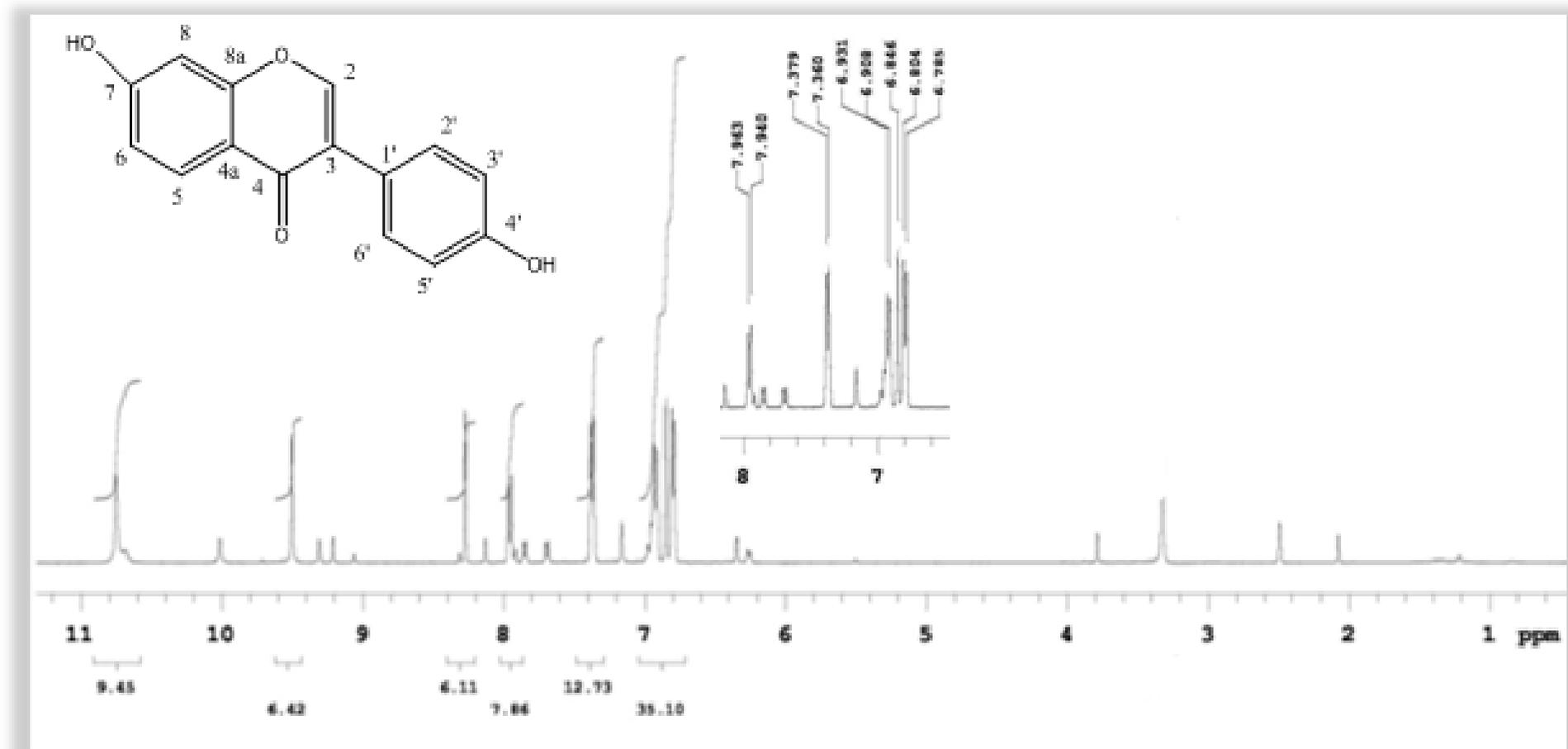
Espectro 19: Espectro HSQC da substância HP-3 (DMSO- d_6)

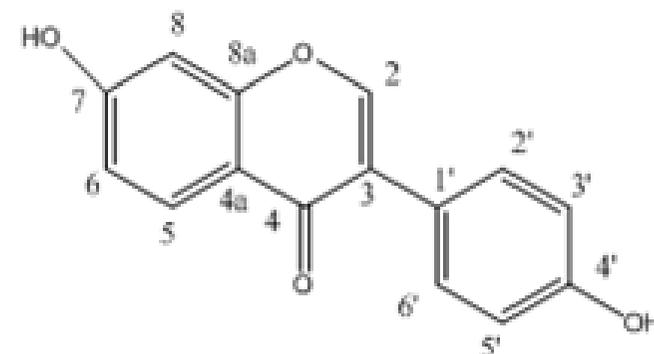
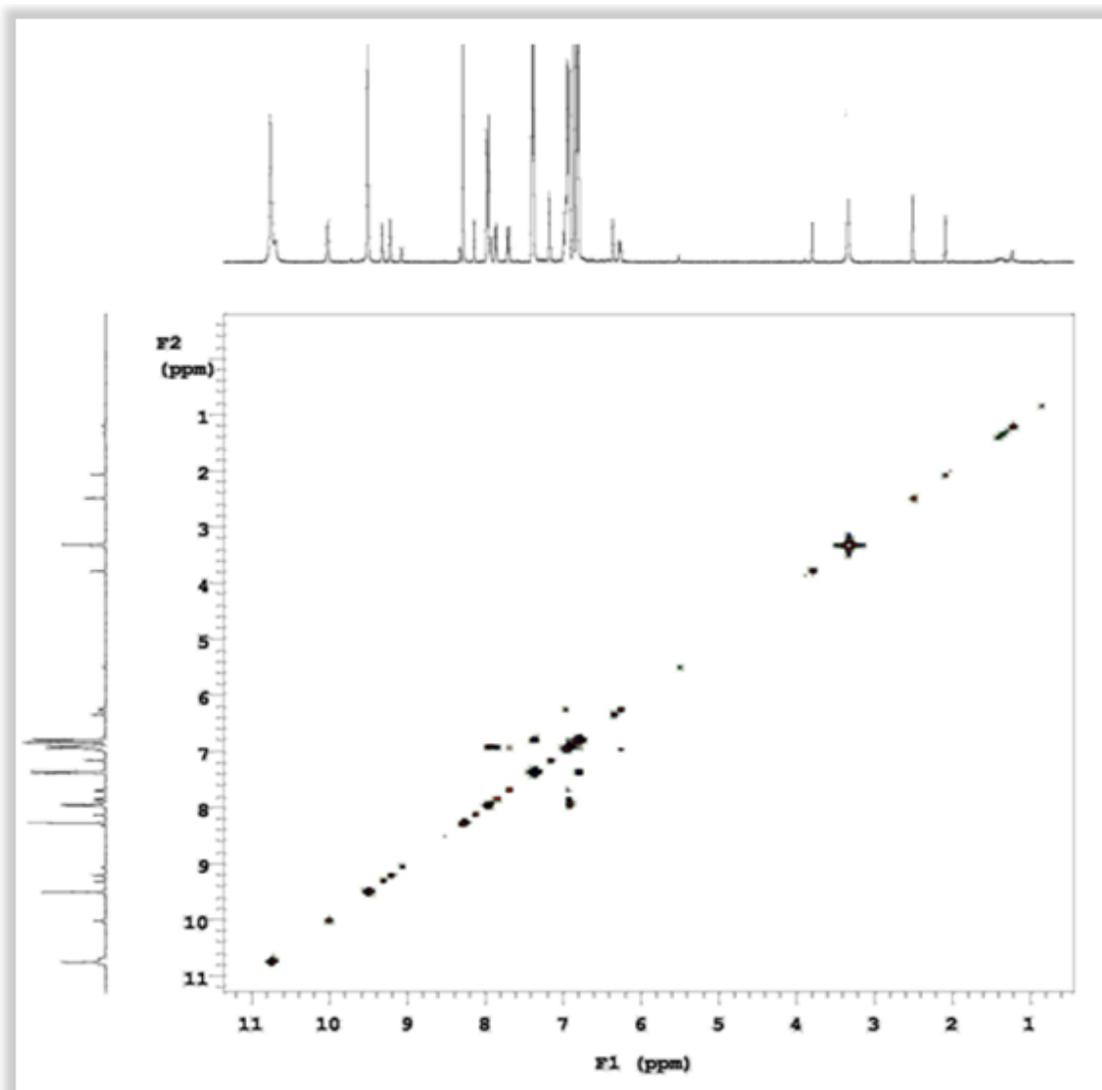
Espectro 20: Espectro HMBC da substância HP-3 (DMSO-d₆).

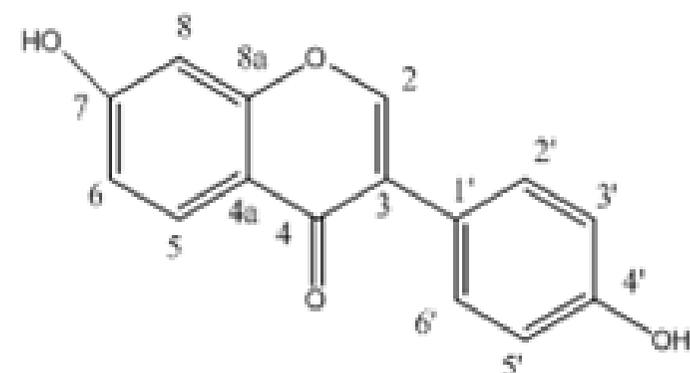
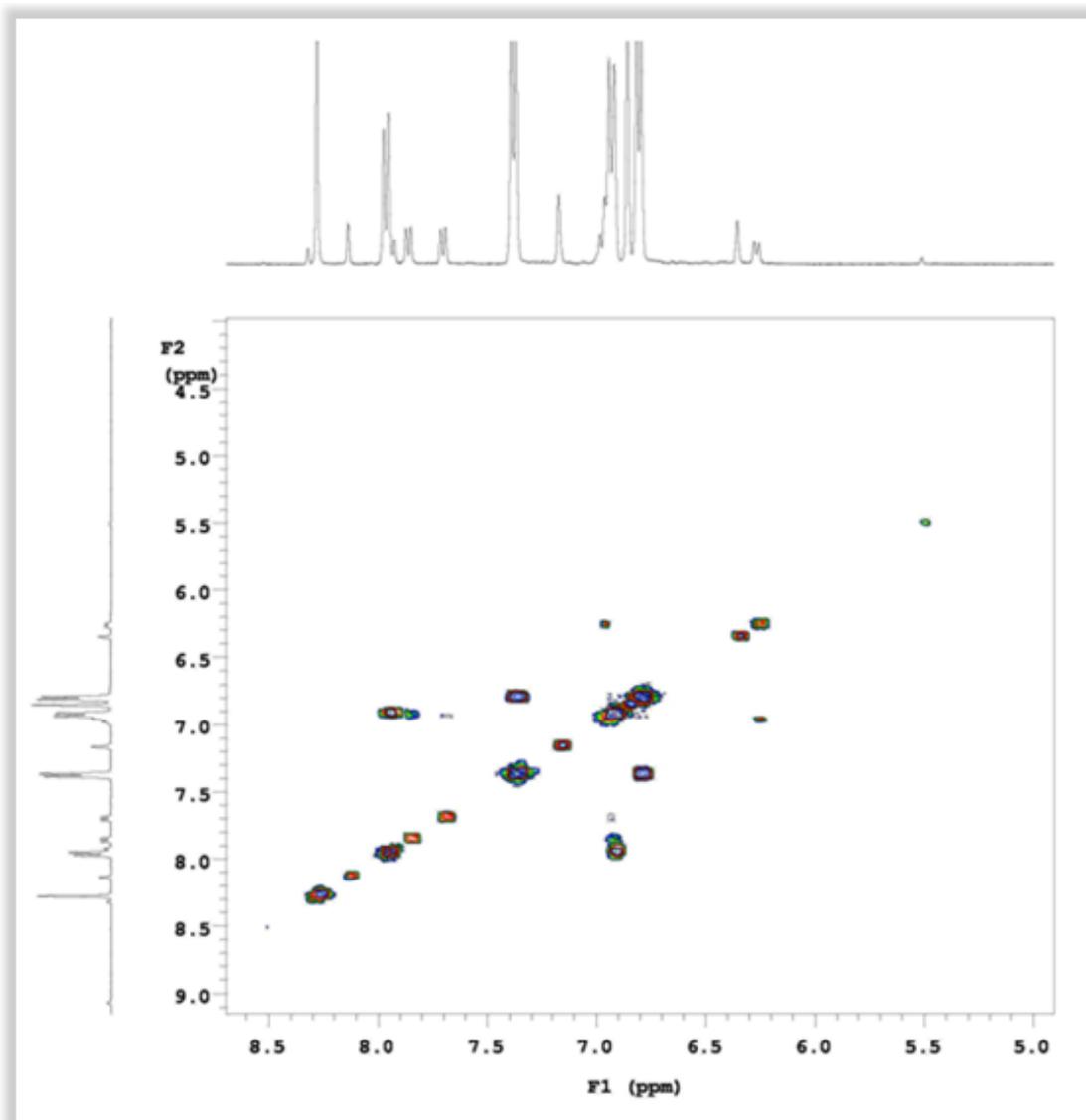


Espectro 21: Espectrometro de massa da amostra HP-3 no modo negativo.

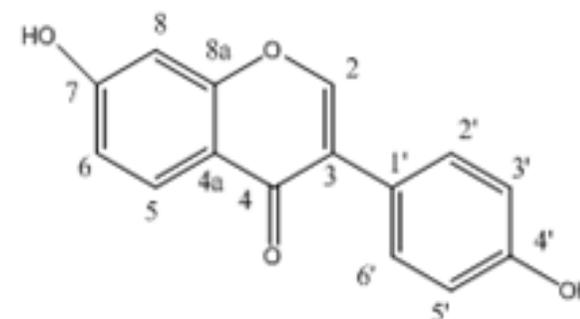
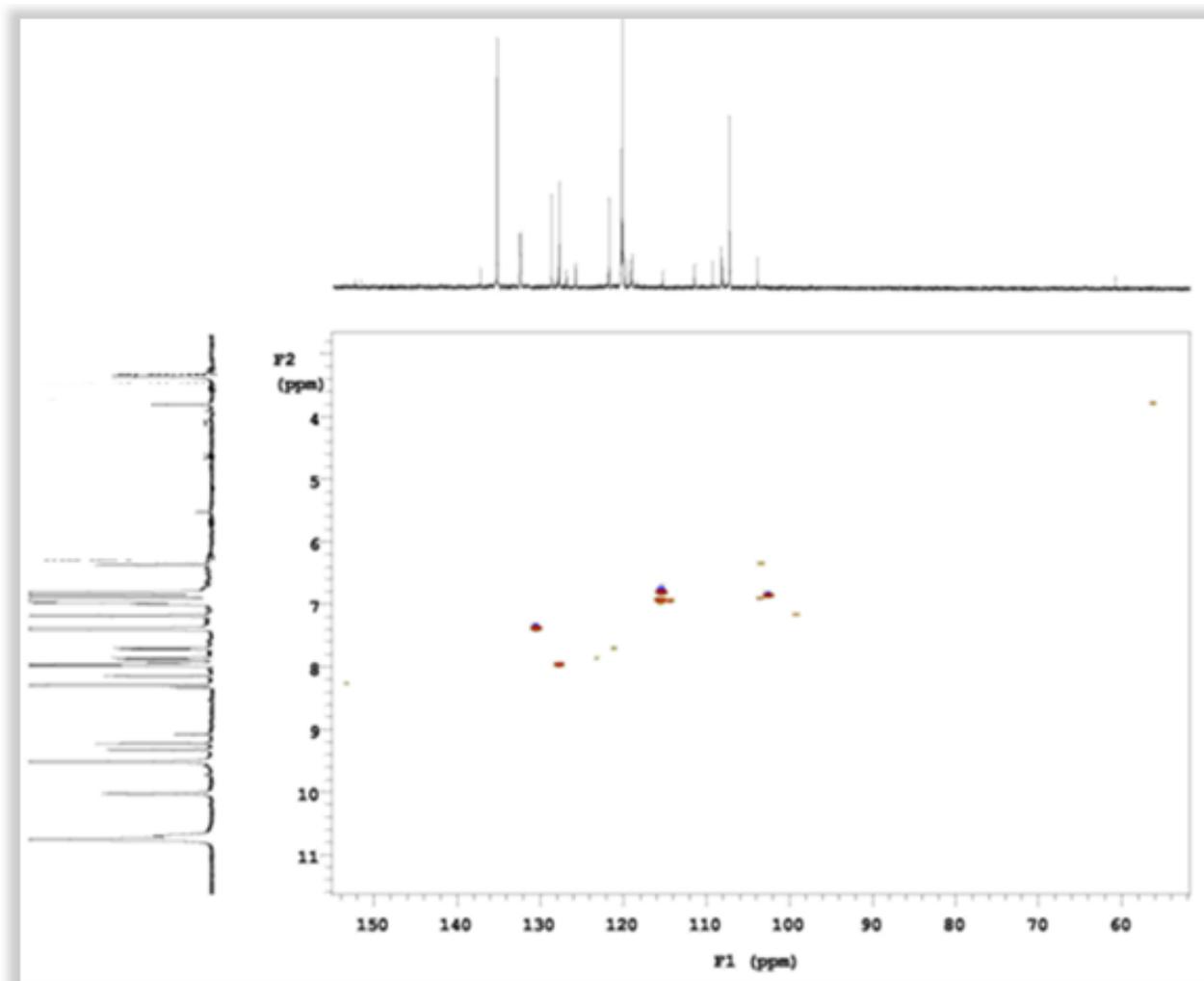
8.3.4 HP-4

Espectro 22: Espectro de RMN de ^1H da substância HP-4 (400 MHz, DMSO-d_6)

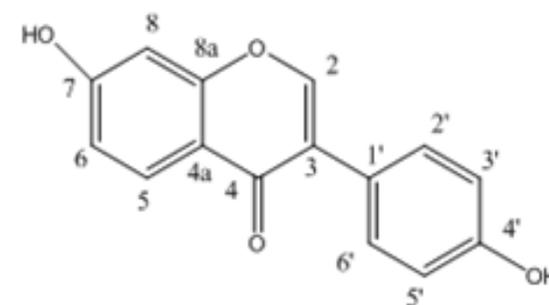
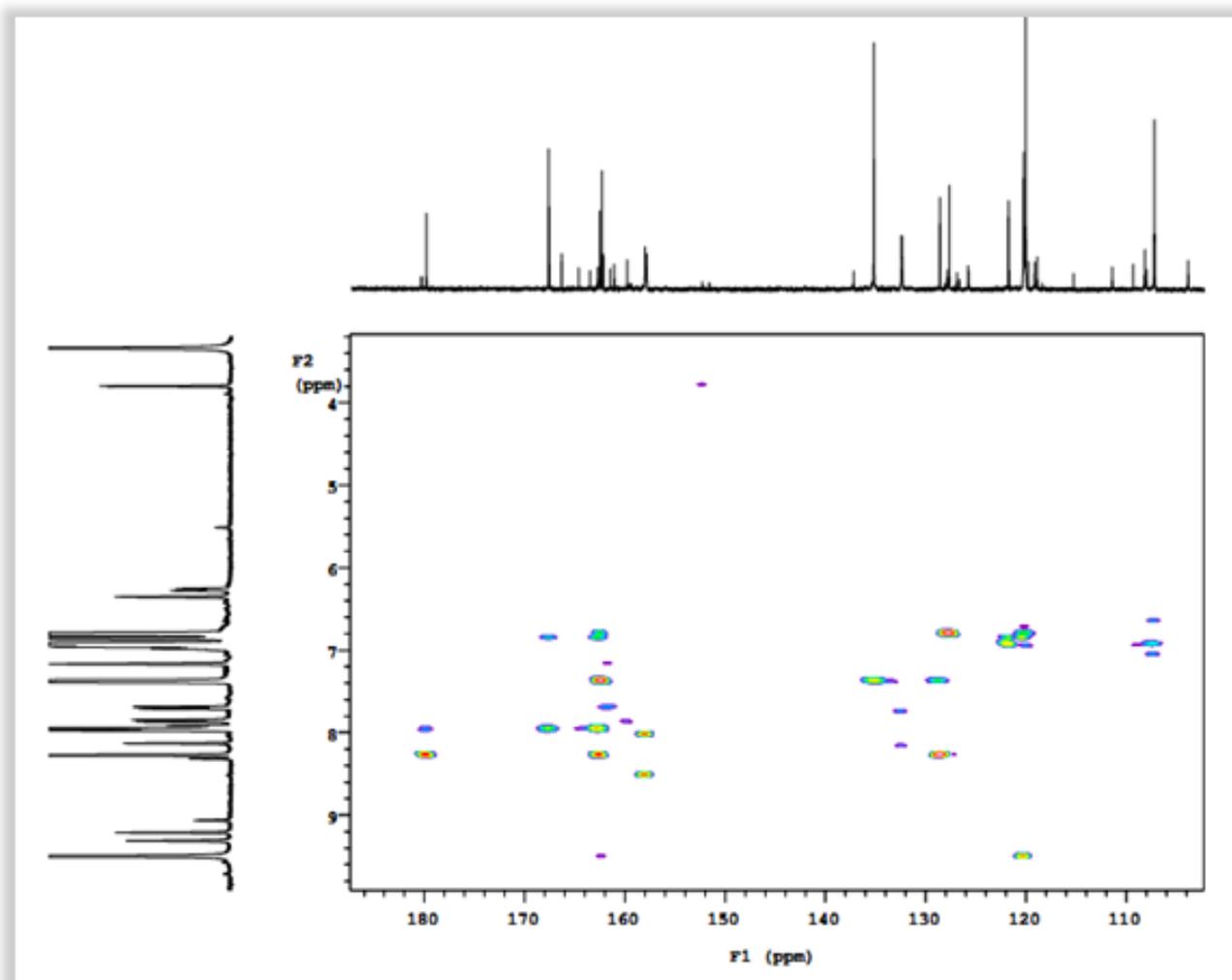
Espectro 23: Espectro ^1H - ^1H COSY da amostra HP-4 (400 MHz, DMSO- d_6).



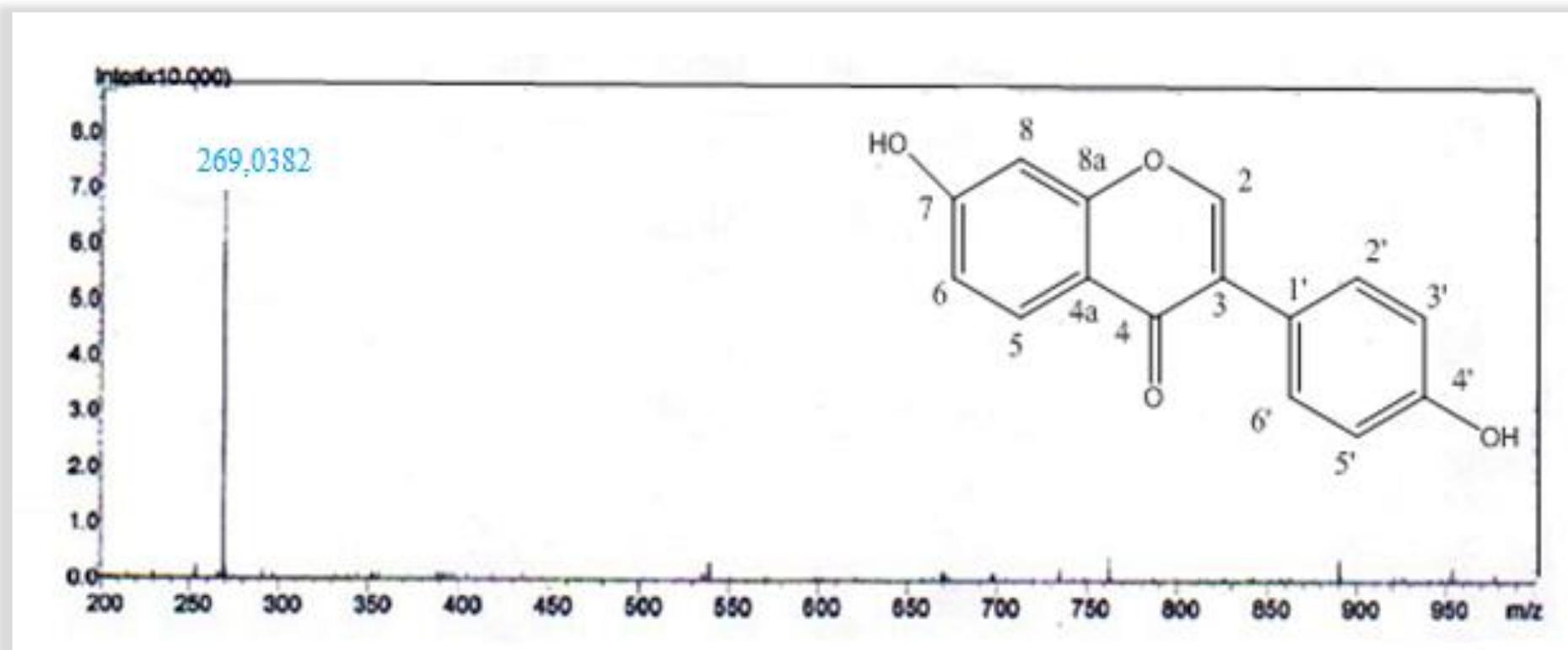
Espectro 24: Ampliação do espectro ^1H - ^1H COSY da amostra HP-4 (400 MHz, DMSO-d_6).



Espectro 25: Espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HSQC da amostra HP-4 (DMSO-d_6).



Espectro 26: Espectro HMBC da amostra HP-4 (DMSO-d₆).



Espectro 27: Espectrometro de massa (ESI/MS) da amostra HP-4 no modo negativo.