

Laura Rocha de Oliveira

Constituintes da casca externa de plantas do cerrado e suas atividades biológicas

São Paulo
2022

Laura Rocha de Oliveira

**Constituintes da casca externa de plantas
do cerrado e suas atividades biológicas**

**Constituents of outer bark of plants from
cerrado and their biological activities**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biotecnologia da Universidade de São
Paulo, para a obtenção de Título de
Mestre em Ciências, na Área de Botânica

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Maria Luiza Faria Salatino

São Paulo

2022

FICHA CATALOGRÁFICA

Rocha de Oliveira, Laura

Constituintes da casca externa de plantas do cerrado e suas atividades biológicas / Laura Rocha de Oliveira; orientadora Maria Luiza Faria Salatino – São Paulo, 2022.
145 p.

Dissertação (Mestrado) -- Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Programa de Pós-Graduação em Botânica.

1. Casca externa. 2. Plantas do cerrado. 3. Atividades biológicas. 4. Fitotquímica. I. Faria Salatino, Maria Luiza, orient.

COMISSÃO JULGADORA:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof^a. Dr^a. Maria Luiza F. Salatino
Orientadora

*Aos meus pais, Patricia e Valmir, pois
sem eles não haveria um trabalho a
ser dedicado.*

“[...] não há fracasso quando você erra. Só há fracasso quando você desiste após ter errado.”

Mario Sergio Cortella

Agradecimentos

Todos sabemos os tempos difíceis em que vivem a educação e a pesquisa. Sabemos as mil barreiras a serem superadas para sermos capazes de criar, aprender e descobrir. Por isso, se há alguém a quem não apenas eu gostaria, mas deveria agradecer são meus pais, Patricia e Valmir. Que sempre valorizaram a educação acima de tudo. Que mesmo após decidir por uma carreira desvalorizada (uma triste realidade), com escassez de emprego e baixa perspectiva de alto ganho monetário, nunca, nem ao menos por um segundo, deixaram de me apoiar. Que me deram todo e qualquer suporte nesses 4 anos de faculdade e mais 3 de mestrado (que infelizmente teve de ser estendido por conta da pandemia), seja monetário, ou aquele “empurrãozinho” quando necessário. Que serviram de exemplo de dedicação e força. Que estiveram presentes em todos os meus momentos importantes. Que me fizeram quem eu sou hoje, sem nunca deixar de acreditar. Por isso e por muito mais que um simples parágrafo e poucas palavras são capazes de descrever, a eles agradeço acima de tudo.

Agradeço também à minha família, avô e avós, tias e tios, primas e primos, que sempre se orgulharam de quem eu sou e de quem me esforço para me tornar, especialmente meus irmãos, Luana, Natan e Davi, meus maiores companheiros do dia em que nasci até o momento.

Gostaria de agradecer também à professora Maria Luiza por se disponibilizar a orientar esse trabalho, possibilitando sua conclusão apesar das enormes dificuldades decorrentes da pandemia. E se entrarmos na questão da pandemia, não posso deixar de citar duas pessoas extremamente importantes, que me ajudaram de extremo bom grado, principalmente no retorno às atividades presenciais: a técnica Mourisa, por toda a dedicação e empenho diário em sempre melhorar o laboratório e ajudar seus usuários; e a colega de laboratório

Dra. Priscila, pela preocupação, companhia e os diversos auxílios que me permitiram superar esse desafio.

Também agradeço à profa. Dra. Renata da Universidade Estadual Paulista e sua equipe, e o prof. Dr. Gregório da Universidade de São Paulo pela coleta e identificação do material vegetal. Ao professor Salatino, um exemplo para qualquer um que teve a honra de conhecê-lo. Aos colegas de laboratório pela companhia e várias ajudas, em especial ao Eli, a quem recorri em vários momentos de desespero e me auxiliou no ensaio anti-AChE; ao Lucas, que me ensinou a paixão pelo CG-EM; ao Wilton pela ajuda com o ORAC e ao Leonardo e Fabiana no ensaio antibacteriano. Agradeço aos professores do laboratório prof. Marcelo, profa. Cláudia e profa. Débora, pelas disciplinas e por dividir seus conhecimentos. E aos funcionários do laboratório, Suzi, Aline e Leandro, pela dedicação e apoio.

Por fim, agradeço ao Instituto de Biociência (IB-USP) por conceder a infraestrutura para a realização do projeto, e à Capes pelo auxílio financeiro.

Sumário

INTRODUÇÃO GERAL	10
1. INTRODUÇÃO	10
1.1. Estrutura e importância biológica da casca.....	11
1.2. Composição química da casca	12
1.3. Atividades biológicas de compostos e extratos de casca.....	14
1.4. Espécies do cerrado e espessamento da casca.....	15
1.4.1. <i>Copaifera langsdorffii</i> Desf.	17
1.4.2. <i>Leptolobium elegans</i> Vogel	18
1.4.3. <i>Salvertia convallariodora</i> A. St.-Hil.....	19
1.4.4. <i>Erythroxylum suberosum</i> A. St.-Hil	20
2. JUSTIFICATIVA	22
3. OBJETIVOS GERAIS	23
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
CAPÍTULO I	24
1. INTRODUÇÃO	24
2. MATERIAIS E MÉTODOS	30
2.1. Coleta	30
2.2. Extração	31
2.3. Ensaio	32
2.3.1. Avaliação da atividade antioxidante – DPPH	32
2.3.2. Avaliação da atividade antioxidante – ORAC.....	33
2.3.3. Avaliação da atividade antiacetilcolinesterásica.....	34
2.3.4. Avaliação da atividade antimicrobiana.....	36
2.3.5. Doseamento de fenóis totais e taninos totais.....	36
2.3.6. Doseamento de taninos condensados – vanilina/HCl	38
2.3.7. Doseamento de taninos totais – BSA	39
2.4. Fracionamento em CCD guiado por DPPH.....	40
3. RESULTADOS	40
3.1. Rendimento	40
3.2. Ensaio	42
3.2.1. Atividade antioxidante – DPPH.....	42
3.2.2. Atividade antioxidante – ORAC	46
3.2.3. Atividade antiacetilcolinesterásica	51
3.2.4. Atividade antimicrobiana.....	52
3.2.5. Doseamento de Fenóis Totais e Taninos.....	54
4. DISCUSSÃO	58
4.1. <i>Copaifera langsdorffii</i>	58
4.2. <i>Leptolobium elegans</i>	60
4.3. <i>Erythroxylum suberosum</i>	61
4.4. <i>Salvertia convallariodora</i>	62
4.5. Ensaio	63
CAPÍTULO II	67
1. INTRODUÇÃO	67
2. MATERIAIS E MÉTODOS	69
2.1. Extração	69

2.2.	<i>Cromatografia a Gás acoplada a espectrometria de massas (CG-EM)</i>	69
2.3.	<i>Análise de dados</i>	70
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	70
3.1.	<i>Ácidos graxos típicos</i>	76
3.2.	<i>Ácidos graxos α,ω-bifuncionais e monoacilglicerídeos</i>	77
3.3.	<i>Álcoois graxos</i>	79
3.4.	<i>Terpenoides</i>	80
3.5.	<i>Outras classes</i>	84
3.6.	<i>Copaifera langsdorfii Desf.</i>	86
3.7.	<i>Leptolobium elegans Vogel</i>	92
3.8.	<i>Erythroxylum suberosum A. St.-Hil</i>	98
3.9.	<i>Salvertia convallariodora A. St.-Hil</i>	102
3.10.	<i>Análise de agrupamento</i>	106
4.	CONCLUSÃO	108
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	109
	RESUMO	110
	ABSTRACT	112
	REFERÊNCIAS	114
	APÊNDICE	135

Introdução Geral

1. INTRODUÇÃO

A região mais externa do tronco de lignófitas, ou seja, a casca, compreende cerca de 10 a 20% do caule, ocorrendo variações nessa proporção entre espécies ou entre indivíduos de uma mesma espécie dependendo das condições do crescimento (Fengel & Wegener 1989). A casca é composta por diferentes tecidos e é dividida em duas regiões, uma interna que compreende essencialmente o floema secundário, enquanto a camada externa é formada pelos tecidos mortos. Por muito tempo toda essa porção do caule foi tratada simplesmente como 'rejeito' no processo de extração da madeira e celulose, tornando limitados os possíveis destinos que poderiam ser dados às milhões de toneladas de casca removidas anualmente (Gupta 2009). Alguns dos destinos mais comuns são a queima para a produção de energia, utilização como adubo em horticulturas ou mesmo o descarte (Feng *et al.* 2013). A necessidade de melhores alternativas no uso dessas 'sobras' foi reconhecida desde os anos 1960 e alguns dos desafios identificados foram a alta variedade na composição química e sua estrutura heterogênea (Gupta 2009; Feng *et al.* 2013). Em contrapartida, a grande concentração de composto fenólicos, além da presença de outras classes de substâncias raras ou ausentes na madeira, como taninos condensados, torna a casca uma potencial fonte de substâncias úteis (Gupta 2009; Jové *et al.* 2011; Krogell *et al.* 2012; Santos *et al.* 2012; Feng *et al.* 2013).

A casca externa é extremamente heterogênea em sua morfologia e composição química. Porém, a maioria dos estudos voltados para sua caracterização química trata a casca como um todo (incluindo as regiões interna e externa), talvez por uma questão de praticidade. Na indústria, principalmente, a separação das diferentes regiões da casca é um processo que além de caro possui pouco significado do ponto de vista prático. A complexidade da casca em sua composição química e a grande disparidade entre as espécies é refletida em sua enorme variedade de aplicações. Dentre os usos da casca de árvores pelo

setor industrial está a cortiça com suas várias aplicabilidades, a confecção de painéis, extração de taninos para a curtição do couro e produção de adesivos, obtenção de fibra, corantes, resinas, alimentos, flavorizantes e medicamentos. Ademais, as aplicações da casca de árvores vão além do uso na indústria, sendo diretamente utilizadas para diversas finalidades, como confecção de canoas, fitoterapia e culinária (Harkin & Rowe 1971; Feng *et al.* 2013).

1.1. Estrutura e importância biológica da casca

A camada externa da casca inclui uma ou mais peridermes e corresponde ao tecido de revestimento do corpo secundário da planta; o súber, por sua vez, corresponde à camada mais externa da periderme, formado unicamente por células mortas. No estágio de desenvolvimento secundário da planta, o felogênio, também conhecido como câmbio da casca, dá origem à feloderme, um tecido formado por células vivas e semelhante ao parênquima do córtex, voltada para o interior do caule e o felema, ou súber, voltado para o exterior. As células do súber são poligonais, possuem tamanho semelhante e se encontram em um arranjo compacto, ocorrendo deposição de suberina e cera na superfície da parede interna e, às vezes, podendo também conter lignina, o que torna o tecido extremamente impermeável tanto a água quanto a gases. Muitas plantas formam mais de uma periderme a partir de um novo felogênio, que irá se desenvolver internamente à anterior. Com a maturação do novo súber, as células mais externas a ele perdem o suprimento de água e nutrientes, resultando apenas em células mortas na casca mais externa.

A importância do súber como barreira para a perda de água está principalmente na composição química da parede de suas células. A suberina além de ter um importante papel estrutural, forma uma matriz na qual as ceras ficam imersas, compondo uma barreira que limita a perda de água e outras moléculas pela superfície da planta (Raven *et al.* 2014). O súber e a casca externa como um todo atuam também como barreira contra outros fatores abióticos; a proteção oferecida pela estrutura também age como escudo contra injúria mecânica dos tecidos mais internos, irradiância, temperatura e fogo (Pfan

& Aschan 2001). Além de fatores abióticos, a casca promove proteção contra os fatores bióticos. Por se tratar de um tecido morto com células de parede espessada, esse tecido proporciona uma barreira constitutiva contra herbívoros e a entrada de patógenos, além de apresentar extrativos e outros metabólitos secundários.

Dada a importância da casca em plantas lenhosas para lidar com diferentes estresses ambientais, as condições do ambiente e o histórico de perturbações da planta, além de fatores como ontogenia e a altura de onde é retirada a amostra, influenciam em sua composição química (Romero 2014).

1.2. Composição química da casca

Muitos dos estudos feitos com a anatomia e principalmente a composição química da casca são focados em espécies de interesse comercial, como a cortiça (*Quercus*), espécies utilizadas na indústria de papel – *Betula*, *Eucalyptus* e *Populus* – árvores populares na indústria da madeira – *Swietenia*, *Tectona*, *Picea* e *Pinus* – e plantas invasoras removidas de plantações – *Acacia*. Esses estudos são muito mais escassos quando se restringe apenas à região externa da casca, sendo a maioria deles com *Quercus* e *Betula*.

Em geral, a casca é composta por polissacarídeos (celulose, hemicelulose e substâncias pécticas), polímeros fenólicos (incluindo a lignina e taninos de alto peso molecular) e poliésteres de ligação cruzada (como a cutina e suberina). Outros componentes que podem estar presentes são moléculas de baixo peso molecular, como certas substâncias fenólicas, ácidos graxos e resinas (Sakai 2001). A diferença básica entre a composição química das duas camadas é o maior conteúdo de substâncias polifenólicas na casca externa, acompanhado de um menor conteúdo de polissacarídeos, quando comparado com a região interna da casca. A composição de extrativos também difere de uma camada para a outra, sendo que a primeira apresenta um conteúdo muito maior de substâncias lipofílicas do que a segunda (Fengel & Wegener 1989; Tegelaar *et al.* 1995; Hafizoğlu *et al.* 1997; Freire *et al.* 2002; Krogell *et al.* 2012). Um ponto interessante a respeito da composição química da casca é que em

muitos casos compostos presentes em baixas concentrações no resto da planta possuem alta concentração no súber, podendo em certos casos inclusive possuir substâncias únicas (Romero 2014).

O padrão observado para *Eucalyptus globulus* Labill. em extratos lipofílicos (diclorometano) da periderme foi o baixo conteúdo de esteróis, ácidos graxos e álcoois graxos, com predomínio de ácidos triterpênicos – com esqueleto lupano, ursano e oleanano –, além da presença de um monoterpene e diversos sesquiterpenos. Os autores desse estudo não encontraram esses compostos na porção interna da casca, correspondente ao floema secundário (Freire *et al.* 2002). Extratos de súber de *Quercus suber* L. em diclorometano e metanol apresentaram majoritariamente triterpenoides (cerina e friedelina como principais), enquanto que extratos etanólicos de *Betula pendula* Roth., possuem 80% de betulinol em sua composição (Pinto *et al.* 2009). No caso de *Picea abies* [L.] Karst., os extrativos obtidos com hexano e acetona foram majoritariamente triglicerídeos e mono- e dissacarídeos, respectivamente (Krogell *et al.* 2012). Além dos estudos químicos com casca externa de espécies de interesse econômico, um exemplo de caracterização química da casca externa foi realizado com *Kielmeyera coriacea* Mart. And Zucc. (Pau-santo), uma árvore típica do Cerrado brasileiro. O que foi observado nesse estudo, foi o prevailecimento de prováveis resíduos do metabolismo (glicerol, açúcares e derivados) no extrato etanólico e ácidos graxos e álcoois graxos no extrato de diclorometano, sendo eles o extrato com maior e segundo maior rendimento, respectivamente, dentre os três solventes usados – diclorometano, etanol e água – (Rios *et al.* 2014).

O que é possível observar nos inúmeros trabalhos produzidos com casca de árvores é a heterogeneidade, tanto no rendimento dos diferentes solventes e seus extrativos quanto em sua composição química, tornando a estrutura um promissor objeto de estudo de atividades biológicas e como fonte de substâncias de interesse farmacológico e cosmético ou outros fins industriais.

1.3. Atividades biológicas de compostos e extratos de casca

Como a maioria dos estudos químicos são feitos com toda a casca, são numerosos os trabalhos evidenciando atividade biológica de componentes presentes nela. Dentre as classes de compostos extraídos da casca externa com ampla atividade biológica conhecida, e. g. antiviral e antibacteriana, estão os triterpenos. Alguns exemplos de triterpenos já extraídos do súber com potencial farmacológico são o ácido betulínico, eritrodiol, lupeol e ácido oleanólico; todos apresentam ação anti-inflamatória, além de, no caso do ácido betulínico, possuir atividade antimalárica e anticancerígena (Laszczyk *et al.* 2006; Sousa *et al.* 2006). Outra classe de substâncias com interesse farmacológico presentes na casca de árvores são os compostos fenólicos. O conteúdo de substâncias fenólicas presente na casca, bem como os demais extrativos, varia muito de acordo com a espécie. Há também variações nas quantidades desses compostos, quando são comparadas a casca externa e interna, podendo apresentar-se mais abundantes no primeiro ou no segundo (Wargo 1988; Fengel & Wegener 1989; Stafford *et al.* 1989). Alguns exemplos de compostos fenólicos com atividade biológica testada, extraídos da casca externa, são ácido gálico, catequina e epicatequina (Conde *et al.* 1995; Sakai 2001).

Dentre as atividades biológicas, já confirmadas, de extratos brutos da casca e de uma série de seus constituintes, estão a antimicrobiana, a antioxidante e a antiacetilcolinesterásica. Diversas substâncias da casca, isoladas de extratos de diferentes polaridades, comprovadamente agem contra diferentes espécies de fungos e bactérias. Esses compostos pertencem a uma gama de classes de substâncias como taninos (Djipa *et al.* 2000), terpenoides, isoflavonoides (Kuate *et al.* 2009), xantonas, antraquinonas (Tamokou *et al.* 2009), ácidos fenólicos e seus derivados (Kuate *et al.* 2007). Dada a enorme diversidade de organismos patogênicos e sua capacidade de aquisição de resistência aos fármacos, a investigação de novas fontes de substância antimicrobianas abre novas possibilidades para o desenvolvimento de medicamentos.

A presença de atividade antioxidante e inibição da enzima acetilcolinesterase são importantes parâmetros para a seleção de medicamentos contra doenças neurodegenerativas. Uma vez que o principal papel da enzima acetilcolinesterase (AChE) é interromper a transmissão do impulso nervoso pela rápida hidrólise da acetilcolina, a inibição de sua atividade é uma estratégia promissora no tratamento de doenças neurodegenerativas como Parkinson e Alzheimer (Mukherjee *et al.* 2007). O estresse oxidativo, por sua vez, causa danos às biomoléculas, podendo promover o envelhecimento e estimular o desenvolvimento de uma série de patologias (Gao *et al.* 2007). Como resultado, substâncias com potencial antioxidante podem se mostrar úteis na redução dos danos neuronais (Lee *et al.* 2011). Grande parte dos estudos em busca de plantas e substâncias promissoras no tratamento dessas doenças levam em conta a combinação de ambos os fatores. Dentre as pesquisas realizadas, determinando atividade antiacetilcolinesterase, são numerosos os ensaios com extratos provindos da casca que mostram resultados positivos (Trevisan & Macedo 2003; Mukherjee *et al.* 2007; Lee *et al.* 2011; Cho *et al.* 2014; Queiroz *et al.* 2014; Penido *et al.* 2017).

1.4. Espécies do cerrado e espessamento da casca

Um bioma com espécies de grande potencial para os estudos com a casca é o cerrado. Esse fato se dá pelo grande número de espécies arbóreas que apresentam uma espessa camada de súber, ou de toda a casca, encontradas nesse ecossistema, representando uma potencial fonte de substâncias ativas. A abundância de súber é um dos traços que caracterizam a síndrome do escleromorfismo oligotrófico. A teoria prevê que situações em que algum fator limita o crescimento da planta, p.e. a falta de nutrientes no solo do cerrado, sem alterar a taxa de incorporação de fotossintatos, esses excedentes são alocados para a síntese de lignina, cutina e suberina. O espessamento da casca em árvores e arbustos do Cerrado, consequência da alocação de recursos por conta da baixa quantidade de nutrientes no solo (como N, S, P e Ca^{2+}), também pode ser resultado da evolução de defesas químicas que impeçam a perda de um alto investimento na incorporação dos recursos (Salatino 1993).

Unindo ambas as teorias a respeito da alocação dos recursos e defesa química, o que se espera encontrar no súber espessado de plantas do cerrado é um alto nível de defesas, principalmente defesas quantitativas, inespecíficas e constitutivas, necessitando uma alta produção para que sejam efetivas, porém sem custo adicional para serem sintetizadas novamente. Assim, espera-se encontrar nesse material grande conteúdo de suberina e taninos.

Outro fator associado à importância da casca para as espécies lenhosas do cerrado é a ocorrência de queimadas espontâneas no bioma. O espessamento da casca permite retardar os efeitos da chama, tanto por funcionar como um isolante térmico, quanto pela ocorrência da decomposição térmica de compostos ricos em carbono (p.e. suberina) que libera água e dióxido de carbono, protegendo os tecidos vivos mais internos (Veridiana *et al.* 2020).

Pesquisas anteriores já foram feitas demonstrando em alguns extratos da casca de espécies do Cerrado atividades biológicas, relatando casos de ação antimicrobiana (Marques *et al.* 2013; Júnior 2014), antioxidante (Trevisan & Macedo 2003; Marques *et al.* 2013; Habermann *et al.* 2016) e antiacetilcolinesterase (Trevisan & Macedo 2003; Mukherjee *et al.* 2007).

Algumas das espécies arbustivas e arbóreas do cerrado com distribuição em São Paulo e em localidades próximas que exibem uma casca espessa são: *Leptolobium elegans* Vogel, *Copaifera langsdorffii* Desf., *Erythroxylum suberosum* A. St.-Hil, e *Salvertia convallariodora* A. St.-Hil. As quatro espécies citadas foram as selecionadas para a elaboração deste trabalho. Duas das espécies pertencem à família Fabaceae (*L. elegans* e *C. langsdorffii*), sendo elas integrantes das subfamílias Papilionoideae e Caesalpinioideae, respectivamente. As outras duas espécies pertencem às famílias Erythroxylaceae e Vochysiaceae. As três famílias estão inseridas no clado das Rosídeas (APG IV 2017). Dentre as quatro espécies, *C. langsdorffii* é a que possui composição química mais bem resolvida, devido ao seu amplo uso medicinal, além dos numerosos estudos demonstrando a atividade de seus extratos e constituintes, incluindo anti-inflamatória, antioxidante, cicatrizante,

antimalárica, leishmanicida e antiacetilcolinesterásica (Penido et al. 2017). A respeito de *E. suberosum* alguns trabalhos já foram feitos sobre sua química e atividades biológicas. Entretanto, pouco se conhece de *S. convallariodora* e *L. elegans* do ponto de vista fitoquímico.

1.4.1. *Copaifera langsdorffii* Desf.

Copaifera langsdorffii, ou copaíba como é conhecida popularmente, é uma Fabaceae da subfamília Caesalpinioideae. Trata-se de uma árvore com diversos usos na medicina tradicional, principalmente sua óleo-resina que é conhecida como “óleo de copaíba”. Esse óleo é utilizado desde o século dezessete e pode ser obtido de diferentes espécies do gênero, mas *C. langsdorffii* é a mais abundante no Brasil. Por conta disso, ainda que numerosos trabalhos tenham sido produzidos com a planta, a vasta maioria deles foi com base nessa óleo-resina exsudada do caule. A óleo-resina foi principalmente utilizada no tratamento de gonorreia, além de hemorroidas, bronquite e desinteria crônica (Dwyer 1951). Outros de seus usos medicinais são no tratamento de verme, leishmaniose, pneumonia, sinusite, gripe, reumatismo, feridas, picadas de insetos e como cicatrizante (Pieri et al. 2009).

Dada a sua ampla utilização na medicina tradicional, são frequentes as investigações da composição química, não apenas da óleo-resina, mas dos diferentes órgãos da planta, incluindo folhas, ramos, flores, frutos e semente, além de estudos comprovando sua eficácia quanto suas atividades já conhecidas, revelando novos usos para seus diversos extratos. Além das atividades mais conhecidas e estudadas, como antioxidante (Gelmini et al. 2013; Costa et al. 2015; Carmo et al. 2016; Penido et al. 2017), cicatrizante (Masson-Meyers et al. 2013), anti-inflamatória (Masson-Meyers et al. 2013) e antimicrobiana (Gonçalves et al. 2005; Braga & Silva 2015), extratos brutos e componentes obtidos das diversas partes de *C. langsdorffii* se mostraram promissores para os mais diversos usos, muitas vezes associados a essas propriedades citadas, algumas das quais serão exemplificadas a seguir. Brancalion et al (2012) observaram que extratos hidroalcoólicos da folha

possuíam atividade antilitiásica, reduzindo o número de cálculos renais em ratos, além diminuir a pressão para quebrá-los, essa atividade foi atribuída a compostos fenólicos, como os flavonoides heterosídeos quercitrina e afzelina. Extratos alcóolicos da folha também mostraram atividade inseticida (Sâmia *et al.* 2009; Barbosa *et al.* 2011). Extratos aquosos de folha e casca tiveram efeito negativo na biologia de *Spodopetera frugiperda*, uma praga de plantações de milho (Sâmia *et al.* 2016).

É bastante vasto o conhecimento que se tem a respeito da estrutura química de *C. langsdorffii*. Um estudo feito por Nascimento *et al.* (2012) mostra o alto polimorfismo químico em *C. langsdorffii*, identificando a diferente distribuição de 69 componentes do óleo volátil de folhas, galhos, pericarpo e sementes de 5 espécimes. O que se observou a respeito da natureza dos óleos voláteis é que eles são terpenoides, principalmente hidrocarbonetos sesquiterpênicos. Gelmini *et al.* (2013) verificou a presença de diversos sesquiterpenos voláteis e ácidos diterpênicos (ácido copálico o mais abundante) na resina, aos quais atribuíram as atividades antipsoriática, antioxidante e anti-inflamatória. Extração de folha por fluido supercrítico mostraram a presença de ácidos galoilquílicos que, somado aos flavonoides, são os prováveis responsáveis pela atividade antioxidante da folha; no mesmo trabalho foi identificada a presença de ácido caurenóico (diterpeno ácido), já reportado como possuindo diversas atividades (Costa *et al.* 2015), dentre as quais anti-inflamatória, antitumoral, antimicrobiana, cicatrizante e vasodilatadora (Arruda *et al.* 2019).

Com relação à casca da copaíba, comparações no rendimento de extrações com diclorometano, etanol e água mostraram que na estrutura está presente maior conteúdo de extrativos polares, ricos em compostos fenólicos (inclusive flavonoides). Extratos hidroetanólicos da casca apresentaram também atividade antiacetilcolinesterásica e antioxidante (Penido *et al.* 2017).

1.4.2. *Leptolobium elegans* Vogel

Leptolobium elegans carece de estudos fitoquímicos e de atividades biológicas. Popularmente conhecida como “perobinha-do-campo”, a casca da

raiz da planta já foi um medicamento oficial do Brasil, e seus extratos já foram patenteados pelo suposto efeito sedativo, antiespasmódico e analgésico (Balandrin & Kinghorn 1981). Atualmente é vendido o fitoterápico Ritmoneuran® que inclui em sua fórmula extrato de *L. elegans*, presente também no medicamento Vagostesyl. Pesquisas feitas para comprovar a eficácia e toxicidade da planta nesses medicamentos mostram o efeito de extratos etanólicos da casca na inibição do Sistema Nervoso Central e anticonvulsivante em ratos (Vieira *et al.* 2002b), atividade atribuída ao triterpeno lupeol. Foi descrito um alcaloide e seu enantiômero do extrato da casca de *L. elegans*, a sweetinina e homo-sweetinina (Balandrin & Kinghorn 1981), além de isolada uma pirona da casca de raiz (Oliveira *et al.* 1994). Também foi demonstrada diminuição da atividade do SNC e do sistema motor, bem como do tônus muscular em camundongos de extratos etanólicos da casca da raiz (Sousa Júnior *et al.* 2009). Em uma caracterização farmacognóstica dos extratos de *L. elegans* verificou-se que o teor de alcaloides é dez vezes maior na raiz que nas partes aéreas da planta (Oliveira *et al.* 1994).

O trabalho mais recente realizado com a espécie investigou a composição química do súber de diversas plantas nativas do Cerrado para fins quimiotaxonômicos. Nesse estudo foram identificadas diversas substâncias no extrato hexânico de *L. elegans*, dentre elas dez ácidos graxos saturados, três ácidos graxos insaturados, quatro *n*-alcanos, dois álcoois graxos primários, dois triterpenos pentacíclicos, quatro fitoesteróis, além de glicerol (Salatino *et al.* 2020). A grande maioria das pesquisas sobre *L. elegans* foi feita sob seus sinônimos: *Sweetia elegans* e *Acosmium subelegans*.

1.4.3. Salvertia convallariodora A. St.-Hil

Apesar do levantamento etnobotânico realizado por Vila Verde *et al.* (2003) que coloca *S. convallariodora* – popularmente conhecida como “bate-caixa” – na lista de plantas medicinais do cerrado, cuja decocção da folha é utilizada contra hemorroida, pouco se conhece a respeito de sua química. Outro levantamento feito por Neto & Morais (2003) anota o uso da casca dessa espécie

por meio do preparo de ‘garrafadas’ no tratamento de problemas estomacais. Dentre os escassos trabalhos feitos com a espécie está a determinação de moderada atividade contra *Trypanosoma cruzi* do extrato hexânico da folha, além de ter apresentado baixa toxicidade no ensaio de toxicidade realizado pelo estudo (Charneau *et al.* 2016). Extratos acetoetanólicos de folhas de *S. convallariodora* apresentaram atividade antioxidante e, além do alto teor fenólico, foi identificada a presença de licopeno nesses extratos (de Menezes Filho *et al.* 2019). Um estudo preliminar mostrou a presença de catequinas, cumarinas, glicosídeos cardiotônicos, saponinas e taninos de catequina em extratos etanólicos da espécie (de Menezes Filho & Castro 2019).

Da casca dessa espécie já foram identificados derivados de ácido elágico (Corrêa *et al.* 1975), classe de metabólitos que, de acordo com a literatura, está relacionada às propriedades anti-inflamatória e anti-ulcerogênica da família Vochysiaceae (Gomes *et al.* 2009). Da casca também foi obtido β -sitosterol (Corrêa *et al.* 1975). Outros trabalhos obtiveram três flavonas de extratos de folha (Lopes *et al.* 1979), além dos triterpenos ácido serícico, ácido 24-hidroxitormêntico e sericosídeo de extratos de acetato de etila da madeira de *S. convallariodora*, dos quais também foram caracterizadas três novas flavanonas com um incomum anel B não aromático (de Mesquita *et al.* 2017).

1.4.4. *Erythroxylum suberosum* A. St.-Hil

Erythroxylum é bem conhecido pela ocorrência de tropanos derivados de alcaloides, flavonoides e terpenoides com relevância farmacológica (Leite *et al.* 2014). Entretanto, na maioria dos estudos com *E. suberosum* A. St.-Hil, uma espécie típica do Cerrado, é evidenciada a ausência de alcaloides nos órgãos da planta, fato possivelmente correlacionado à falta de nitrogênio no solo do bioma (Salatino 1993). Mesmo com a falta de alcaloides, *E. suberosum*, popularmente conhecida como “fruta-de-pomba-do-campo”, “mercúrio-do-campo”, “mercureiro” e “sombra-de-touro”, é tradicionalmente utilizadas como anestésico, antirreumático e contra má digestão (Barbosa & Pinto 2003).

O uso medicinal de *E. suberosum* levou alguns autores a investigar a composição química de seus extratos e suas atividades biológicas, focando em extrações da folha e em alguns casos, de galhos. Ensaios preliminares com extratos aquosos e alcóolicos de folhas, casca do caule, lenho do caule, casca da raiz e lenho da raiz, identificaram apenas a presença de saponinas e taninos dentre as substâncias sondadas, sendo que estavam presentes em todas as estruturas da planta mencionadas (Silva *et al.* 1976). Outro trabalho realizado para identificar classes de substâncias presentes nas folhas de *E. suberosum* detectou além de saponinas e taninos, flavonoides, cumarinas e resinas. As últimas três classes haviam sido testadas por da Silva *et al.* (1976), porém o resultado havia sido negativo para elas em todas as partes da planta estudadas (Rodrigues *et al.* 2015). Uma investigação a respeito da diversidade de flavonoides no gênero *Erythroxylum* verificou a presença de kaempferol e quercetina com diferentes formas glicosiladas e aglicosilada em *E. suberosum* (Bohm *et al.* 1988). Um estudo químico com folhas da espécie identificou a presença de ésteres de cadeia longa, além dos fenólicos: rutina, uma mistura de hiperosídeo e isoquercitrina, quercetina e derivados, catequina e epicatequina, derivados de ácido clorogênico (Lopes 2016). Os esteroides campesterol, estigmasterol e β -sitosterol foram relatados em extratos do caule de *E. suberosum* e o éster graxo do sitoesterol em raiz, todos metabólitos de grande abundância na natureza. Nesse mesmo estudo, foi relatada para a espécie, a possível presença de alcaloides, no caso tropacocaína e nortropacocaína, obtidas do extrato etanólico da folha (Nascimento 2014). Outro trabalho realizado pouco tempo antes (Lucas-Filho 2009) também identificou presença de alcaloides em *E. suberosum*. Alcaloides foram novamente encontrados em extratos da espécie em triagem fitoquímica feita por Oliveira *et al.* (2015), obtendo resultado positivo para alcaloides, cumarinas, flavonoides (inclusive antocianina) e taninos condensados. Nascimento *et al.* (2012) identificaram cinco novos diterpenos em extratos etanólicos de galhos de *E. suberosum*.

Dentre as atividades biológicas de extratos de *E. suberosum* já verificadas está a atividade antifúngica de frações de extratos da casca contra *Candida krusei*, *Candida glabrata*, *Cryptococcus neoformans* e, com menor

eficácia, *Staphylococcus aureus* (Violante *et al.* 2012). Em contrapartida, outro estudo com *E. suberosum* não mostrou atividade nem de extratos de galho, nem de folha, contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* – esse resultado pode ser atribuído à polaridade do solvente ou órgão do qual foi obtido o extrato (Silva *et al.* 2014). Outras atividades verificadas, porém de extratos de folha, foram antioxidante (Oliveira *et al.* 2015; Lopes 2016; Barros *et al.* 2017), anti-hipertensiva (Lucas-Filho 2009), inibição da enzima hialuronidase (Lopes 2016) e no tratamento de câncer oral em associação com radiação (Macedo *et al.* 2016). Avaliações preliminares de toxicidade foram realizadas com *E. suberosum*, dentre elas, duas apresentaram valores de baixa toxicidade (Lopes 2016; Barros *et al.* 2017), enquanto uma apresentou altos valores (Violante *et al.* 2012). Essa discrepância poderia ser talvez atribuída a diferenças nos métodos de extração e fracionamento, de fatores genéticos e naturais a que as plantas estavam submetidas, além do órgão da planta utilizado, resultando na composição distinta dos extratos.

2. JUSTIFICATIVA

Apesar dos esforços empenhados na pesquisa da bioprospecção de plantas brasileiras, a grande diversidade de espécies vegetais no país permite que ainda exista um enorme espaço para pesquisas na área da fitoquímica, especialmente na procura de compostos biologicamente ativos. Substâncias que possuam atividade biológica são potenciais componentes para a fabricação de medicamentos e cosméticos, além de seus possíveis usos fitoterápicos.

Dentre as possíveis estruturas vegetais das quais se podem obter extrativos está a casca. A região externa da casca se trata de um tecido morto, porém suas células já foram vivas, mantendo nelas substâncias que podem ser facilmente extraídas, como compostos fenólicos de baixo peso molecular, ácidos graxos, álcoois, terpenos e taninos (Sakai, 2001). Apesar de possuir alta diversidade de compostos, as pesquisas focadas na região do caule, externa à madeira, tratam predominantemente da casca como um todo, havendo poucos trabalhos que demonstrem separadamente a atividade biológica de extratos da

casca externa. Como já citado, a casca externa, por definição, se trata da região da casca composta por tecidos mortos e, portanto, sua exploração teria um impacto muito menor para o vegetal do que se extraída a casca como um todo, uma vez que essa inclui o floema condutor.

Dessa forma, existe ainda uma grande falta de conhecimento a respeito do potencial farmacológico da casca externa. Sendo espécies nativas do Cerrado com uso na medicina popular como *Leptolobium elegans*, *Copaifera langsdorffii*, *Erythroxylum suberosum*, *Salvertia convallariodora*, promissores objetos de estudo.

3. OBJETIVOS GERAIS

Determinar diferentes atividades biológicas de extratos de casca externa de espécies de plantas do cerrado. Identificar principais compostos e classes de compostos presentes nos diferentes extratos.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar as atividades antioxidante, antiacetilcolinesterásica e antimicrobiana, das extrações feitas nos solventes *n*-hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol, de espécimes de *Leptolobium elegans*, *Erythroxylum suberosum*, *Copaifera langsdorffii* e *Salvertia convallariodora*.
- Realizar doseamento de taninos e fenóis totais dos extratos de maior polaridade (acetato de etila e metanol).
- Caracterizar o perfil químico dos extratos lipofílicos (*n*-hexano e diclorometano)

Capítulo I

Atividades biológicas de extratos de *Copaifera langsdorffii*,
Leptolobium elegans, *Salvertia convallariodora* e *Erythroxylum*
suberosum

1. INTRODUÇÃO

Metabólitos secundário, também conhecidos como produtos naturais, possuem enorme significância na adaptação e evolução dos organismos. A complexa mistura desses compostos varia entre grupos de organismos, espécies e tecidos. Só de plantas, já foram identificadas mais de 100 mil substâncias (Wink 2010). Do ponto de vista antropocêntrico, muitas dessas moléculas podem ter utilidade para uma série de propósitos, e a área da saúde é a que causa maior impacto na vida humana. Para o conhecimento do potencial e uso correto e seguro de extratos e compostos de plantas é necessário primeiro que se compreenda sua capacidade e ação. Diversos estudos são feitos nesse aspecto, demonstrando uma infinidade de atividades biológicas. Dentre as atividades estudadas e seus diferentes mecanismos de ação, está antioxidante, antibacteriana, anti-inflamatória, anticancerígena, antiviral, antiparasita, fungicida, imunomoduladora, hepatoprotetora, cardioprotetora, antidepressiva, dentre muitas outras (Heilmann 2010; Kumar & Pandey 2013; Jucá *et al.* 2020).

A atenção dada à avaliação de atividade antioxidante tem crescido nos últimos anos. Um levantamento da literatura mostra quase o triplo de produção científica em 2021 (23627) focada no tema, em comparação ao ano de 2011 (8994) (baseado na pesquisa por *antioxidant activity* na plataforma Dimensions Analytics). A importância dos antioxidantes está em conter os danos causados por radicais livres, agindo como inibidor de processos de oxidação por diferentes mecanismos. A disparidade na produção de oxidantes, frente a defesa dos

antioxidantes, gera o chamado estresse oxidativo. O estresse oxidativo pode ser resultado de agentes endógenos (p.e. respiração celular) ou exógenos (p.e. radiação ionizante), e tem como consequência a oxidação de macromoléculas, como lipídeos de membrana, proteínas e ácido nucleico (Forman & Zhang 2021). O dano celular por espécies reativas está associado a uma gama de patologias e questões de saúde, como envelhecimento, câncer, doenças cardiovasculares, catarata, declínio do sistema imunológico, doenças hepáticas, diabetes, inflamação, insuficiência renal e doenças neurodegenerativas (Boligon 2014). Compostos de diversas classes de metabólitos secundários de plantas agem como antioxidantes naturais, p.e. terpenoides e alcaloides, porém os polifenóis são majoritários. O potencial antioxidante dos polifenóis é atribuído à presença do anel aromático (estrutura cíclica com ligações duplas conjugadas), portando grupos funcionais ativos (hidroxilas). De uma maneira geral, esses polifenóis podem ser separados em duas categorias: (1) os flavonoides, que incluem flavonóis, flavonas, flavanonas, flavanóis, isoflavonas, antocianinas e chalconas; e (2) polifenóis não flavonoides, incluindo cumarinas, estilbenos, lignanas, ácidos fenólicos e taninos (Nayik & Gull 2020). Metodologias e ferramentas para avaliar a atividade de antioxidantes vêm sendo constantemente aprimoradas. As várias metodologias de ensaios para a determinação de capacidade antioxidante podem ser divididas, do ponto de vista das reações químicas envolvidas, basicamente em duas categorias: (1) reação de transferência de elétron, medindo a capacidade redutora; e (2) reação de transferência do átomo de hidrogênio. O ensaio de capacidade de sequestro do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), se enquadra no primeiro grupo, enquanto o ensaio de capacidade de absorção de radicais oxigenados (ORAC), no segundo (Huang *et al.* 2005).

No caso de doenças degenerativas, o estresse oxidativo não é o causador, porém está associado às principais causas de morte das células neurais. A doença de Alzheimer, uma doença neurodegenerativa irreversível, é uma das causas mais predominantes da demência, e ainda sim, não se conhece os fatores que iniciam o seu desenvolvimento. Os medicamentos disponíveis, atualmente, para o tratamento de Alzheimer são limitados, atuando apenas no

alívio dos sintomas (Bakir *et al.* 2020). Dentre os possíveis mecanismos de ação desses medicamentos estão os inibidores da enzima acetilcolinesterase (AChE), que corresponde a maioria dos medicamentos utilizados atualmente (Tuzimski & Petruczynik 2022). A AChE atua na modulação da transmissão do sinal colinérgico por meio da degradação da acetilcolina, neurotransmissor envolvido em processos cognitivos, como atenção, raciocínio, aprendizado e memória (Bekdash 2021). O método mais comum de avaliação da atividade de inibição da enzima AChE é o descrito por Ellman (Ellman *et al.* 1961) adaptado para microplaca de 96 poços. Os compostos vegetais mais estudados quanto à capacidade de inibição da AChE são os alcaloides, classe à qual pertencem a maioria dos medicamentos com ação de inibição da AChE. Componentes de óleos essenciais também estão entre os mais relatados como ativos, principalmente compostos fenólicos, p.e. fenilpropanoides, e terpenos, como monoterpenos e sesquiterpenos (Tuzimski & Petruczynik 2022).

Metabólitos secundários vegetais também são potenciais alvos na busca de substâncias antibacterianas. Infecções bacterianas são uma importante questão da saúde humana, estando, inclusive, associadas à indução de processos neurodegenerativos, como na doença de Alzheimer, devido à presença de endotoxinas – componente majoritário da membrana externa de bactérias gram-negativas (Brown 2019). Uma preocupante questão no combate às infecções bacterianas é o progressivo processo de seleção de linhagens resistentes a antibióticos, problema agravado pelo aumento no seu uso. Bactérias gram-negativas de importância médica, como *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, possuem o agravante da presença da membrana externa, principal colaboradora para a resistência intrínseca a antibióticos observada nesse grupo (Exner *et al.* 2017). A consequência do aparecimento de microrganismos com diferentes mecanismos de resistência é a parcial ou total ineficácia dos tratamentos disponíveis. Esse cenário é acompanhado pela tendência nas últimas décadas de redução na aprovação de novos antibióticos, resultado da alta taxa de fracasso no desenvolvimento de novos medicamentos (Spellberg 2014). Nessas circunstâncias, uma possibilidade para contornar essa carência, é a busca por abordagens alternativas ou complementares ao emprego

dos antibióticos tradicionais. Plantas são uma rica fontes de compostos naturais, como alcaloides, flavonoides, terpenos, taninos, cumarinas e esteroides, com potencial atividade antibacteriana (Khameneh *et al.* 2021). Esses podem ser usados isoladamente ou como misturas mais complexas, como no caso de extratos vegetais, podendo atuar via uma série de diferentes mecanismos, como inibição na síntese proteica ou alterações na membrana ou parede celular da bactéria (Elsas & Bailey 2002). Substâncias de origem vegetal apresentam a vantagem de normalmente serem mais economicamente acessíveis, seguras no quesito efeitos colaterais, e se tornam mais rapidamente acessíveis que seus equivalentes sintéticos (Cheesman *et al.* 2017).

Muitas das atividades biológicas de extratos vegetais, inclusive as relatadas acima, podem estar associadas à presença de compostos fenólicos. Dentre as possíveis ações dessas substâncias estão as atividades anti-inflamatória, anticancerígena, cardioprotetora. Uma grande parte dessas atividades está associada direta- ou indiretamente à capacidade antioxidante de fenólicos (Cosme *et al.* 2020). Flavonoides são capazes de inibir ou estimular certas enzimas do metabolismo associado ao estresse oxidativo, agindo como antioxidantes indiretos (Ballard & Maróstica 2019). O mecanismo de ação dessas substâncias baseia-se no fato de compostos fenólicos serem bons doadores de elétrons. Atividade dependente em grande parte da estrutura da molécula, principalmente presença, número e posição das hidroxilas (Reis Giada 2013). Essa facilidade dos fenólicos em doar elétrons é o princípio que rege o doseamento de fenóis totais pelo reagente Folin-Ciocalteu, que se trata, efetivamente, de uma medida indireta do teor de fenóis totais através da capacidade redutora da amostra (Huang *et al.* 2005). Polifenóis são um dos grupos de substâncias mais frequentes nas plantas, com mais de 8000 estruturas fenólicas identificadas (Tanase *et al.* 2019).

Dentre os compostos fenólicos, os taninos pertencem a um grupo com ampla distribuição e diversidade nas plantas terrestres. Seu papel ecológico inclui proteção contra raios UV e radicais livres e defesa contra ameaças biológicas (animais, insetos, fungos e bactérias) (Shirmohammadli *et al.* 2018).

Taninos formam um grupo heterogêneo de moléculas solúveis em solventes hidro-alcoólicos, com capacidade de se complexar com proteínas, polissacarídeos (como celulose, hemicelulose e pectina), ácidos nucleicos, alcaloides e minerais. Essas propriedades estão associadas à presença de grande número de hidroxilas, alto peso molecular e flexibilidade da estrutura. Taninos podem ser agrupados de acordo com suas características químicas e estruturais em hidrolisáveis (agrupando galotaninos e elagitaninos), condensados (classe mais comum), complexos e florotaninos (exclusivo de algas Phaeophyceae) (Fraga-Corral *et al.* 2021). Taninos hidrolisáveis possuem peso molecular entre 500 e 3000 Da, e podem ser hidrolisados por ácidos/bases fracos, produzindo carboidratos (parte central) e ácidos fenólicos (ácido gálico ou elágico). Taninos condensados ou proantocianidinas normalmente possuem maior peso molecular (1000-20000 Da), e são oligômeros ou polímeros não ramificados de unidades de flavan-3-óis, como catequina e epicatequina (procianidinas), ou flavan-3,4-dióis (leucoantocianidinas) (Frutos *et al.* 2004; Shirmohammadli *et al.* 2018). Proantocianidinas sofrem despolimerização apenas sob forte oxidação e na presença de ácidos, liberando antocianidinas (Tong *et al.* 2022). Taninos complexos são resultado da ligação entre flavan-3-óis com ácido gálico ou elágico, enquanto florotaninos são formados por floroglucinol (Fraga-Corral *et al.* 2021). Taninos já demonstraram potencial para aplicações diversas, incluindo a indústria alimentícia (p.e. conservante) e farmacêutica. Como polifenóis naturais, já foram comprovadas as propriedades antioxidantes dos taninos em diferentes animais, correlacionadas, também, aos seus efeitos antibacterianos. Estudos reportam a capacidade de taninos em prevenir infecções virais como HIV, vírus adenoassociado (BAAV), norovírus, enterovírus e vírus da hepatite. Taninos também representam uma valiosa alternativa de medicamentos para o controle de parasitas, além de exibirem atividade anti-inflamatória (Tong *et al.* 2022). Em razão da alta variedade estrutural, a análise de taninos é bastante complexa, e é normalmente feita utilizando métodos simplificados de quantificação, ao invés de análises precisas das moléculas. Mesmo análises mais simplificadas deparam-se com o problema da falta de substâncias padrão adequadas, podendo levar à superestimação do conteúdo de taninos, como no ensaio HCl-

butanol para determinação do teor de taninos condensados (Salminen & Karonen 2011). Outro método de quantificar taninos condensados é pelo ensaio de vanilina, que forma um complexo colorido ao reagir com o flavanol. Essa técnica apresenta as desvantagens da baixa reprodutibilidade e variação na reatividade com as subunidades do polímero (Schofield *et al.* 2001). Métodos de doseamento por precipitação, como por PVPP e BSA, resultam no teor de taninos totais, porém esses valores variam dependendo da especificidade da molécula com o polímero, podendo resultar em sub- ou superestimação do conteúdo (Harbertson *et al.* 2014).

A principal fonte de compostos fenólicos de plantas são as frutas e verduras, porém muitos estudos apontam a casca de espécies arbóreas como uma importante fonte de fenólicos biologicamente ativos (Tanase *et al.* 2019). O composto extraído da casca de maior interesse comercial é o tanino (Jansone *et al.* 2017). A concentração de taninos condensados e seus flavonoides precursores é bastante substancial na madeira e casca de árvores, sendo ambos utilizados há séculos na curtição do couro (Pizzi 2008; Tanase *et al.* 2019). Além de ricas em taninos e fenóis, a casca, como primeira linha de defesa da árvore contra fatores externos adversos, é uma fonte de alta diversidade de metabólitos ativos (Abedini *et al.* 2020). Apesar de um potencial objeto de estudo, seu uso em maior escala é restrito às espécies de madeira comercial, em que há a tentativa do aproveitamento da casca. A remoção da casca de árvores vivas, por sua vez, pode comprometer a sobrevivência da planta – uma vez que a estrutura inclui o floema – e representa um perigo para populações de espécies de plantas medicinais. No Cerrado brasileiro, a extração predatória de plantas medicinais é parcialmente responsável pela extinção de diversas espécies (Feitosa *et al.* 2017). Uma alternativa mais ecologicamente viável seria a utilização unicamente da casca externa, uma vez que se trata de tecido morto, que não é mais condutor. Em espécies como *Picea abies* e *Pinus sylvestris* o conteúdo de taninos se mostrou maior na casca externa que interna (Raitanen *et al.* 2020). Extratos de *Betula pendula* e *Betula obscura* obtiveram resultados semelhantes entre casca interna e externa em ensaios de citotoxicidade e atividade antioxidante, além de ambos terem apresentado alto teor de triterpenos

pentacíclicos (Ostapiuk *et al.* 2021). Extratos de casca externa de *Sclerocarya birrea* obtiveram atividade antibacteriana superior à folha, ainda que a casca interna tenha sido mais ativa (Eloff 2001). Esses e outros estudos mostram que a casca externa é também uma fonte potencial de compostos ativos.

Neste capítulo serão tratadas as atividades antioxidante, antiacetilcolinesterásica e antibacteriana, além de doseamento de fenóis e taninos totais de extratos de casca externa de quatro espécies de plantas do cerrado, com uso na medicina tradicional: *Copaifera langsdorffii* Desf., *Leptolobium elegans* Vogel, *Salvertia convallariodora* A. St.-Hil e *Erythroxylum suberosum* A. St.-Hil.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Coleta

Foi coletada a casca externa de três indivíduos de *Copaifera langsdorffii*, três de *Leptolobium elegans*, dois de *Erythroxylum suberosum* e três de *Salvertia convallariodora*. As três primeiras espécies foram coletadas nos municípios de Assis (São Paulo) e Tibagi (norte do Paraná), pela equipe da Profa. Dra. Renata G. Udulutsch da Universidade Estadual Paulista, campus de Assis. *Salvertia convallariodora* foi coletada no município de Itacarambi (Minas Gerais) pelo Prof. Dr. Gregorio T. Ceccantini do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (IBUSP). As amostras foram coletadas a uma distância do solo correspondendo aproximadamente à altura do peito de uma pessoa, sendo todas as árvores adultas e plenamente desenvolvidas. Exsicatas dos espécimes estão depositadas no Herbário de HASSI e discos de madeira na xiloteca do Herbário do Departamento de Botânica – IBUSP (SPF). A cada espécime foi atribuída uma sigla composta pelas iniciais da espécie seguida de um número. As informações a respeito das amostras adquiridas estão compiladas na Tabela 1.

Tabela 1. Relação das amostras de cada espécie, número de voucher, sigla do coletor, local de coleta e sigla atribuída ao espécime.

ESPÉCIE	Registro ^a	Coletor ^b	Local	Espc ^c
<i>Copaifera langsdorfii</i> Desf.	HASSI 01187	RGU	Assis-SP	C1
	HASSI 01190	RGU	Assis-SP	C2
	HASSI 01192	RGU	Assis-SP	C3
<i>Leptolobium elegans</i> Vogel	HASSI 01195	JVLM	Tibagi-PR	L1
	HASSI 01204	PNT	Tibagi-PR	L2
	HASSI 01205	JVLM	Tibagi-PR	L3
<i>Erythroxylum suberosum</i> A. St.-Hil	HASSI 01194	JVLM	Tibagi-PR	E1
	HASSI 01206	PNT	Tibagi-PR	E2
<i>Salvertia convallariodora</i> A. St.-Hil	SPFw 8426	GCT	Itacarambi-MG	S1
	SPFw 8427	GCT	Itacarambi-MG	S2
	SPFw 8428	GCT	Itacarambi-MG	S3

^a HASSI: Herbário da Universidade Estadual Paulista; SPFw: Xiloteca do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

^b RGU: Renata Giassi Udulutsch; JVLM: João Victor Longhi Monzoli; PNT: Paulo Naoto Taniguti; GCT: Gregório Cardoso Tápias Ceccantini.

^c Espc: espécime;

2.2. Extração

Antes de ser retirada a casca, foi utilizada uma escova de aço para a remoção de qualquer material que não fosse de interesse (p.ex., líquenes e musgos). Após passar a escova na superfície do tronco, com um estilete removeu-se a camada mais externa da casca, procurando não incluir a região interna (células vivas de floema secundário, feloderme e córtex). As lascas de súber obtidas foram trituradas até serem reduzidas a pó, para então serem extraídas.

As extrações foram feitas a frio, com quatro solventes, passando do solvente de menor polaridade para o de maior polaridade, na seguinte ordem: *n*-hexano (Hex), diclorometano (DCM), acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH). O pó obtido de cada planta foi depositado em um Erlenmeyer, ao qual foi adicionado o solvente, permanecendo sob agitação horizontal, por um tempo mínimo de 24 horas, após o qual o material foi filtrado, e o solvente foi adicionado novamente. O procedimento foi repetido três vezes para cada solvente (Figura 1). Os extratos foram concentrados, utilizando-se rota-evaporador sob temperatura de 50°C e pressão reduzida, até remoção total do solvente. O resíduo foi pesado para o cálculo do rendimento. Os extratos foram nomeados a

partir do solvente – *n*-hexano (**h**), diclorometano (**d**), acetato de etila (**a**) e metanol (**m**) –, seguido da sigla do espécime. Devido a quantidade insuficiente de extrato de acetato de etila de *S. convallariodora*, foi repetida a extração da espécie, unindo o material de casca restante dos três espécimes. O novo extrato de AcOEt foi intitulado **aSal**.

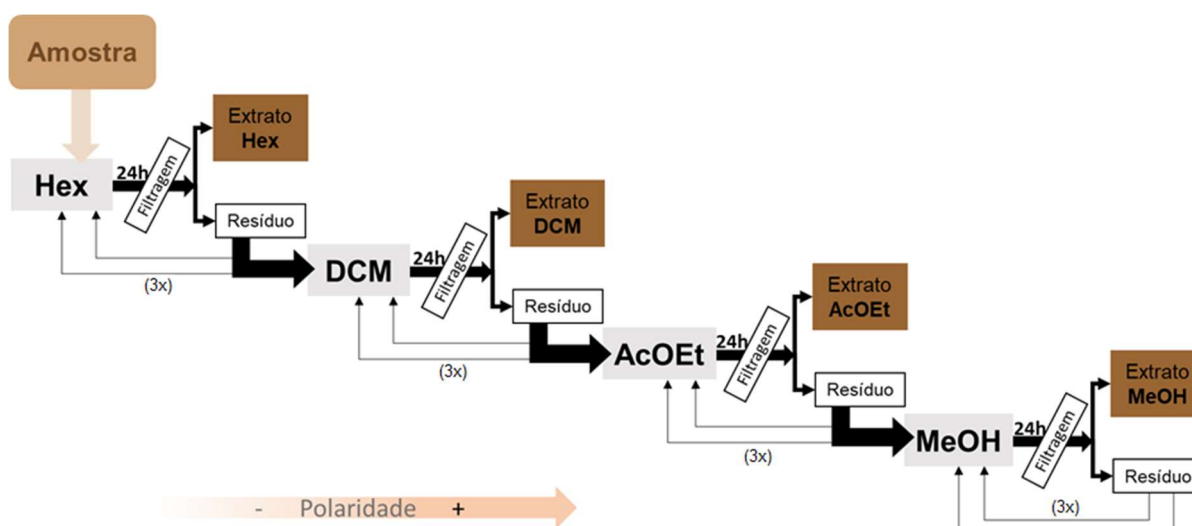


Figura 1. Esquema geral do processo de extração. Hex: *n*-hexano; DCM: diclorometano; AcOEt: acetato de etila; MeOH: metanol.

2.3. Ensaios

2.3.1. Avaliação da atividade antioxidante – DPPH

A atividade antioxidante dos extratos foi determinada por meio da quantificação da capacidade de seus compostos de sequestrar o radical orgânico DPPH[•] (2,2 difenil-1-picril-hidrazil). Foi utilizado o protocolo descrito por Silva (2008), com adaptações.

As amostras foram ressuspensas em dimetilsulfóxido (DMSO) 10% (v/v) em diferentes concentrações para a construção da curva de atividade. Alíquotas de 100 µL de cada concentração foram transferidas para poços da microplaca. Aos poços, foram adicionados 200 µL da solução de DPPH em MeOH a 80 µg mL⁻¹, obtendo absorvância próxima de 1 em 517nm para o controle negativo (100 µL de DMSO 5% + 200 µL da solução de DPPH). Para o

branco de cada concentração das amostras, os 200 µL de DPPH foram substituídos por 200 µL de DMSO 10%. A leitura da microplaca foi feita a 517 nm após 30 minutos no escuro. A curva do controle positivo foi construída com quercetina (10-50 µg mL⁻¹), repetindo o procedimento anterior.

O cálculo de porcentagem de atividade de sequestro do radical DPPH (%*Asrd*) foi feito utilizando a equação abaixo (Silva 2008):

$$\%Asrd = 100 - [(Abs_a - Abs_b)/Abs_{cn}] \times 100,$$

no qual: Abs_{cn} = absorbância do controle negativo; Abs_a = absorbância da amostra; Abs_b = absorbância do branco correspondente. Com a porcentagem de atividade nas diferentes concentrações para cada amostra, foi construída a curva de atividade por massa de extrato e estimada a massa necessária para alcançar 50% de atividade (IC₅₀).

2.3.2. Avaliação da atividade antioxidante – ORAC

A atividade antioxidante dos extratos também foi avaliada através da quantificação da sua capacidade de absorção, por meio da transferência do átomo de hidrogênio, dos radicais oxigenados (ORAC). O protocolo foi adaptado de Santos *et al.* (2016). A solução de tampão fosfato (75 mM, pH 7) foi preparada com as soluções de fosfato dissódico (Na₂HPO₄: 10,64 mg mL⁻¹) e fosfato monossódico (NaH₂PO₄: 9 mg mL⁻¹) na proporção de 1:1. Os extratos foram solubilizados em DMSO 10% e diluídos em tampão fosfato nas diferentes concentrações. Alíquotas de 25 µL das amostras foram combinadas a 150 µL da solução de fluoresceína (3 ng mL⁻¹ em tampão fosfato, preparada no dia da análise) nos poços da microplaca. Após 30 minutos de incubação a 37°C, foram adicionados aos poços 25 µL da solução de AAPH (2,2'-Azobis(2-amidinopropano) di-hidroclorato) a 20,7 mg mL⁻¹ em tampão de fosfato (preparada no momento da reação). A leitura da fluorescência foi feita a 485 nm de comprimento de onda de excitação e 528 nm de emissão, durante 2 horas, em intervalos de 1 minuto. As amostras foram substituídas por quercetina (0,2-3 µg mL⁻¹ em tampão fosfato) e Trolox (1,6-12,5 µg mL⁻¹ em tampão fosfato), para

o controle positivo. O controle negativo consistiu na adição de 25 µL de tampão aos 150 µL de fluoresceína. As amostras e os controles foram feitos em triplicata.

A curva da atividade de absorção de radicais oxigenados (%Aaro) foi determinada com a área abaixo da curva (fluorescência x tempo) obtida das diferentes diluições de cada amostra, a partir das fórmulas:

$$AC = \sum_{i=0}^{120} f_i/f_0;$$

$$A_a = AC_a - AC_{cn};$$

em que AC = área abaixo da curva, obtida pela somatória das razões entre cada fluorescência lida de 0 minutos a 120 minutos (f_0 a f_{120}) sobre a leitura em 0 minutos (f_0). A área correspondente à amostra (A_a) é determinada pela subtração entre a área abaixo da curva da amostra (AC_a) e área do controle negativo (AC_{cn}). Os valores finais de ORAC foram calculados com base no Trolox, tendo seu maior valor de área (A_{max}) tomado como referência para 100% de atividade. A atividade das amostras (%Aaro) foi obtida conforme a equação:

$$\%Aaro = 100 - [(A_{max} - A_a)/A_{max}] \times 100.$$

A massa de extrato necessária para alcançar 50% de atividade (EC50 µg mL⁻¹) foi calculada por meio da equação de regressão (atividade x massa).

Uma segunda maneira de expressar os resultados do ensaio foi em equivalentes de Trolox (µg) em 100 µg de extrato (µg ET 100 µg⁻¹). Esse cálculo foi feito aplicando cada valor de A_a na equação da reta de regressão do Trolox, seguido da divisão pela respectiva massa de amostra utilizada. Os valores que fossem semelhantes para cada espécime, obtidos por esse cálculo, tiveram sua média calculada (entretanto, concentrações muito baixas ou muito altas de amostra tiveram valores fora da reta e, portanto, não foram utilizados).

2.3.3. Avaliação da atividade antiacetilcolinesterásica

O protocolo utilizado no ensaio de atividade de inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE) foi retirado de Mathew & Subramanian (2014). Baseado na metodologia de Ellman, o DTNB (ácido 5,5-ditio-bis-(2-nitrobenzoico), também conhecido como reagente de Ellman, reage com o grupo

tiol, oriundo da degradação da acetiltiocolina pela AChE, produzindo um composto detectável a 412 nm (Ellman *et al.* 1961).

Para as soluções foi utilizado tampão Tris-HCl (50 mM, pH 8). Alíquotas de 20 µL dos extratos solubilizados em DMSO 10% foram combinadas a 40 µL do tampão nos poços da microplaca. Aos poços foram adicionados 100 µL da solução de DTNB (3 mM), diluído em tampão com NaCl (0,1 M) e MgCl₂.6H₂O (0,02 M). A AChE (Sigma-Aldrich®) foi solubilizada em tampão a 1036 U mL⁻¹ e armazenada em freezer -80 °C (solução estoque). Posteriormente, a enzima foi diluída em tampão (0,26 U mL⁻¹) contendo BSA 0,1%, e alíquotas de 20 µL foram transferidas aos poços. Após 15 minutos de incubação, a 25°C, a placa foi lida em 412 nm. A reação foi iniciada com a transferência de 20 µL da solução de iodeto de acetiltiocolina (15 mM em tampão), preparada apenas no momento de uso. As absorbâncias foram lidas imediatamente após a adição da acetiltiocolina e a cada 5 minutos, durante 20 minutos, no comprimento de 412 nm.

As soluções de AChE, DTNB e iodeto de acetiltiocolina foram mantidas no gelo e protegidas da luz durante todo o experimento. O protocolo foi também realizado substituindo a amostra por brometo de neostigmina (2-0,062 µg mL⁻¹, em tampão), como controle positivo, e por DMSO 10% ou tampão, como controle negativo das amostras e do padrão, respectivamente. Todas as amostras foram feitas em duplicata, para a triagem de extratos ativos, e os controles em triplicata. Para o cálculo de atividade, foi subtraída da absorbância final (20 min) a absorbância inicial (logo após a adição da acetiltiocolina) (A_a). Foram estabelecidas as absorbâncias do controle negativo (A_{cn}) como zero de atividade. A média das absorbâncias da maior concentração do controle positivo (A_{cp}) foi estabelecida como 100% de atividade. A porcentagem da atividade de inibição da AChE (%AAChE) foi obtida com a equação abaixo:

$$\%AAChE = 100 \times (A_{cn} - A_a) / (A_{cn} - A_{cp}).$$

2.3.4. Avaliação da atividade antimicrobiana

A susceptibilidade das bactérias *Bacillus subtilis* (WDCM 00003, Sigma), *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145, Fluka) aos extratos foi testada pela técnica de microdiluição em caldo, avaliando a mínima concentração de extrato necessária para que ocorra visivelmente a inibição do crescimento bacteriano (CIM). Esse parâmetro é utilizado internacionalmente para avaliação de atividade antimicrobiana e foi realizado seguindo as diretrizes do CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) (Cockerill 2015). O inóculo a ser utilizado no ensaio foi cultivado em caldo Mueller-Hinton (MHB) por 6 horas sem agitação ou 12 horas em agitação a 30°C. Para a padronização da densidade do inóculo foi utilizada a solução-padrão MacFarland 0.5. A turbidez do inóculo foi ajustada para uma mesma densidade óptica a 595 nm que a solução-padrão, equivalendo de 1 a 2×10^8 unidades formadoras de colônia por mL (UFC mL⁻¹). A cultura de trabalho foi produzida com a diluição de 1 mL do inóculo ajustado em 199 mL de meio de cultura ($5-10 \times 10^5$ UFC mL⁻¹).

As placas foram preparadas com a adição de 10 µL de extrato solubilizados em DMSO 50% (em meio de cultura) em diferentes concentrações. Foram obtidas nos poços as concentrações de 2,63 mg mL⁻¹, 1,32 mg mL⁻¹, 0,66 mg mL⁻¹, 0,33 mg mL⁻¹, 0,16 mg mL⁻¹, 0,08 mg mL⁻¹ e 0,04 mg mL⁻¹. Aos poços foram transferidos 180 µL da cultura de trabalho, obtendo-se $4,7-9,5 \times 10^5$ UFC mL⁻¹ (total de $9,5-19 \times 10^4$ UFC/poço). As placas foram incubadas a 30°C por 24 horas. Os controles experimentais corresponderam a (1) DMSO 50% + bactérias, (2) meio de cultura + bactérias, (3) DMSO 50% + meio de cultura, (4) somente meio de cultura. Como controle positivo foi utilizado o antibiótico gentamicina. Os testes foram realizados em triplicata.

2.3.5. Doseamento de fenóis totais e taninos totais

O doseamento de fenóis e taninos totais foi realizado de acordo com o protocolo descrito por Palacios *et al.* (2021), a partir da metodologia de PVPP/Folin-Ciocalteu. O conteúdo de taninos totais foi calculado a partir da

diferença entre os fenóis totais presentes no extrato e fenóis remanescentes após a precipitação com polivinilpirrolidona (PVPP). O ensaio foi realizado com os extratos de AcOEt e MeOH, ambos solubilizados em metanol.

A determinação de fenóis totais consistiu na transferência de 40 μL do extrato, 60 μL de água ultrapura, 50 μL do reagente Folin-Ciocalteu e 225 μL de carbonato de sódio 20% para microtubos. Após serem mantidos por 40 minutos no escuro, os tubos foram centrifugados por 10 minutos com velocidade de 10000 g. Alíquotas de 250 μL do sobrenadante foram transferidas para microplacas de 96 poços e lidas as absorvâncias a 725 nm.

Para a determinação dos fenóis remanescentes, após a precipitação dos taninos, foi realizada uma segunda análise, passando as amostras por uma etapa adicional anterior ao doseamento por Folin-Ciocalteu. Alíquotas de 750 μL dos extratos de foram transferidas para microtubos contendo 100 mg de PVPP e 1000 μL de água ultrapura. Os tubos foram agitados no agitador tipo vórtex e mantidos por 15 minutos na temperatura de 4°C. As amostras foram centrifugadas por 15 min a 4°C na velocidade de 10000 g. O método de doseamento de fenóis com Folin-Ciocalteu foi repetido com 40 μL do sobrenadante. Durante todo o procedimento os tubos foram mantidos em baixas temperaturas.

Os doseamentos de ambos – fenóis totais e fenóis remanescentes – foram feitos em triplicata. As concentrações dos extratos utilizadas foram de duas a dez vezes maior para o procedimento com PVPP, dependendo do teor de taninos. A curva de calibração foi construída com ácido gálico (Sigma) e ácido tânico (Merck) em diluições entre 0.005 e 0.16 mg mL^{-1} . Para os cálculos de massa de fenóis totais e fenóis remanescentes (após precipitação), foram aplicadas as absorvâncias médias da triplicata das amostras na equação da reta dos ácidos gálico e tânico (massa, absorvância), respectivamente. Foram calculados fenóis e taninos totais dos extratos por meio das fórmulas descritas abaixo. O desvio padrão de taninos totais foi calculado de acordo com a fórmula apresentada por Torres *et al.* (2021)..

Cálculo de fenóis totais:

$$F_t = (F_{ps}/m_p) \times 100$$

No qual: F_t = fenóis totais – em mg de equivalentes de ácido gálico por 100 mg de extrato (mg EaG 100 mg⁻¹) ou porcentagem (%), F_{ps} = massa de fenóis no poço (sem precipitação com PVPP) e m_p = massa de extrato no poço.

Cálculo de taninos totais:

$$F_r = (F_{pp}/m_p) \times 100$$

$$T_t = F_t - F_r$$

No qual: F_r = fenóis remanescentes – em mg de equivalentes de ácido tânico por 100 mg de extrato (mg EaT 100 mg⁻¹) ou porcentagem (%); F_{pp} = massa de fenóis no poço (após precipitação dos taninos com PVPP); m_p = massa de extrato no poço; T_t = teor de taninos totais (mg EaT 100 mg⁻¹ ou %).

Cálculo do desvio padrão de taninos totais:

$$DP = \sqrt{dp_t^2 + dp_r^2}$$

No qual: DP = desvio padrão da amostra; dp_t = desvio padrão da triplicata de fenóis totais; dp_r = desvio padrão da triplicata de fenóis remanescentes.

2.3.6. Doseamento de taninos condensados – vanilina/HCl

A metodologia aplicada para a quantificação de taninos condensados (ou pelo menos de seus componentes monoméricos) também seguiu o protocolo descrito por Palacios *et al.* (2021). Foram preparadas as soluções de HCl 8% e vanilina 1% e misturadas na proporção de 1:1 antes da reação. Nos poços da microplaca foram depositados 100 µL dos extratos de AcOEt e MeOH em concentrações distintas – dependendo do seu teor de taninos – e 200 µL do reagente vanilina-HCl. O branco das amostras foi obtido substituindo o reagente por metanol. A placa foi incubada por 20 min a 30°C e as absorbâncias lidas a 500 nm. A curva de calibração foi construída com d-catequina (Instituto Oswaldo

Cruz) nas concentrações 0.1 mg mL⁻¹, 0.5 mg mL⁻¹, 1 mg mL⁻¹, 1.5 mg mL⁻¹ e 2 mg mL⁻¹. Para o cálculo de taninos condensados foi utilizada a mesma fórmula dos fenóis totais; porém, das absorvâncias, após a reação, foram subtraídos os respectivos brancos. Os resultados estão representados em equivalentes (mg) de d-catequina por 100 mg de extrato (mg EC 100 mg⁻¹) ou porcentagem (%).

2.3.7. Doseamento de taninos totais – BSA

A quantificação de taninos totais também foi realizada por meio da metodologia adaptada de Palacios *et al.* (2021), que se baseia na capacidade dessas moléculas de se complexar com a albumina de soro bovino (BSA). A solução de BSA a 5 mg mL⁻¹ foi preparada em tampão acetato 0.2 M com cloreto de sódio (NaCl) a 0.17 M e pH 4,9. Para a preparação de 50 mL de solução, utilizou-se 50 mg de BSA (Sigma-Aldrich), 570 µL de ácido acético, 480 mg de cloreto de sódio e completado o volume com água destilada. A correção do pH foi feita com hidróxido de sódio 10 N.

Alíquotas de 360 µL da solução de BSA foram transferidas para microtubos contendo 180 µL de extrato solubilizado em metanol. Os tubos foram agitados no agitador do tipo vórtex e, após 15 minutos, centrifugados a 10000 g a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em 720 µL de dodecil sulfato de sódio (SDS) 1% (m/v), contendo trietanolamina 5% (v/v) e isopropanol 20% (v/v). A homogeneização foi feita novamente com o auxílio do vórtex e a mistura foi centrifugada para a eliminação da espuma. Aos poços da microplaca foram transferidos 240 µL da mistura e 60 µL de cloreto férrico (FeCl₃ 0.01 M em HCl 0.01 N). A leitura foi feita a 510 nm, após 15 minutos de reação e agitação de 5 segundos.

A curva de calibração foi construída com diluições de ácido tânico (100-700 mg mL⁻¹), repetindo os procedimentos descritos acima. Para o controle negativo foi substituída a amostra por metanol. O ensaio foi realizado em triplicata e os valores foram obtidos conforme os cálculos descritos anteriormente, sendo expressos em mg de equivalentes de ácido tânico por 100 mg de massa de extrato (mg EaT 100 mg⁻¹) ou porcentagem (%).

2.4. Fracionamento em CCD guiado por DPPH

Com os extratos mais polares (MeOH e AcOEt) foi realizada uma triagem adicional em cromatografia em camada delgada (CCD) para a determinação de frações com potencial atividade antioxidante. Foram depositados 6 µL dos extratos (10 mg mL⁻¹) em placas de silicagel. As placas foram eluídas com a fase móvel de AcOEt : MeOH (5:1) e nebulizadas com solução de DPPH 0,05% (em EtOH).

Os extratos de AcOEt das quatro espécies e de MeOH de *Leptolobium* foram selecionados para o fracionamento, por revelarem boa separação de composto com atividade de sequestro de DPPH. A maioria das faixas ativas estavam presentes em ambos os extratos AcOEt e MeOH, diferindo apenas nas suas espessuras. Os extratos dos diferentes espécimes foram unidos para a formação de um extrato único, uma vez que na triagem não houve diferença entre eles. Desse modo, foram conferidas as seguintes siglas às espécies: **aCop**, **aLep**, **aEry**, **aSal** e **mLep**.

Foram depositados em placas de silicagel preparativa, 15 mg dos novos extratos, isolando uma pequena faixa no canto esquerdo para a nebulização com DPPH. A fase móvel foi a mesma utilizada na CCD analítica. Foram recolhidas três frações de **aCop**, duas de **aLep**, duas de **aEry**, duas de **aSal** e uma de **mLep**. As frações foram numeradas em ordem decrescente de fator de retenção. Foi utilizado MeOH e aquecimento para eluição das faixas obtidas.

3. RESULTADOS

3.1. Rendimento

Com a finalização das extrações com os solventes *n*-hexano (Hex), diclorometano (DCM), acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH) foi calculado o rendimento apresentado na Tabela 2, expresso em gramas de extrato obtido em 100 g de amostra, também podendo ser expresso em porcentagem (%). O

desvio padrão foi calculado com base na massa dos extratos dos espécimes de cada espécie, sendo três espécimes de *S. convallariodora* (**S1**, **S2** e **S3**), três de *C. langsdorffii* (**C1**, **C2** e **C3**), três de *L. elegans* (**L1**, **L2** e **L3**) e dois de *E. suberosum* (**E1** e **E2**). Com esse cálculo é possível observar que a *Copaifera* apresentou a maior massa de extrativos dentre as espécies, seguida do *Leptolobium*. Dessa massa total, a maior parte do material extraído de *Copaifera* foi de compostos mais polares (extratos de AcOEt e MeOH), representando cerca de 94% da massa total obtida (Tabela 3). As extrações metanólicas em geral obtiveram maior rendimento, com exceção do *Erythroxylum*, que obteve maior massa com diclorometano. *Erythroxylum* foi a única espécie com maior porcentagem de substâncias apolares.

Tabela 2. Rendimento médio dos extratos de hexano (Hex), diclorometano (DCM), acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH).

	Hex ^a	DCM ^a	AcOEt ^a	MeOH ^a	Total ^a
<i>S. convallariodora</i>	0,51 ± 0,07	1,16 ± 0,17	0,76 ± 0,24	1,54 ± 0,48	3,97 ± 0,56
<i>C. langsdorffii</i>	0,15 ± 0,01	1,69 ± 0,26	13,01 ± 1,23	14,73 ± 0,5	29,58 ± 1,45
<i>L. elegans</i>	0,42 ± 0,03	2,23 ± 0,47	1,26 ± 0,3	8,12 ± 1,7	12,04 ± 2,5
<i>E. suberosum</i>	1,32 ± 0,19	1,96 ± 0,14	0,78 ± 0,08	1,42 ± 0,18	5,49 ± 0,23

^a Valores expresso em gramas de extrato obtido em 100 gramas de material utilizado.

Tabela 3. Porcentagem de extrativos apolares (extratos de hexano e diclorometano) e polares (extratos de acetato de etila e metanol) em relação à massa total de extratos obtida por amostra.

	Apolares	Polares
<i>S. convallariodora</i>	42%	58%
<i>C. langsdorffii</i>	6%	94%
<i>L. elegans</i>	22%	78%
<i>E. suberosum</i>	60%	40%

A massa total dos extratos de AcOEt de *S. convallariodora* não foi suficiente para a realização de todos os testes sendo necessária uma segunda extração. A segunda extração envolveu a mistura de todo material de casca restante dos três espécimes, obtendo-se rendimento de 0,58 g com AcOEt.

Os extratos foram nomeados a partir do solvente de extração – Hex (**h**), DCM (**d**), AcOEt (**a**) e MeOH (**m**) –, seguido da sigla do espécime (anotados na Tabela 1). A segunda extração de *Salvertia* recebeu a sigla **Sal**.

3.2. Ensaios

3.2.1. Atividade antioxidante – DPPH

Os resultados de atividade antioxidante obtidos dos ensaios em microplaca pela metodologia de sequestro do radical DPPH foram compilados na forma de IC50. Isso significa que o valor anotado é a concentração necessária do extrato para que seja atingido 50% de sua atividade. Os valores estão expressos em massa (μg) de extrato/padrão depositado no poço. Para uma maior confiança, os ensaios foram realizados em triplicata e as retas de regressão foram construídas utilizando a média dos três valores, com exclusão de *outliers*. Todas as curvas apresentaram alto coeficiente de determinação, com valores de R^2 entre 0,99 e 0,96, a grande maioria superior a 0,98. As curvas de atividade dos extratos de MeOH, AcOEt e DCM, dos espécimes das quatro espécies, estão apresentados na Figura 2.

Para a determinação da atividade dos extratos de DCM foi necessária uma enorme concentração de amostra (exceto *Leptolobium*), o que refletiu na grande disparidade de atividade entre os espécimes de *Salvertia* e *Copaifera*. A quercetina, utilizada como padrão (Figura 3), apresentou IC50 de 2,4 μg ($R^2=0,986$).

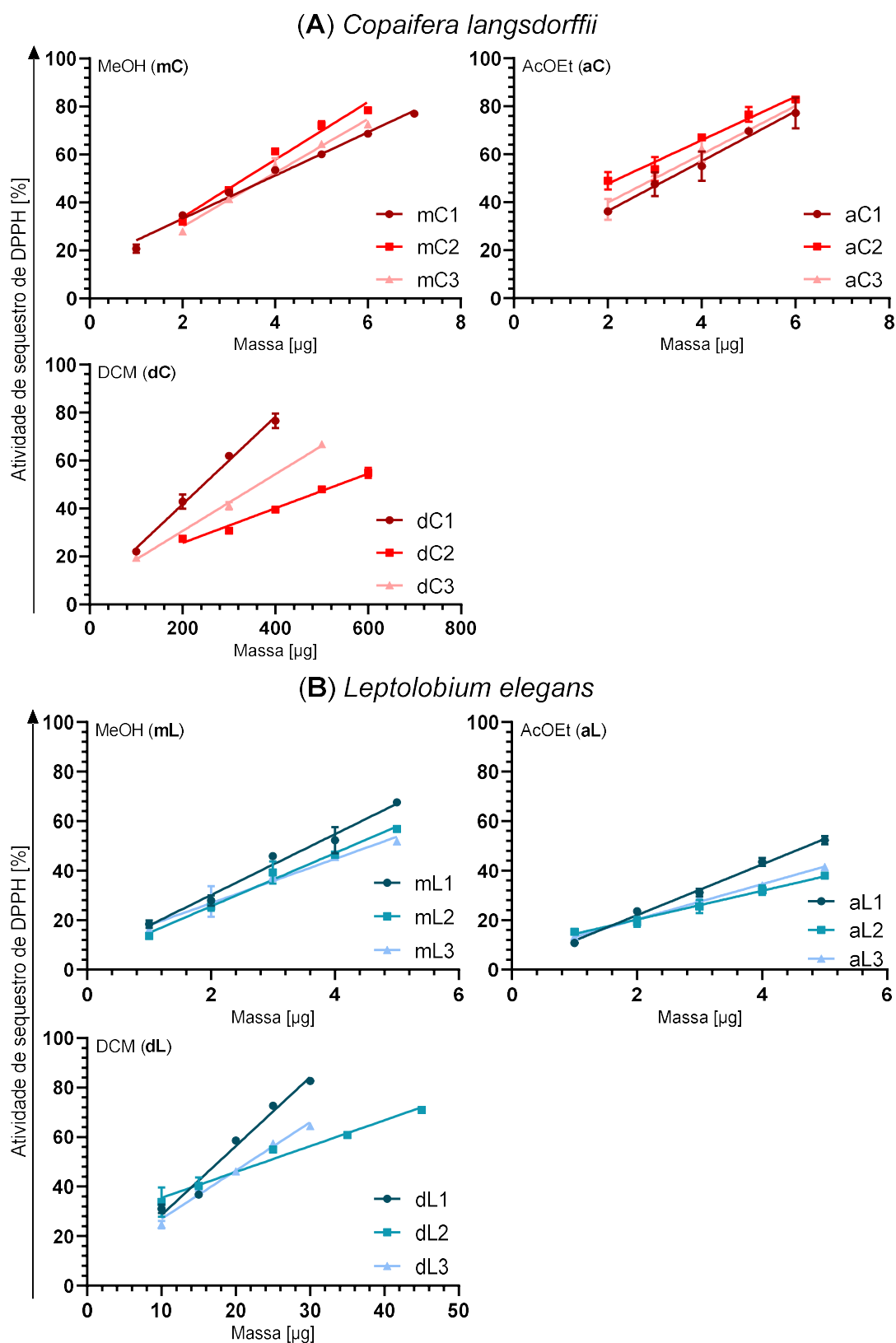


Figura 2. Gráficos de dispersão da atividade sequestradora de DPPH (%) por massa (µg) dos extratos de MeOH, AcOEt e DCM dos espécimes de (A) *Copaifera langsdorffii*, (B) *Leptolobium elegans*, (C) *Salvertia convallariodora* e (E) *Erythroxylum suberosum*.

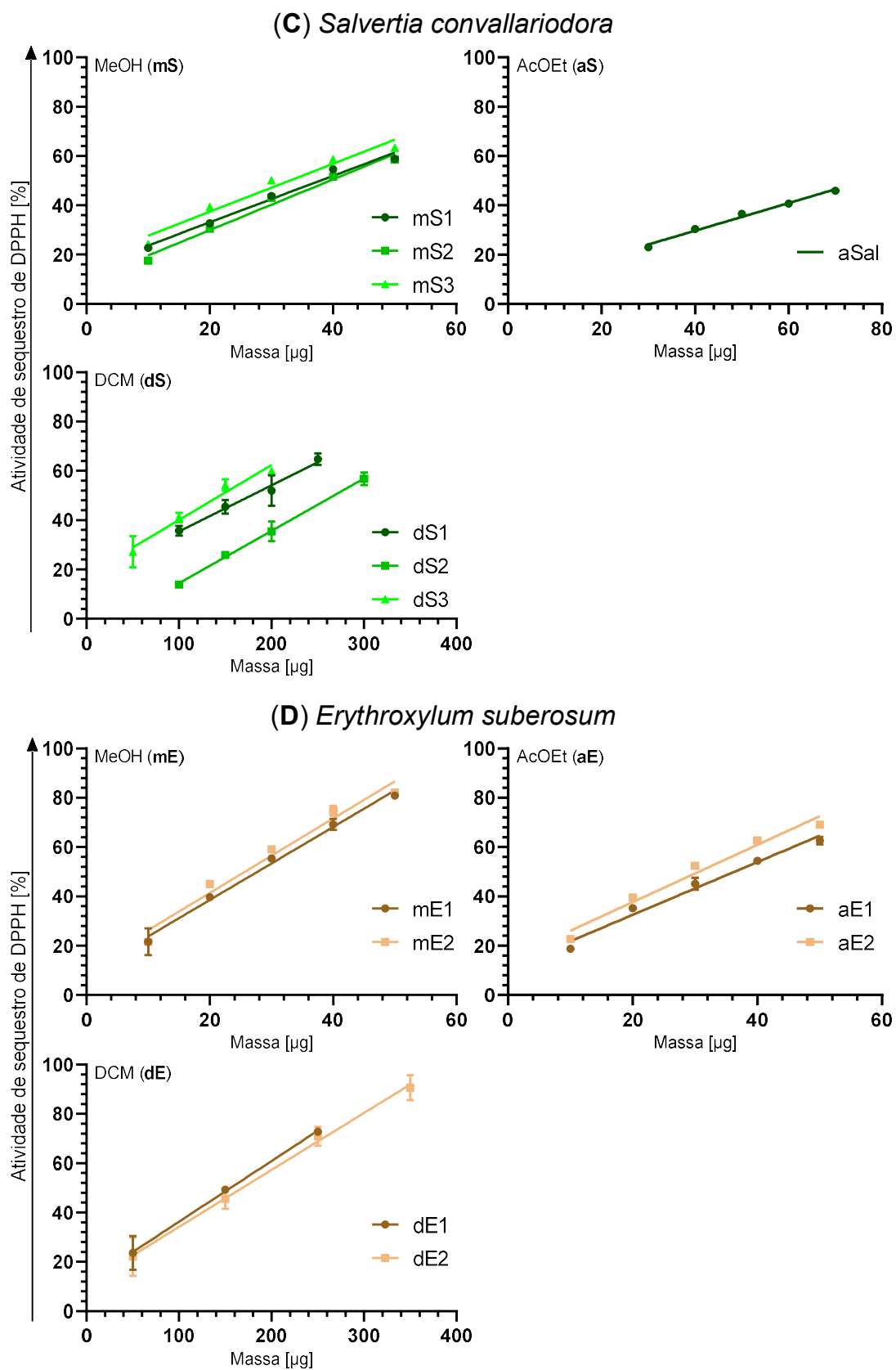


Figura 2. Continuação

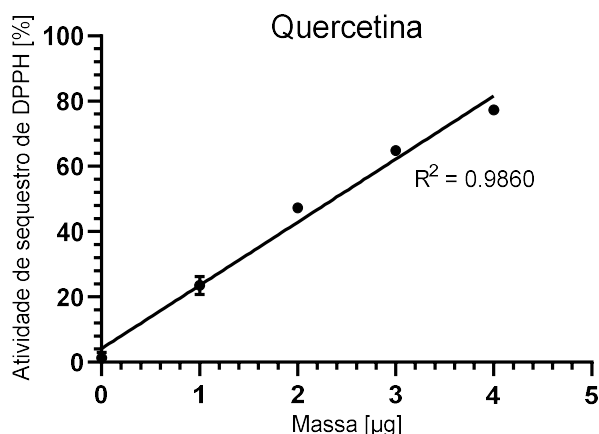


Figura 3. Gráfico de dispersão da atividade sequestradora de DPPH (%) por massa (μg) de quercetina. Coeficiente de determinação (R^2) indicado abaixo da reta de regressão.

Das quatro espécies selecionadas apenas duas apresentam uma boa atividade antioxidante. *C. langsdorffii* se mostrou extremamente promissora, alcançando valores inferiores à quercetina, com IC_{50} de $2,25 \mu\text{g}$ no extrato **aC2** (Figura 4). Além da *Copaifera*, *L. elegans* também mostrou ótima atividade, obtendo inclusive atividade sequestradora de DPPH no extrato DCM superior aos extratos polares das outras duas espécies (Figura 4, Tabela 4). Essa espécie foi a única em que os extratos DCM tiveram boa atividade. Dos extratos hexânicos, apenas com *L. elegans* ocorreu variação de cor na solução de DPPH, porém a atividade não pôde ser medida devido à formação de precipitado, interferindo na leitura das absorbâncias pelo equipamento. Embora as espécies citadas acima apresentaram alta atividade antioxidante, o extrato **aC2** (o mais promissor de *C. langsdorffii*) foi 38% mais eficiente que o melhor resultado de *Leptolobium* (extrato **mL1** com IC_{50} de $3,6 \mu\text{g}$).

Quando comparadas as atividades entre os extratos de uma mesma espécie, vemos que DCM teve atividade não significativa (novamente, exceto *Leptolobium*) (Tabela 4), resultado esperado, visto que o sequestro de DPPH está associado à presença de hidroxilas no anel aromático dos constituintes. Os extratos MeOH se mostraram mais ativos, exceto em *Copaifera*, em que os extratos de AcOEt foram mais promissores. Ainda que os extratos metanólicos de *C. langsdorffii* tenham sido menos eficientes que os de AcOEt, tiveram maior atividade que as outras espécies.

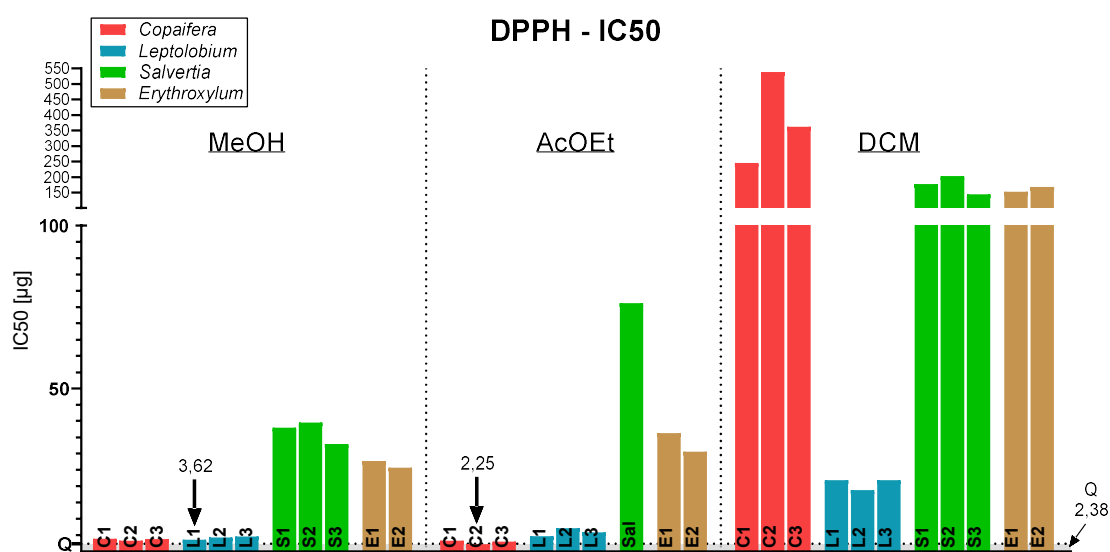


Figura 4. Gráfico de massa (μg) necessária dos extratos de MeOH, AcOEt e DCM, para alcançar 50% de atividade de sequestro do radical DPPH. Setas indicam melhores valores obtidos para as duas espécies mais ativas – *Copaifera langsdorffii* e *Leptolobium elegans* – e para quercetina (Q).

Tabela 4. Atividade antioxidante média das espécies, determinada pela metodologia de sequestro do radical DPPH.

	MeOH ^a	AcOEt ^a	DCM ^a
<i>C. langsdorffii</i>	3,7 ± 0,3	2,87 ± 0,6	382,2 ± 148,1
<i>L. elegans</i>	4,2 ± 0,5	5,89 ± 1,2	20,8 ± 1,7
<i>S. convallariodora</i>	36,8 ± 3,4	76,2*	175,3 ± 29,6
<i>E. suberosum</i>	26,7 ± 1,4	33,5 ± 4	160,7 ± 11,1

^a Valores de IC50 expressos em μg ; * Valor obtido a partir de um único extrato, não havendo desvio padrão.

3.2.2. Atividade antioxidante – ORAC

A capacidade de absorção de radicais de oxigênio, em relação à massa (μg) depositada no poço, de cada extrato – MeOH, AcOEt, DCM e Hex –, para cada espécime, está ilustrada na Figura 5. Numericamente, o resultado do ensaio ORAC está expresso de duas maneiras distintas: (a) A primeira, e mais utilizada, foi calculada a partir da equação da reta de regressão da atividade do Trolox (Figura 6) e está expressa em equivalentes de Trolox (μg) em 100 μg de extrato ($\mu\text{g ET } 100 \mu\text{g}^{-1}$): (b) A segunda, foi obtida a partir do cálculo de EC50.

Para esse cálculo foi assumida a maior *AC* (vide materiais e métodos) encontrada para o Trolox como referência para 100% de atividade. O valor anotado é a massa necessária do extrato para que seja atingido 50% de sua atividade e está expresso em $\mu\text{g } 10^{-1}$ (Figura 7). Resultados promissores, então, são aqueles que apresentam altos valores de (**a**) e baixos valores de (**b**). Os padrões positivos utilizados foram a quercetina ($EC_{50}=0,5 \mu\text{g } 10^{-1}$) e o Trolox ($EC_{50}=1,8 \mu\text{g } 10^{-1}$), sendo o primeiro 3,5 vezes mais ativo que o segundo. Apenas três amostras tiveram coeficiente de determinação inferior a 0,98 – **aC3**, **dC3** e **hC1**. Assim como no ensaio de DPPH, a diferença de atividade entre os espécimes de cada espécie parece ser, normalmente, maior nos extratos apolares.

Nos ensaios de ORAC, *C. langsdorffii* se mostrou, novamente, como a espécie mais promissora. No caso dos extratos MeOH e AcOEt, a massa necessária para atingir 50% de atividade foi semelhante ao Trolox. Os extratos de AcOEt foram levemente mais ativos que os metanólicos, em especial **aC1**, com EC_{50} ($1,5 \mu\text{g } 10^{-1}$) inferior ao Trolox (Figuras 5 e 7). As demais espécies mostraram uma boa atividade dos extratos polares, e, com exceção da *Salvertia*, os extratos de AcOEt mostraram melhor capacidade de absorção de radicais oxigenados (Figura 7; Tabela 5). Depois da *Copaifera*, *S. convallariodora* obteve o segundo melhor resultado, com destaque para **mS3** com EC_{50} de $3,3 \mu\text{g } 10^{-1}$. Porém apenas os extratos metanólicos da espécie tiveram melhor desempenho e, ainda assim, foram cerca de 50% menos ativos que a *Copaifera* (Figura 7; Tabela 5). Comparando a média das atividades dos extratos polares dos espécimes de *L. elegans* e *E. suberosum*, ambos tiveram resultados bastante semelhantes, porém também apresentaram alto desvio padrão, p.e. **mL3** (3,9) e **mL2** (5,8) ou **aE2** (3,8) e **aE1** (5,5) (Tabela 5). Entre os extratos apolares, com exceção de *Copaifera*, os extratos de DCM foram muito mais ativos que hexânicos. Extratos de DCM de *Leptolobium* tiveram os melhores resultados entre os apolares (Figuras 5 e 7; Tabela 5).

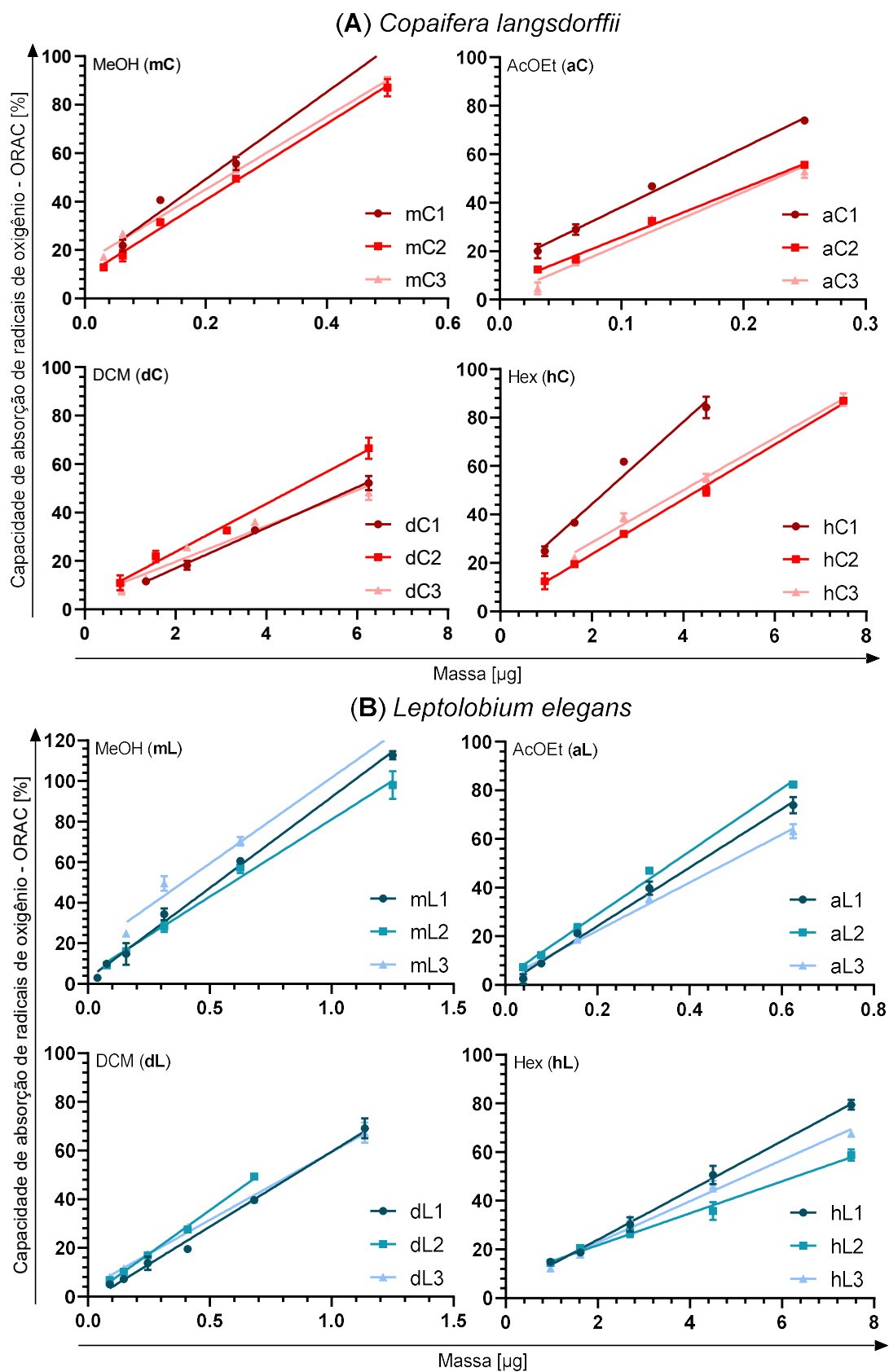


Figura 5. Gráficos de dispersão da capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC) (%) por massa (μg) dos extratos de MeOH, AcOEt, DCM e Hex de **(A)** *Copaifera langsdorffii*, **(B)** *Leptolobium elegans*, **(C)** *Salvertia convallariodora* e **(E)** *Erythroxylum suberosum*.

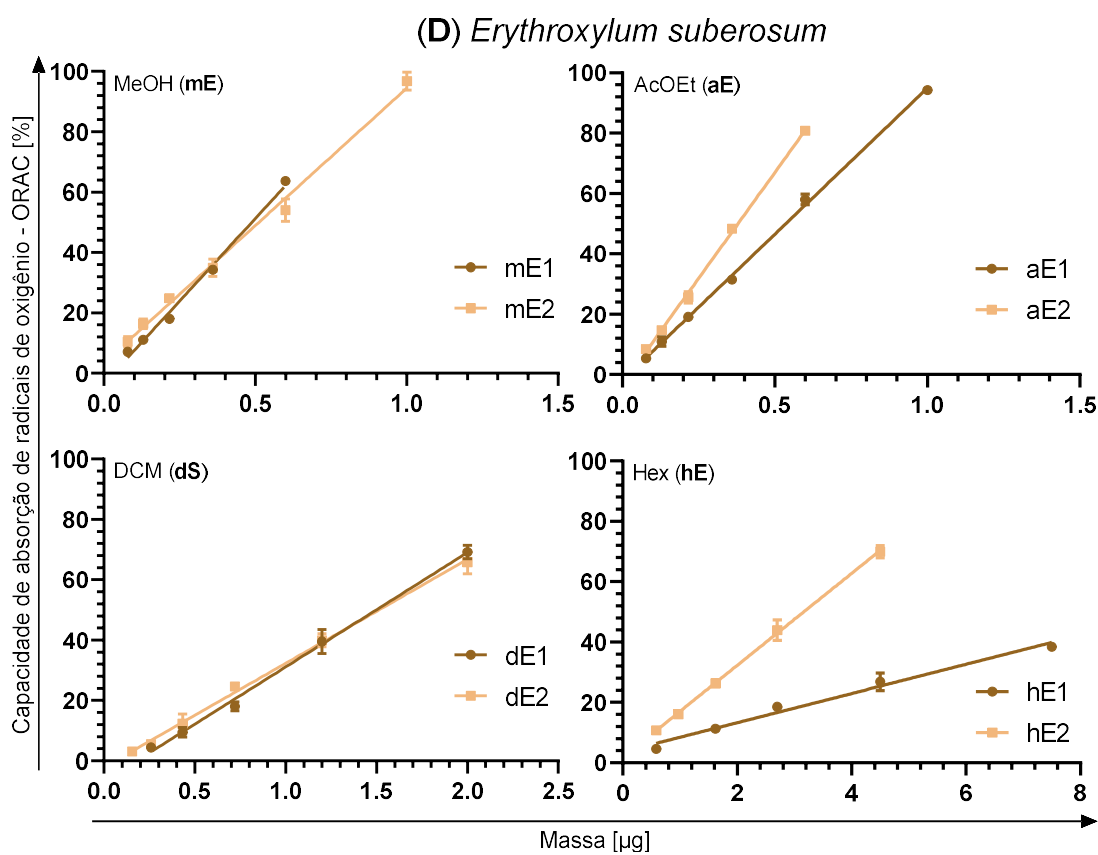
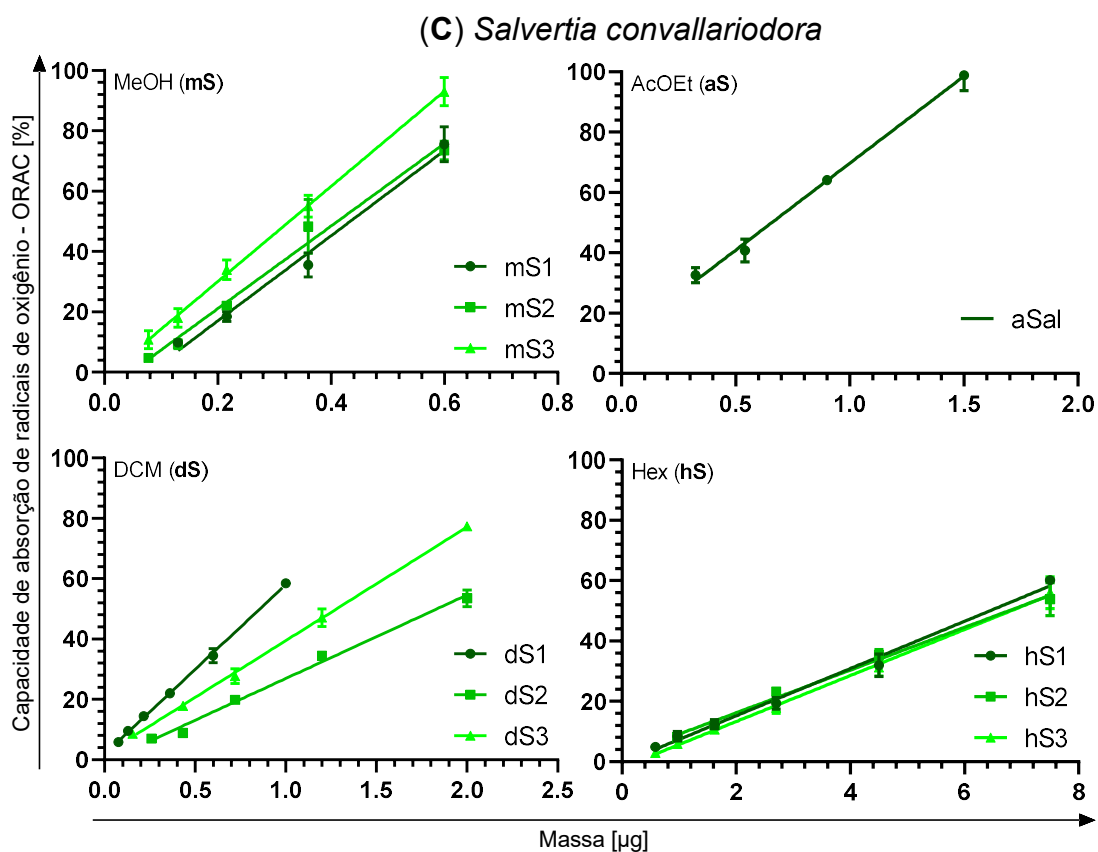


Figura 5. Continuação

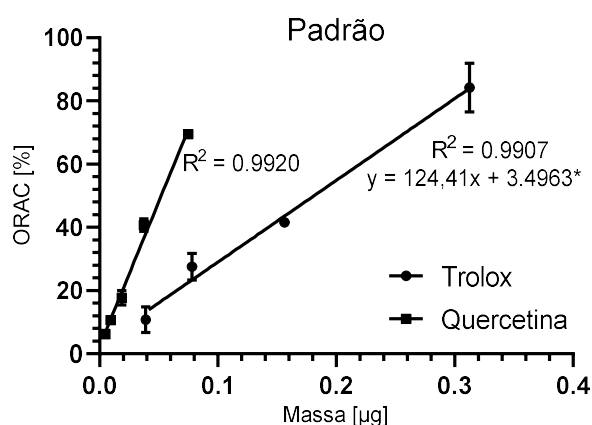


Figura 6. Gráfico de dispersão da capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC) (%) por massa (μg) dos padrões Trolox e quercetina. Os valores de Trolox obtidos após o início da estabilização da curva (cerca de $0,5 \mu\text{g}$) não foram plotados. Estão anotados os coeficientes de determinação de cada reta (R^2). * Equação da reta de regressão anotada e utilizada para o cálculo de equivalentes de Trolox provém da relação da massa utilizada com a área abaixo da curva (AC) obtida.

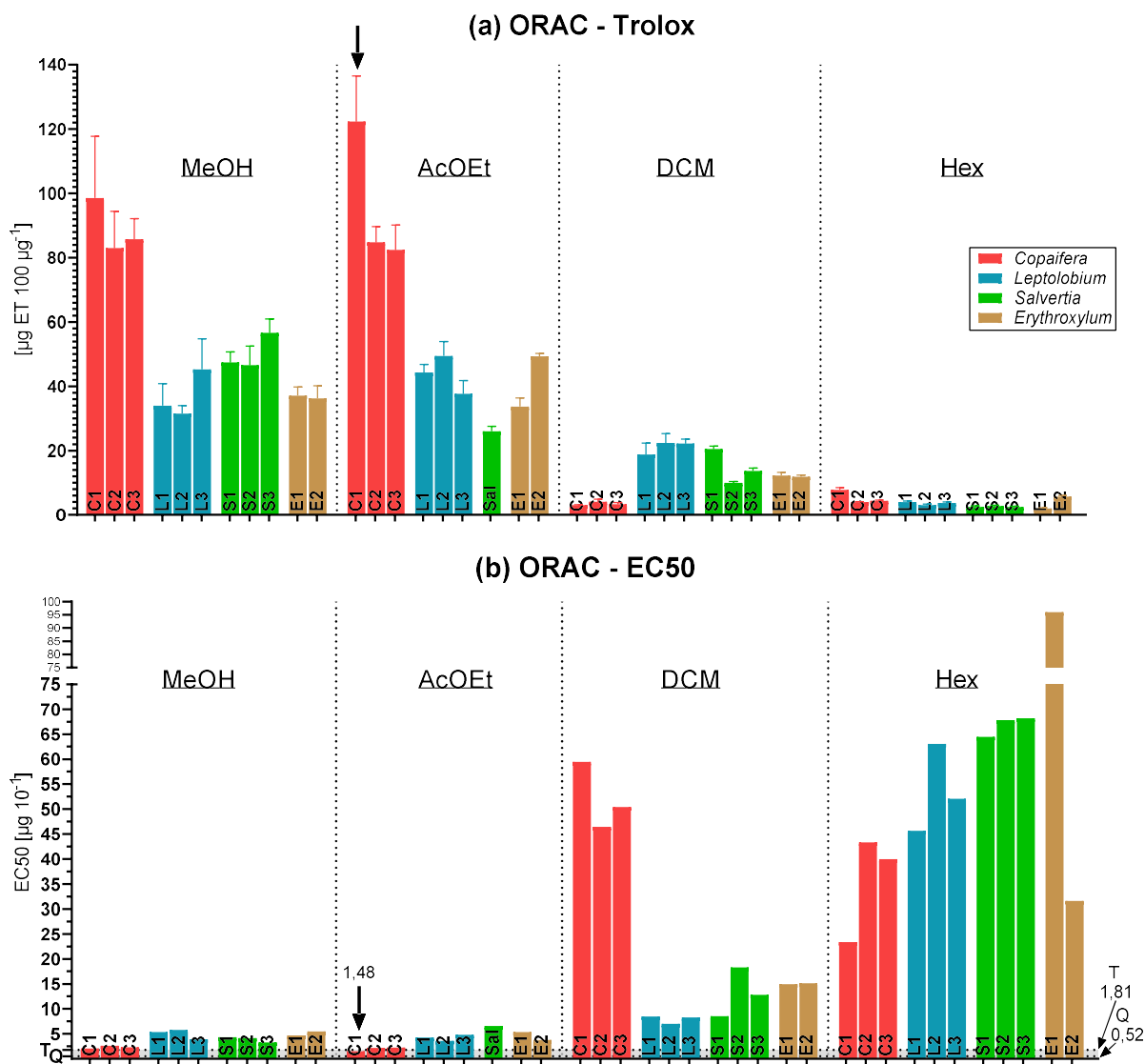


Figura 7. Gráfico de capacidade de absorção de radicais oxigenados dos extratos de MeOH, AcOEt, DCM e Hex determinada por (a) equivalentes de Trolox (μg) em 100 μg de extrato ($\mu\text{g ET } 100 \mu\text{g}^{-1}$); e (b) massa necessária para atingir 50% de atividade ($\mu\text{g } 10^{-1}$). Setas indicam melhores valores alcançados no ensaio (aC1) e EC50 obtido para quercetina (Q) e Trolox (T).

Tabela 5. Atividade antioxidante média dos extratos de cada espécie pela metodologia ORAC.

	^a $\mu\text{g ET } 100 \mu\text{g}^{-1}$				^b $\mu\text{g } 10^{-1}$			
	MeOH	AcOEt	DCM	Hex	MeOH	AcOEt	DCM	Hex
<i>C. langsdorffii</i>	89,0 \pm 8,4	96,7 \pm 22,8	3,5 \pm 0,5	5,4 \pm 2,1	2,3 \pm 0,3	2,0 \pm 0,4	52,1 \pm 6,7	35,5 \pm 10,7
<i>L. elegans</i>	36,8 \pm 7,4	43,7 \pm 5,9	20,7 \pm 2,1	3,5 \pm 0,5	5,0 \pm 1	4,2 \pm 0,6	8,3 \pm 1,2	53,6 \pm 8,8
<i>S. convallariodora</i>	50,1 \pm 5,4	26,1*	14,5 \pm 5	2,5 \pm 0,2	3,9 \pm 0,6	6,6*	13,5 \pm 4,6	69,1 \pm 1,6
<i>E. suberosum</i>	35,9 \pm 0,4	40,6 \pm 10,8	11,9 \pm 0,4	3,9 \pm 2,6	5,2 \pm 0,3	4,7 \pm 1,2	15,3 \pm 0,5	63,8 \pm 45,5
Quercetina		333,4					0,5	
Trolox		100					1,8	

^a Atividade calculada a partir da equação da reta de regressão do Trolox, expressa em equivalentes de Trolox em 100 μg de extrato ($\mu\text{g ET } 100 \mu\text{g}^{-1}$); ^b Cálculo de EC50, expresso em $\mu\text{g } 10^{-1}$; * valor obtido a partir de um único extrato, não havendo desvio padrão.

3.2.3. Atividade antiacetilcolinesterásica

Para a obtenção da porcentagem da atividade de inibição da enzima acetilcolinesterase foi feita uma triagem inicial com todos os extratos em altas concentrações (2 e 3 mg mL^{-1}). Entretanto, nenhum dos 42 extratos se mostrou ativo. A falta de atividade observada não pode ser atribuída a erros no procedimento, uma vez que o controle positivo foi ativo sob as mesmas condições e reagentes.

Os ensaios de atividade antiacetilcolinesterásica foram repetidos com as frações dos extratos obtidas por fracionamento em CCD preparativa, guiado por atividade de sequestro de DPPH. As 10 frações (3 de aCop, 2 de aLep, 2 de aEry, 2 de aSal e 1 de mLep) foram testadas e apenas a fração número 1 de aCop foi ativa (Figura 8).

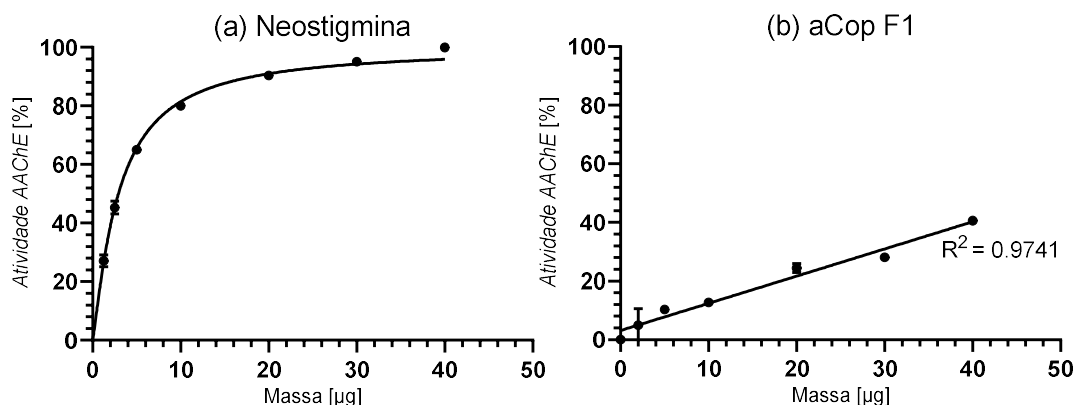


Figura 8. Gráficos da porcentagem de atividade antiacetilcolinesterásica (AChE%) por (a) massa (ng) de Neostigmina e (b) massa (µg) de extrato.

3.2.4. Atividade antimicrobiana

A atividade antibacteriana obtida para cada extrato está compilada na Tabela 6. Esses resultados representam a mínima concentração necessária para que ocorra visivelmente a inibição do crescimento bacteriano (CIM).

Das bactérias testadas, *Bacillus subtilis* apresentou a maior susceptibilidade aos extratos, principalmente em relação a *Copaifera* e *Leptolobium*, com destaque para os extratos mais polares (Tabela 6). Os três extratos hexânicos de *L. elegans* apresentaram variação entre os espécimes contra *B. subtilis*. Diferentemente das duas espécies citadas, os extratos Hex de *E. suberosum* foram mais ativos contra a bactéria (Tabela 6).

A inibição do crescimento de *Escherichia coli* foi observada apenas nos extratos de DCM de *Copaifera* e *Erythroxylum* na mais alta concentração testada (Tabela 6). De uma forma geral, contra *Pseudomonas aeruginosa* os extratos de DCM se mostraram mais ativos e a espécie *E. suberosum* foi a mais promissora (Tabela 6). Ocorreu certa variação na inibição do crescimento de *P. aeruginosa* frente a extrações de diferentes indivíduos de uma mesma espécie, especialmente quando comparados **aE1** e **aE2**. Esses foram os mais ativos contra a bactéria, com destaque para o segundo (Tabela 6). *S. convallariodora* demonstrou o menor potencial de ação contra as três bactérias (Tabela 6).

Tabela 6. Concentração inibitória mínima (CIM), em $\mu\text{g mL}^{-1}$, dos extratos necessária para inibir o crescimento das bactérias *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*. (-) ausência de atividade inibitória.

Espécie	Amostra ^a	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
<i>Copaifera langsdorffii</i>	mC1	82	-	-
	mC2	82	-	-
	mC3	82	-	-
	aC1	82	-	-
	aC2	82	-	-
	aC3	82	-	-
	dC1	329	2632	1316
	dC2	329	2632	1316
	dC3	329	2632	2632
	hC1	82	-	-
	hC2	164	-	-
	hC3	164	-	658
<i>Leptolobium elegans</i>	mL1	82	-	-
	mL2	82	-	-
	mL3	82	-	-
	aL1	164	-	-
	aL2	164	-	1316
	aL3	164	-	1316
	dL1	329	-	1316
	dL2	329	-	2632
	dL3	329	-	-
	hL1	329	-	-
	hL2	164	-	-
	hL3	658	-	2632
<i>Salvertia convallariodora</i>	mS1	-	-	-
	mS2	-	-	-
	mS3	-	-	-
	aSal	329	-	-
	dS1	329	-	-
	dS2	329	-	-
	dS3	658	-	2632
	hS1	-	-	-
	hS2	-	-	-
	hS3	-	-	-
<i>Erythroxylum suberosum</i>	mE1	658	-	-
	mE2	658	-	1316
	aE1	329	-	658
	aE2	329	-	≤41
	dE1	658	2632	1316
	dE2	658	2632	1316
	hE1	164	-	-
	hE2	164	-	-
antibiótico	gen	0,2	0,2	0,2

^a Siglas formadas pelo solvente de extração – *n*-hexano (h), diclorometano (d), acetato de etila (a) e metanol (m) –, seguido da sigla da espécie – *C. langsdorffii* (C), *L. elegans* (L), *E. suberosum* (E) e *S. convallariodora* (S) – e número do espécime (1, 2 ou 3). gen: gentamicina.

3.2.5. Doseamento de Fenóis Totais e Taninos

O doseamento de fenóis totais foi feito utilizando o reagente Folin-Ciocalteu e a curva de calibração foi construída a partir do ácido gálico (aG). Para o doseamento de taninos totais foram usadas duas metodologias: PVPP e BSA, e o padrão de ácido tânico (aT) foi utilizado para a construção da curva de calibração. O teor de taninos condensados foi medido pelo método de vanilina-HCl, usando catequina (C) como padrão. As equações das retas de regressão dos padrões, com respectivos coeficientes de determinação (todos superior a 0,99), estão apresentados na Figura 9. Os resultados de cada doseamento estão expressos em mg de equivalentes do respectivo padrão por 100 mg de extrato bruto (p.e. mg EaG 100 mg⁻¹).

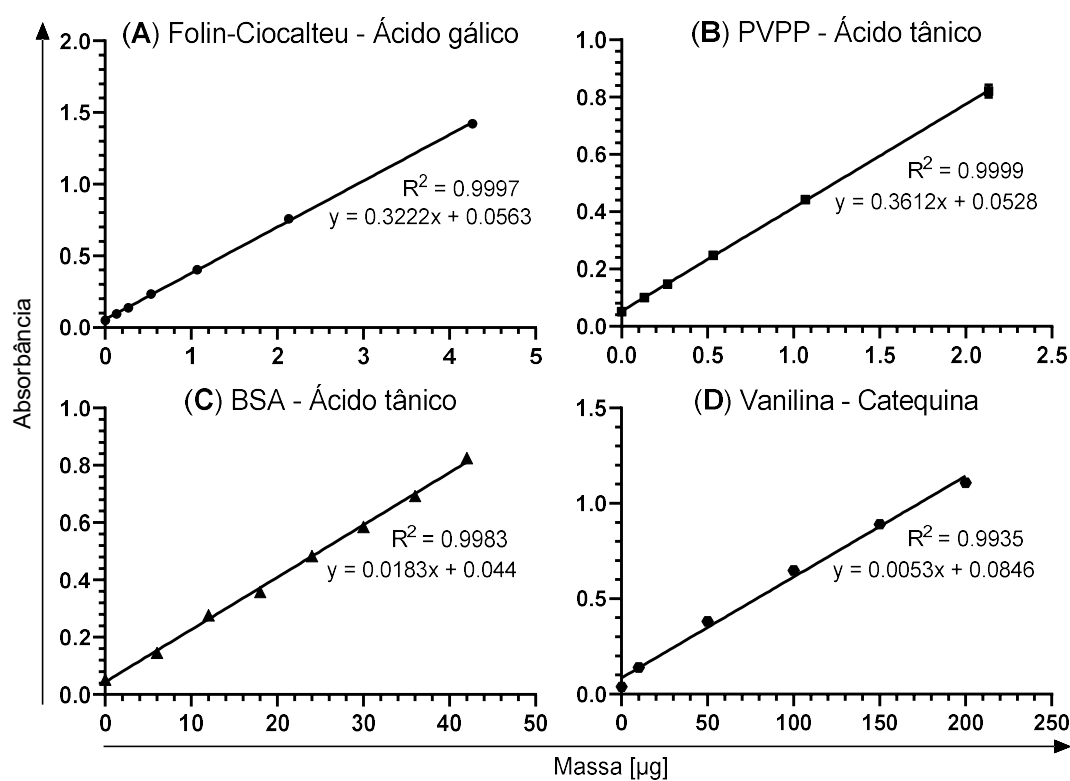


Figura 9. Gráficos de dispersão das absorbâncias por massa (µg). As equações para o cálculo do teor de fenóis totais e taninos (pelas três metodologias distintas) das amostras foram obtidas das curvas de calibração acima. Os padrões utilizados foram: **(A)** ácido gálico para fenóis totais (Folin-Ciocalteu); **(B)** ácido tânico para taninos totais nas metodologias PVPP e **(C)** BSA; **(D)** catequina para taninos condensados (metodologia vanilina). As equações e coeficientes de determinação (R^2) estão plotados nos gráficos.

Os extratos que apresentaram maior teor de fenóis totais e taninos totais foram *C. langsdorffii* e *L. elegans*, porém a primeira possui maior conteúdo,

principalmente de fenóis (Figura 10, Tabela 7). Esses resultados somente diferem no ensaio de BSA com os extratos AcOEt (Tabela 7). O doseamento por vanilina-HCl indica que somente os extratos de *Leptolobium* apresentam alto teor de taninos condensados, embora houve uma grande diferença nesse teor entre os três espécimes (Figura 10). A sensibilidade do ensaio de vanilina-HCl foi insuficiente para o cálculo de taninos condensados nos extratos de *Erythroxyllum* e **aSal**, dada sua baixa concentração nessas amostras. De maneira geral, os extratos metanólicos apresentaram maior concentração de fenóis e taninos, com exceção dos extratos de AcOEt de *Copaifera* (PVPP) e *Salvertia* (BSA) (Figura 10, Tabela 7).

Em *C. langsdorffii*, a diferença nos doseamentos dos extratos polares foi pequena entre os dois solventes, com exceção da metodologia BSA, em que AcOEt apresentou teor 38% menor que MeOH (Figura 10).

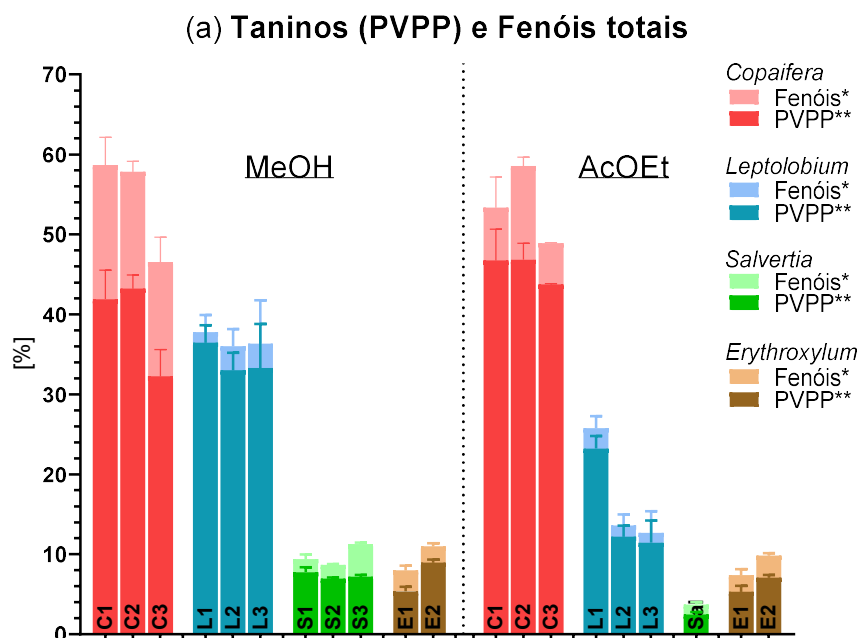


Figura 10. Gráficos de doseamento de teor de taninos e fenóis totais. (a) taninos totais determinado por PVPP em relação ao teor de fenóis totais (Folin-Ciocalteu); * Valores expressos em mg EaG 100 mg⁻¹ de extrato; ** Valores expressos em mg EaT 100 mg⁻¹ de extrato. (b) taninos totais determinados por precipitação com BSA e (c) taninos condensados pelo método vanilina-HCl, expressos em mg EC 100 mg⁻¹ de extrato.

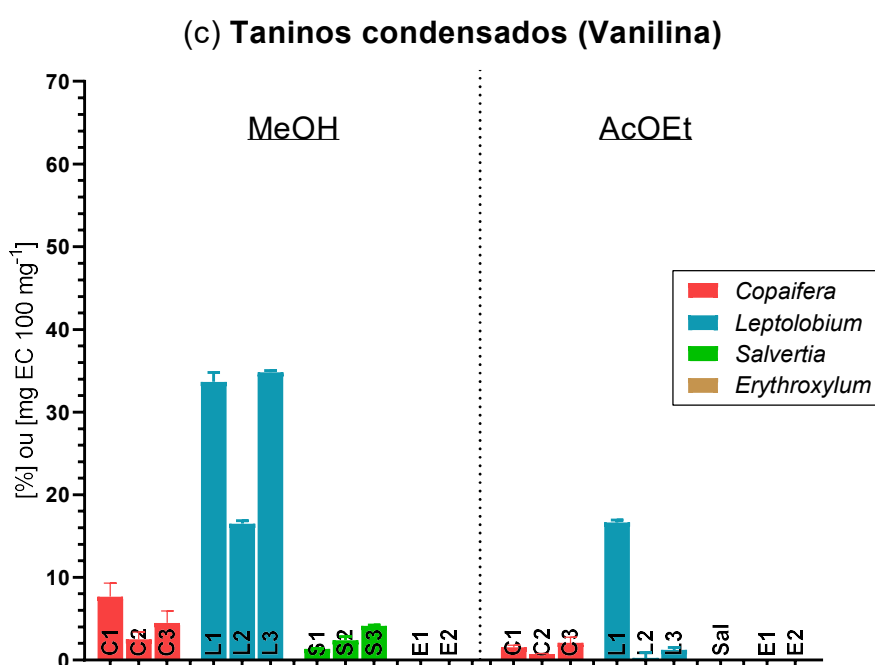
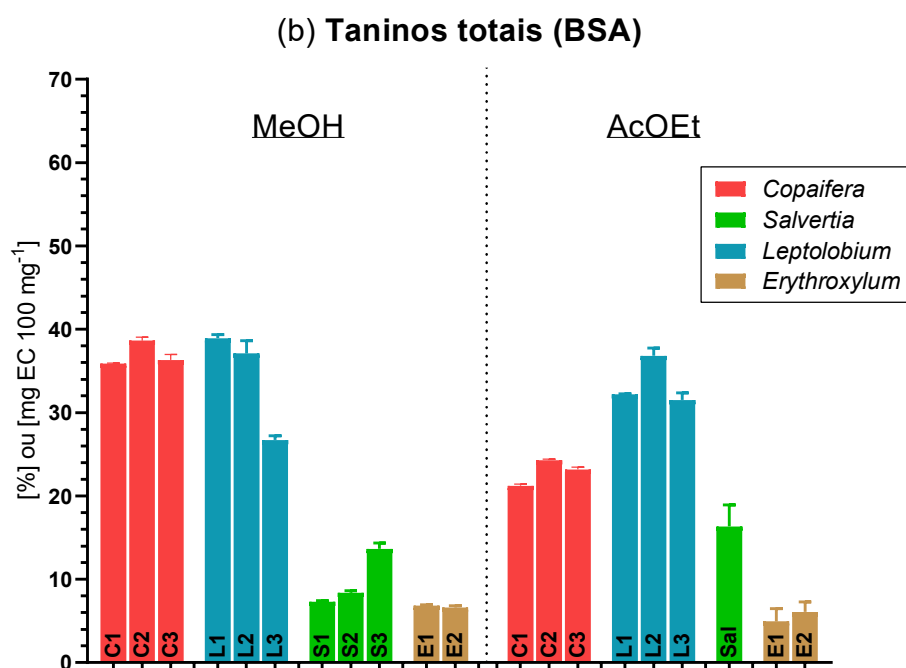


Figura 10. Continuação.

L. elegans, por sua vez, apresentou teores bastante distintos entre os dois solventes (mais que o dobro nos extratos metanólicos) pelas metodologias F-C (fenóis) e PVPP (taninos). Os resultados do ensaio com BSA foram semelhantes entre os extratos de AcOEt e MeOH dessa espécie, exceto **mL3** com valores inferiores (Figura 10).

Para *S. convallariodora*, os valores obtidos por F-C e PVPP foram, respectivamente, cerca de 2,6 e 3 vezes maiores nos extratos metanólicos (Figura 10). O resultado de **aSal** obtido por BSA foi inesperadamente alto (Figura 10), e será mais debatido na discussão. Os teores de fenóis e taninos totais de *E. suberosum* foram moderadamente maiores para MeOH (Figura 10).

Se comparados os resultados de ambas as metodologias para doseamento de taninos totais, o que se observou foi que *Copaifera* e *Erythroxylum* apresentaram valores superior para PVPP, enquanto *Leptolobium* mostrou valores semelhantes, embora com desvio padrão maior em BSA no extrato metanólico e maiores em AcOEt, e *Salvertia* apresentou valores maiores em BSA. Para esta espécie, inclusive, os resultados indicam maior teor de taninos que de fenóis (Figura 10, Tabela 6).

Tabela 6. Tabela dos teores de fenóis totais (Folin-Ciocalteu), taninos totais (PVPP e BSA) e taninos condensados (vanilina) médio para cada espécie.

	MeOH				AcOEt			
	F-C ^a	PVPP ^b	BSA ^c	Van ^d	F-C ^a	PVPP ^b	BSA ^c	Van ^d
<i>C. langsdorffii</i>	54,3±6,8	39,1±6,0	36,9±1,5	4,9±2,6	51,5±8,2	43,6±5,5	22,9±1,6	1,5±0,7
<i>L. elegans</i>	36,7±0,9	34,3±1,9	34,3±6,6	28,3±10,3	17,3±7,3	15,6±6,6	33,5±2,9	6,0±9,2
<i>S. convallariodora</i>	9,8±1,3	7,3±0,4	9,8±3,4	2,6±1,4	3,7*	2,4*	16,3*	-
<i>E. suberosum</i>	9,5±2,1	7,2±2,5	6,8±0,2	-	8,6±1,7	6,2±1,2	5,5±0,8	-

(-) Teor de tanino insuficiente para a detecção pelo método; ^aValores expressos em mg EaG 100 mg⁻¹ de extrato; ^bValores expressos em mg EaT 100 mg⁻¹ de extrato; ^cValores expressos em mg EC 100 mg⁻¹ de extrato; * valor obtido a partir de um único extrato, não havendo desvio padrão.

4. DISCUSSÃO

4.1. *Copaifera langsdorffii*

Dentre as espécies trabalhadas, *Copaifera langsdorffii* se mostrou a espécie mais promissora, tanto em relação ao rendimento dos seus extratos (Tabela 2) quanto a suas atividades biológicas (Figuras 4, 5, 7; Tabela 6). Apesar dos ensaios para atividade de inibição da enzima acetilcolinesterase com os extratos brutos da maioria das espécies terem sido negativos, a fração 1 de **aCop** apresentou atividade inibitória (Figura 8). Penido *et al.* (2017), também obteve, por maceração de *C. langsdorffii* em etanol 70%, atividade anticolinesterásica do extrato, por cromatografia em camada delgada. Os dados do presente trabalho, comprovam, portanto, a presença de metabólitos bioativos na casca de *C. langsdorffii* para a inibição da AChE, embora aparentemente, estes não sejam majoritários. Em relação às extrações, a porcentagem de extrativos na casca da *Copaifera* foi excelente para uma amostra de casca, representando quase 30% da massa de material utilizado (Tabela 2). Houve uma certa semelhança entre a quantidade de substâncias polares (94%) de *Copaifera* obtida no presente trabalho e o de Carmo *et al.* (2016), que obtiveram 90% de substâncias polares em seu estudo. Segundo os autores, essa quantidade foi justificada como sendo decorrência da deposição de compostos fenólicos em células, quando observadas em cortes anatômicos. A atividade antioxidante (sequestro de DPPH) dos extratos em etanol-água também tiveram IC50 bastante semelhantes às substâncias padrão utilizadas por Carmo *et al.* (2016), com IC50 dos extratos de 3,95 $\mu\text{g mL}^{-1}$, frente a 2,71 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 5,39 $\mu\text{g mL}^{-1}$ do Trolox e catequina, respectivamente; novamente corroborando com os resultados do presente trabalho.

Quanto à composição química, extratos hidrofílicos (acetato de etila e metanol) de *Copaifera* mostraram alto teor fenólico (cerca de 50%), se tratando boa parte de taninos, principalmente nos extratos metanólicos (cerca de 37%, de acordo com o ensaio BSA) (Figura 10). O conteúdo fenólico total encontrado por Carmo *et al.* (2016), foi de 58,9 mg de equivalente de ácido gálico em 100 mg de

extrato, valores bastante semelhantes a **mC1** (58,6 mg EaG 100 mg⁻¹ de extrato) e **aC2** (58,5 mg EaG 100 mg⁻¹ de extrato). No conteúdo de taninos condensados, a maior semelhança entre os dois trabalhos foi com **mC3**, que apresentou 4,5 mg de equivalentes de catequina por grama de extrato (Figura 10), comparado aos 5,48 mg EC 100 mg⁻¹ de extrato obtido por Carmo *et al.* (2016).

A literatura de *Copaifera langsdorffii* relata alto teor de fenólicos em extratos de folha, dos quais foram identificados os flavonoides quercetrina e afzelina e derivados de ácido galoilquínico (Alves *et al.* 2013; Nogueira *et al.* 2015). O principal componente obtido de extratos etanólicos da polpa de *C. langsdorffii* foi o ácido gálico (Batista *et al.* 2016). Um estudo realizado com extratos de folhas, galhos e casca de *Copaifera multijuga* (Oliveira *et al.* 2019), expõe uma grande diferença entre o perfil metabólico das folhas e galhos em relação a casca. Nesse trabalho, a composição dos extratos metanólicos dos dois primeiros foi essencialmente ácido quínico e derivados de ácido galoilquínico, nenhum dos quais foi detectado na casca. Do extrato de casca foram obtidos os taninos condensados epicatequina-(4β-8)-epiafzelequina (dímero) e epicatequina-(4β-8)-epiafzelequina-(4β-8)-epiafzelequina (trímero). Em outro estudo foram obtidos dois taninos condensados adicionais (um tetrâmero e um pentâmero) na casca de *C. multijuga*. Extratos de casca dessa espécie possuem propriedades antioxidantes e de redução do estresse oxidativo e efeito antineoplásico em células tumorais de Ehrlichin, ambos testados *in vitro* e *in vivo*. Essas atividades foram atribuídas ao alto conteúdo fenólico, principalmente taninos (Pereira *et al.* 2018; Cunha *et al.* 2019), ideia esta que corrobora as expectativas do presente trabalho. O alto poder antioxidante (nos ensaios DPPH e ORAC) (Tabelas 4 e 5), provavelmente se deve ao fato dos espécimes de *C. langsdorffii* possuírem altas concentrações de fenóis totais e taninos (Tabela 7), além da presença de compostos com ação inibitória da AChE.

Um estudo realizado por Duarte *et al.* (2007) classifica os materiais vegetais de acordo com os resultados de CIM nas seguintes categorias: (1) forte inibidor, com CIM até 500 µg mL⁻¹; (2) inibidor moderado, com CIM entre 600 e 1500 µg mL⁻¹; (3) fraco inibidor, com CIM acima de 1600 µg mL⁻¹. Não foram

encontrados estudos avaliando atividade antibacteriana de extratos da casca de espécies de *Copaifera*. A óleo-resina de *C. langsdorffii*, por sua vez, se mostrou ativa contra *B. subtilis* (Santos *et al.* 2008), *E. coli* e *P. aeruginosa* (Pieri *et al.* 2012). Em um estudo com 27 isolados de *E. coli*, a óleo-resina de *C. langsdorffii* teve ação inibitória em oito (Pieri *et al.* 2011). Masson *et al.* (2013) não obtiveram inibição de *E. coli* e *P. aeruginosa* pela óleo-resina, porém encontraram alta atividade contra bactérias Gram-positivas. Extratos metanólicos de folha e suas frações (Hex, AcOEt e MeOH), também inibiram o crescimento de *B. subtilis* (Oliveira *et al.* 2007). No presente trabalho, de acordo com a classificação de Duarte *et al.* (2007) todos os extratos de *C. langsdorffii* foram fortes inibidores de *B. subtilis*, principalmente os metanólicos, hexânicos e de acetato de etila. Um extrato hexânico (**hC3**) e dois de diclorometano (**dC1 e dC2**) apresentaram moderada ação na inibição do crescimento de *P. aeruginosa*. A inibição de *E. coli* foi fraca e apenas nos espécimes extraídos com diclorometano (Tabela 6).

4.2. *Leptolobium elegans*

Além de *C. langsdorffii*, espécie em que eram esperados bons resultados, devido ao seu amplo uso medicinal e várias atividades biológicas já comprovadas, *Leptolobium elegans* também apresentou bom rendimento (Tabela 2) e atividade antioxidante, principalmente de sequestro de DPPH, do extrato de diclorometano (Tabela 4), além de atividade contra *B. subtilis* e *P. aeruginosa* (Tabela 6). Outras duas espécies do gênero *Leptolobium* – *Leptolobium dasycarpum* e *Leptolobium panamense* –, juntamente com *L. elegans*, são as espécies do antigo gênero *Acosmium*, mais utilizadas, do ponto de vista da medicina popular. Estudos feitos com as três espécies apontam a importância de seus alcaloides (quinolizidínicos) no seu potencial farmacológico, estando intimamente envolvidos em suas, já estudadas, atividades biológicas (Sousa Júnior *et al.* 2009). Dentre as atividades desses alcaloides, está a anticolinesterásica da esparteína (Danieli *et al.* 1999). Entretanto, essa atividade não foi detectada nos extratos do presente estudo. A esparteína já foi isolada da casca do caule de *L. elegans* (Sousa Júnior *et al.* 2009), mas um estudo feito por

Oliveira *et al.* (1994) mostra que teor de alcaloides na espécie é dez vezes menor no caule, quando comparado à raiz.

Os extratos MeOH e AcOEt de *L. elegans* tiveram forte atividade contra *B. subtilis*, de acordo com a classificação de Duarte *et al.* (2007); apenas **hL3** apresentou uma atividade moderada. Entretanto, para *P. aeruginosa*, alguns extratos de AcOEt (**aL2** e **aL3**) e de DCM (**dL1** e **dL2**) foram de moderado a fraco (Tabela 6) em sua atividade. Não foi encontrada literatura a respeito de atividade antimicrobiana de *L. elegans*, porém o gênero ao qual a espécie faz parte já demonstrou alto potencial de atividade antiparasitária, além da presença de alcaloides quinolizidínicos e terpenos lupanos (como lupeol e ácido betulínico) em espécies de *Leptolobium*, que são interessantes antimicrobianos (Sousa Júnior *et al.* 2009). (Sousa Júnior *et al.* 2009). Nenhum dos extratos tiveram atividade contra *E. coli* (Tabela 6).

4.3. *Erythroxylum suberosum*

E. suberosum apresentou baixo conteúdo de fenóis totais em sua casca (Tabela 7) e pouca atividade antioxidante (Tabelas 4 e 5), demonstrando que realmente as substâncias fenólicas têm muito potencial como antioxidantes. Devido à falta de trabalhos com a casca dessa espécie, não foi possível estabelecer uma comparação. Entretanto, são numerosos os trabalhos demonstrando o alto conteúdo fenólico e atividade antioxidante, principalmente associada a rutina, isoquercitrina, quercetina e derivados de catequina de extratos da folha (Rodrigues *et al.* 2015; Lopes 2016; Barros *et al.* 2017).

Os extratos de casca externa de *E. suberosum* tiveram atividade de boa (**aE1** e **aE2**) a moderada (**mE1**, **mE2**, **dE1** e **dE2**) contra *B. subtilis*, com destaque para as extrações em Hex (**hE1** e **hE2**) (Tabela 6). Também foi encontrada boa atividade contra *P. aeruginosa* dos extratos AcOEt, principalmente no de **aE2**, e moderada atividade de DCM e MeOH; o extrato hexânico não teve atividade (Tabela 6). Os extratos de DCM foram fracamente ativos contra *E. coli*. Violante *et al.* (2012) testaram a inibição do crescimento de *E. coli* e *P. aeruginosa* de extratos etanólicos e frações da casca dessa mesma

espécie, em condições semelhantes. Não foi obtida atividade em concentrações igual ou inferiores a 1 mg mL⁻¹, similarmente ao observado com os extratos metanólicos do presente estudo. O trabalho citado obteve boa atividade (0,25 mg mL⁻¹) contra *Staphylococcus aureus*. De Wet (2011) avaliou, também com metodologia semelhante, a atividade antibacteriana de extratos de casca de outras espécies de *Erythroxylum*. Foi obtida alguma atividade contra *E. coli* dos extratos de acetona, metanol e água (4 mg mL⁻¹) de *E. delagoense*, e boa atividade contra *B. subtilis* dos extratos metanólicos (0,5 mg mL⁻¹). Extratos de casca de *E. emarginatum* tiveram pior desempenho, com CIM de 4 mg mL⁻¹ contra *B. subtilis* e 16 mg mL⁻¹ contra *E. coli*. Os extratos de *E. pictum* foram fortemente ativos contra *B. subtilis*, principalmente extrações em acetona (0,5 mg mL⁻¹), e moderadamente contra *E. coli*, com CIM de 1 mg mL⁻¹ do extrato aquoso.

4.4. *Salvertia convallariodora*

São escassas as informações a respeito da química de *Salvertia convallariodora*, e essa carência é agravada quando considerada a casca isoladamente. Do mesmo modo que os extratos de casca do presente estudo, extratos etanólicos de folha apresentaram baixos teores de fenóis totais e de taninos; entretanto, ao contrário dos extratos de casca, foi relatada uma boa atividade antioxidante de sequestro de DPPH nos extratos da folha (de Menezes Filho *et al.* 2019). Tanto o presente estudo, quanto o citado, obtiveram boa capacidade de absorção de radicais oxigenados (ORAC) (Tabela 5). No trabalho citado foi identificada (epi)catequina, 6-gingerol, ácido cumaroilquínico, kaempferol-glicosídeo, procianidina B2, quercetina, quercetina-glicosídeo, quercetina-glicuronídeo, ácido quínico, rutina, sucrose e trigaloilglicose nos extratos etanólicos de folha (de Menezes Filho *et al.* 2019).

Considerando apenas as bactérias testadas, os extratos de casca externa de *Salvertia* não se mostraram promissores inibidores de crescimento bacteriano. Ocorreu forte inibição de *B. subtilis* apenas em **aSal** e **dS1** e **dS2**, e inibição moderada em **dS3**. O último também com fraca inibição de *P.*

aeruginosa (Tabela 6). Na literatura, um único trabalho de atividade antimicrobiana foi realizado com a espécie, em que foi testada a ação de extrações em Hex e AcOEt de madeira e folha contra os protozoários *Plasmodium falciparum*, *Trypanossoma cruzi* e *Trypanossoma brucei*. Somente os extratos hexânicos de folha foram ativos, com ação moderada contra *T. brucei gambiense* (Charneau *et al.* 2016). *Salvertia* é um gênero monotípico, sendo *Vochysia* o gênero filogeneticamente mais próximo. Hess *et al.* (1995) avaliaram a ação dos extratos etanólicos de casca de *Vochysia divergens* contra *E. coli*, porém as cepas foram resistentes nas concentrações testadas.

4.5. Ensaio

C. langsdorffii e *L. elegans*, como já mencionado, possuem extratos com maior conteúdo de fenóis totais (Tabela 7) e são as espécies que apresentaram maior atividade de sequestro de DPPH (Tabela 5). Isso era esperado, dada a natureza do ensaio, que se baseia na transferência de um elétron de um fenol para o DPPH (Huang *et al.* 2005). Essa correlação entre conteúdo de fenóis totais (obtido por Folin-Ciocalteu) e atividade antioxidante, determinada por DPPH, foi muito bem demonstrada por Clarke *et al.* (2013). Essa mesma correlação não foi encontrada entre conteúdo de fenóis e capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC), embora *C. langsdorffii* tenha apresentado tanto o maior conteúdo fenólico, quanto a maior capacidade de absorção de radicais (Tabelas 5 e 7). Extratos metanólicos de *L. elegans* e *E. suberosum* apresentaram valores semelhantes para ORAC, porém a primeira espécie apresentou teor de fenóis totais quase quatro vezes maior que a segunda (Tabelas 5 e 7). Da mesma forma, extratos metanólicos de *S. convallariodora* foram os mais promissores depois da *Copaifera*, porém seu conteúdo fenólico foi semelhante ao do *Erythroxylum*. Essa relação também pode ser encontrada no fato dos extratos de acetato de etila terem tido resultados melhores para ORAC, ao passo que os extratos metanólicos apresentaram maiores valores de fenóis totais.

Baseado nos resultados, um ponto importante a ser discutido é a divergência entre os conteúdos de taninos encontrados para cada metodologia. Essa diferença é evidenciada em diversos trabalhos e é atribuída à alta diversidade estrutural dos taninos (Schofield *et al.* 2001; Seddon & Downey 2008; Mercurio & Smith 2008). Para exemplificar, com apenas a catequina e epicatequina como subunidades formando oligômeros de oito unidades, podem ser originados mais de 500 diferentes estruturas químicas (Cheynier *et al.* 2006; Mercurio & Smith 2008). Essa heterogeneidade na composição dos taninos também resulta na falta de padrões confiáveis para a construção de curvas de calibração para qualquer ensaio de doseamento de taninos. A complexidade dos taninos também afeta sua remoção por meio da precipitação por BSA. Mercurio & Smith (2008) mostram essa relação por meio da comparação na quantidade de taninos removidos por BSA de extratos de uva e do vinho. A remoção dos taninos da uva é muito eficiente, ao passo que o vinho, por conter maior complexidade de estruturas, tem remoção incompleta. Em relação ao ensaio de BSA, um fator a ser considerado é que albumina do soro bovino se complexa apenas com polímeros de três ou mais unidades, de forma que monômeros, dímeros ou antocianinas não são contabilizados. A porcentagem de polifenóis precipitados aumenta com o aumento do grau de polimerização, até octâmeros (Harbertson *et al.* 2014). Entretanto, o tamanho da cadeia não é o único fator determinante na precipitação de taninos por proteína. O PVPP, por sua vez, se complexa com polifenóis de uma maneira mais geral, se ligando inclusive a monômeros (Mitchell *et al.* 2005). Dessa forma, é esperado que o ensaio com PVPP apresente valores próximos ou maiores que o BSA. No presente trabalho, foram observados dois resultados do ensaio de precipitação com BSA fora do esperado: os extratos de AcOEt de *L. elegans* (PVPP = 15,6 mg e BSA = 33,5 mg EaG 100 mg⁻¹ de extrato) e *S. convallariodora* (PVPP = 2,4 mg e BSA = 16,3 mg EaG 100 mg⁻¹ de extrato) (Figura 10; Tabela 7). Uma possibilidade para esses altos valores encontrados, é a falta de solubilidade desses extratos na solução de tampão do BSA. Isso resultaria na precipitação de outras substâncias além de taninos, que serão também contabilizadas se reativas com o cloreto férrico.

O ensaio com vanilina-HCl também apresentou valores discrepantes em relação aos outros ensaios, principalmente para *C. langsdorffii*. Diversos fatores podem afetar o ensaio de vanilina, dentre eles a natureza (H_2SO_4 ou HCl) e concentração do ácido, tempo de reação, temperatura, presença de água, concentração do reagente, interferência de outras substâncias (como ácido ascórbico e clorofila) ou substância padrão utilizada (Price *et al.* 1978; Sun *et al.* 1998). Baixo conteúdo de taninos no ensaio de vanilina, como ocorrida em *C. langsdorffii*, pode ser consequência da natureza do ensaio, em que a vanilina pode tanto reagir com todas as unidades de flavan-3-ol do polímero, quanto apenas com as unidades terminais. A primeira condição resultaria em valores equivalentes para todas as proantocianidinas com base na massa, enquanto a segunda, na equivalência em molares (Butler *et al.* 1982). O uso da catequina como padrão em altas concentrações de ácido pode levar o teor de taninos a ser subestimado (Sun *et al.* 1998), porém não é o caso do presente estudo. Nakamura *et al.* (2003) discutem a possibilidade de a presença de substância coloridas causarem subestimação no ensaio de vanilina-HCl. A sensibilidade do ensaio de vanilina-HCl foi insuficiente para a detecção dos taninos em alguns dos extratos; isso poderia não ter ocorrido caso H_2SO_4 tivesse sido utilizado no lugar de HCl (Sun *et al.* 1998). Como já comentado anteriormente, não é raro diferentes metodologias de doseamento de taninos apresentarem diferenças nos resultados, pois, não necessariamente estão sendo detectadas as mesmas substâncias (p.e. PVPP se complexa com monômeros, ao contrário do BSA).

Com relação aos ensaios de atividade antibacteriana, é encontrada uma maior susceptibilidade de *B. subtilis* aos extratos, quando comparada às outras bactérias. Este é um resultado esperado, visto que se trata de uma bactéria Gram-positiva. Bactérias Gram-negativas, como *E. coli* e *P. aeruginosa*, possuem uma membrana adicional, externa à parede de peptidoglicano que, devido a diferenças na penetração e retenção de agentes químicos, confere maior resistência a fármacos (Exner *et al.* 2017). Melhores atividades contra *B. subtilis* foram observadas com extratos de maior conteúdo fenólico e de taninos totais (AcOEt e MeOH de *Copaifera* e *Leptolobium*) (Tabelas 6 e 7). Os extratos de DCM destas espécies não foram os mais ativos contra *B. subtilis*, porém

apresentaram de moderada a alta inibição, além de, em geral, terem apresentado melhor desempenho contra as bactérias Gram-negativas. Os extratos de DCM de *Copaifera*, *Leptolobium* e *Erythroxylum* tiveram a presença marcante de triterpenos (ver Capítulo II), que podem estar associados a atividade antimicrobiana. Contra *P. aeruginosa* os extratos de AcOEt de *E. suberosum* foram os mais ativos.

Capítulo II

Perfil químico de extratos lipofílicos de *Copaifera langsdorffii*, *Salvertia convallariodora*, *Leptolobium elegans* e *Erythroxylum suberosum*

1. INTRODUÇÃO

Uma enorme variedade de compostos lipofílicos pode facilmente ser extraída das diferentes partes vegetais, englobando alcanos de cadeia longa, ácidos graxos, álcoois graxos, aldeídos, ésteres, esteroides, triterpenos e fenólicos pouco polares (Haliński *et al.* 2015). A casca de espécies lenhosas é uma das possíveis fontes de substâncias lipofílicas. Por compreenderem grande diversidade de classes e estruturas químicas, esses compostos estão envolvidos em uma série de processos biológicos, além de estarem associados a uma ampla gama de atividades biológicas. Estão presentes naturalmente em plantas nos tecidos de proteção como a cutícula, constituindo a membrana plasmática, compondo a reserva de sementes ou agindo na interação da planta-ambiente (Nes 1989; Avato & Tava 2022).

O perfil químico de extratos lipofílicos ou o conteúdo de alguns constituintes específicos também podem ser empregados na quimiotaxonomia. A análise do padrão de distribuição de hidrocarbonetos na cera epicuticular de espécies de Solanaceae se mostrou uma técnica promissora no auxílio do delineamento de grupos em diferentes níveis taxonômicos (Zygadlo *et al.* 1994; Haliński *et al.* 2011, 2015). Em extratos de casca, os alcanos costumam ser pouco expressivos. Salatino *et al.* (2020) demonstraram a possibilidade do uso do perfil químico geral de extratos hexânicos de súber para a caracterização e delimitação de espécies, propondo uma alternativa ao uso na filogenia de marcadores moleculares a nível de gênero e espécie (p.e. microsatélites). Com *Prunus africana*, foi analisado em populações geograficamente distantes o

padrão de distribuição de constituintes lipofílicos da casca, permitindo correlacionar o conteúdo desses compostos, em especial do ácido ursólico, à filogeografia da espécie. O estudo expõe que a variação interpopulacional no conteúdo de ácido ursólico é resultado de fatores genéticos, e não ambientais (Kadu *et al.* 2012). O trabalho citado aponta também a aplicabilidade desses dados de diversidade química em estratégias de conservação, de forma a considerar além da variabilidade genética das populações.

Uma série de metabólitos podem ser obtidos por extrações da casca do tronco com solventes apolares. As principais classes de extrativos incluem ácidos graxos (saturados e insaturados), hidroxiácidos graxos, diácidos alifáticos, álcoois alifáticos de cadeia longa, terpenos (sobretudo esteroides e triterpenos pentacíclicos), ésteres metílicos, monoacilglicerídeos e compostos aromáticos simples (Oliveira *et al.* 2020; Zazouli *et al.* 2022). Muitos desses constituintes são biologicamente ativos e, portanto, de valor farmacológico. Em extratos de cascas ricas em suberina são encontrados compostos semelhantes aos de extratos de cera epicuticular, constituintes das denominadas “ceras associada à suberina” (Kolattukudy 2001). Ao contrário das ceras cuticulares, as ceras da suberina costumam refletir, em parte, a composição polimérica da suberina (Li *et al.* 2007). Os principais monômeros que constituem a suberina são o glicerol, ácidos α,ω -dicarboxílicos e ω -hidróxiácidos, monômeros minoritários correspondem a álcoois graxos, ácidos graxos e o ácido ferúlico (Pereira 2015). Alguns autores definem como suberina apenas o domínio polialifático do polímero. Uma diferença importante entre a suberina e a cutina se refere à rara presença de grupos funcionais laterais nos ácidos graxos da primeira, enquanto comumente são encontrados na segunda (Li *et al.* 2007).

Esse capítulo tem como proposta o estudo do perfil químico de extratos lipofílicos (diclorometano e hexano) de casca externa – uma alternativa menos agressiva de obtenção de extrativos que a casca total – de plantas do cerrado, um bioma brasileiro com típico espessamento da estrutura. As espécies trabalhadas são *Copaifera langsdorffii* Desf., *Leptolobium elegans* Vogel, *Salvertia convallariodora* A. St.-Hil e *Erythroxylum suberosum* A. St.-Hil.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Extração

Conforme descrito no Capítulo I, a coleta do material vegetal foi realizada por diferentes coletores. Três espécimes de *Copaifera langsdorffii* foram coletados pela Profa. Dra. Renata G. Udulutsch em Assis (SP); três espécimes de *Leptolobium elegans* e dois de *Erythroxylum suberosum* por João Victor Longhi Monzoli e Paulo Naoto Taniguti em Tibagi (PR); e três espécimes de *Salvertia convallariodora* pelo Prof. Dr. Gregorio T. Ceccantini em Itacarambi (MG). As cascas obtidas foram trituradas e transferidas para um erlenmeyer, para a adição do solvente. As extrações foram inicialmente feitas com *n*-hexano (Hex), permanecendo mais de 24 horas sob agitação antes do material ser filtrado. O processo foi repetido três vezes, para então ser realizado com diclorometano (DCM). Aos extratos foram atribuídas siglas conforme o solvente de extração – *n*-hexano (**h**), diclorometano (**d**), acetato de etila (**a**) e metanol (**m**) –, seguido da indicação da espécie – *C. langsdorffii* (**C**), *L. elegans* (**L**), *E. suberosum* (**E**) e *S. convallariodora* (**S**) – e número do espécime (**1**, **2** ou **3**) (ver Tabela 1 no Capítulo I). Outros detalhes, ver Capítulo I.

2.2. Cromatografia a Gás acoplada a espectrometria de massas (CG-EM)

Foi transferido 1 mg dos extratos de Hex e DCM para tubos de inserção automática de cromatógrafo a gás. Para a trimetilsililação dos componentes dos extratos foram adicionados 45 µL de piridina e 45 µL do reagente BSTFA [N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida] e aquecidos em banho seco a 80°C por 1 hora. Uma alíquota de 1 µL desses extratos derivatizados foi injetada no cromatógrafo a gás (6850 - Agilent Technologies) acoplado a espectrômetro de massas (5975C - Agilent Technologies) utilizando uma coluna HP-5MS (30m x 0.250mm - 0.25µm - Agilent Technologies). Como gás de arraste foi utilizado Hélio com fluxo 1 mL min⁻¹. A rampa de aquecimento foi de 5° C/min, com temperatura de início de 100 °C até alcançar 320 °C, na qual permaneceu por 8 min, totalizando

57 minutos de análise. A temperatura do injetor foi ajustada para 300°C, a do quadrupolo a 150°C, e a da fonte de íons a 230°C, utilizando energia de ionização de 70 eV. Foram analisados faixas superiores a 50 *m/z*.

2.3. Análise de dados

Nos cromatogramas, foram integrados os picos com porcentagem de área superior a 4% do pico mais abundante. A sugestão da identidade dos compostos foi feita com o auxílio da biblioteca e *software* de busca NIST 2020 (*National Institute of Standards and Technology*), comparação com dados da literatura e análise do padrão de fragmentação. Fórmula, estrutura química e nomes aceitos das moléculas foram consultados na base de dados PubChem.

Foi realizada análise de agrupamento para verificar se espécimes de uma mesma espécie são agrupados com base no seu perfil químico. Os dados foram plotados em duas matrizes binárias (extratos Hex e DCM), com metabólitos nas colunas e extratos nas linhas. A análise foi feita no *software* PAST (Hammer *et al.* 2001), utilizado o algoritmo UPGMA (*unweighted pair group method with arithmetic mean*) e coeficiente de semelhança DICE.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A derivatização com BSTFA, forma o derivado trimetisililano (TMS), quando hidroxilas ou nitrogênio ligado a hidrogênio estão presentes no composto. A substituição do hidrogênio das hidroxilas por uma molécula de sílica ligada a três metilas, aumenta a volatilidade dessas substâncias, melhora a resposta do detector e aumenta a eficiência na separação (Frias *et al.* 2014). Derivados TMS, além de acrescentar uma massa de 72 *m/z* à massa da molécula original para cada hidrogênio substituído, possuem padrões de fragmentação distintos que podem auxiliar na identificação da substância. Alguns isômeros são impossíveis de diferenciar com a metodologia utilizada, e, por vezes, não é possível determinar o local de dupla ligações e/ou posição de cadeias laterais. Os metabólitos detectados estão compilados na Tabela 1. Picos diagnósticos dos compostos e espectro de substâncias não identificadas estão

apresentados no Apêndice. Compostos não identificados foram nomeados com a sigla do extrato de origem seguida do tempo de retenção. Quando possível, foi sugerida uma fórmula plausível para esses metabólitos, condizente com a massa molecular e padrão de fragmentação. Várias razões dificultaram a identificação de algumas substâncias. Uma delas correspondeu a espectros pouco descritivos, seja por (1) baixa intensidade do pico no cromatograma, gerando espectro com resolução insuficiente ou (2) gama de compostos que possuem espectros semelhantes. Outras razões foram: (3) pico formado pela sobreposição de mais de um composto; (4) não encontrado espectro equivalente na literatura. Para metabólitos presentes em mais de um extrato da mesma espécie, foi calculado o tempo de retenção médio. A partir da área total integrada dos cromatogramas de cada extrato, foi calculada a área relativa (%) para cada classe de compostos (Tabela 2).

Tabela 1. Metabólitos detectados nos extratos de casca de *Copaifera langsdorffii* (**Cop**), *Leptolobium elegans* (**Lep**), *Erythroxylum suberosum* (**Ery**) e *Salvertia convalariodora* (**Sal**). Substâncias não identificados foram nomeadas com a sigla do extrato de origem seguida pelo seu tempo de retenção. (+) presença; (-) não detectado.

Metabólito	MN	Fórmula	Cop	Lep	Ery	Sal	M ⁺ (%)	
1 Glicerol, 3TMS	92	C ₃ H ₈ O ₃	-	-	+	+	308 (0)	a
Ácido graxo								
2 #Hexadecanolactona	254	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	-	+	-	+	254 (5)	a
3 #Octadecenolactona	280	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	-	+	+	+	280 (10)	a
Insaturado								
4 Ácido linoleico (18:2), TMS	280	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	+	+	-	+	352 (2)	a
5 Ácido oleico (18:1), TMS	282	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	+	+	-	+	354 (4)	a
7 Ácido *octadecenóico (18:1), TMS	282	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	+	+	-	-	354 (3)	a
8 Ácido *nonadecenóico (19:1), TMS	296	C ₁₉ H ₃₆ O ₂	+	-	-	-	368 (1)	a
10 Ácido *eicosenóico (20:1), TMS	310	C ₂₀ H ₃₈ O ₂	-	-	-	+	382 (3)	a
11 Ácido *docosenóico (22:1)	338	C ₂₂ H ₄₂ O ₂	-	+	-	+	338 (15)	a
12 Ácido 18-hidroxioléico, 2TMS	298	C ₁₈ H ₃₄ O ₃	-	+	-	+	442 (4)	b
Saturado								
14 Ácido nonanóico (9:0), TMS	158	C ₉ H ₁₈ O ₂	-	-	-	+	230 (1)	a
15 Ácido 8-hidroxiocetanóico, 2TMS	160	C ₈ H ₁₆ O ₃	-	-	-	+	304 (0)	a
16 Ácido 9-hidroxi-nonanóico, 2TMS	174	C ₉ H ₁₈ O ₃	-	-	-	+	318 (0)	a
17 Ácido cáprico (10:0), TMS	172	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	-	+	-	-	244 (1)	a
18 Ácido láurico (12:0), TMS	200	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	-	+	-	-	272 (3)	a
19 Ácido mirístico (14:0), TMS	228	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	-	+	-	+	300 (3)	a
20 Ácido palmítico (16:0), TMS	256	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	+	+	+	+	328 (6)	a
21 Ácido margárico (17:0), TMS	270	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	+	-	-	-	342 (5)	a
22 Ácido esteárico (18:0), TMS	284	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	+	+	-	+	356 (7)	a
23 Ácido 16-hidroxi-hexadecanóico, 2TMS	272	C ₁₆ H ₃₂ O ₃	-	+	-	+	416 (0)	l
24 Ácido araquídico (20:0), TMS	312	C ₂₀ H ₄₀ O ₂	+	+	+	+	384 (9)	a
25 Ácido heneicosanóico (21:0), TMS	326	C ₂₁ H ₄₂ O ₂	-	-	+	-	398 (8)	l
26 Ácido docosanóico (22:0), TMS	340	C ₂₂ H ₄₄ O ₂	+	+	+	+	412 (13)	a

Tabela 1. continuação

27	Ácido tricosanóico (23:0), TMS	354	C ₂₃ H ₄₆ O ₂	-	+	-	-	426 (9)	l
28	Ácido lignocérico (24:0), TMS	368	C ₂₄ H ₄₈ O ₂	+	+	+	+	440 (10)	a
29	Ácido 22-hidroxicosanoico, 2TMS	356	C ₂₂ H ₄₄ O ₃	-	-	+	+	500 (1)	l
30	Ácido cerótico (26:0), TMS	396	C ₂₆ H ₅₂ O ₂	+	+	+	+	468 (16)	a
31	Ácido 24-hidroxitetracosanoico, 2TMS	384	C ₂₄ H ₄₈ O ₃	-	-	+	+	528 (0)	l
32	Ácido octacosanoico (28:0), TMS	424	C ₂₈ H ₅₆ O ₂	+	-	-	+	496 (0)	l
33	Ácido 26-hidroxihexacosanoico, 2TMS	412	C ₂₆ H ₅₂ O ₃	-	-	-	+	556 (0)	l
34	Ácido triacontanoico (30:0), TMS	452	C ₃₀ H ₆₀ O ₂	-	-	-	+	524 (15)	l
Diácido graxo									
Insaturado									
35	Ácido octadecenodióico, 2TMS	312	C ₁₈ H ₃₂ O ₄	-	+	+	+	456 (2)	b
Saturado									
36	Ácido subérico (8:0), 2TMS	174	C ₈ H ₁₄ O ₄	-	-	-	+	318 (0)	a
37	Ácido azelaico (9:0), 2TMS	188	C ₉ H ₁₆ O ₄	-	+	+	+	332 (0)	a
38	Ácido hexadecanodióico, 2TMS	286	C ₁₆ H ₃₀ O ₄	-	+	+	+	430 (0)	a
39	Ácido octadecanodióico, 2TMS	314	C ₁₈ H ₃₄ O ₄	-	+	-	+	458 (0)	l
Éster graxo									
Éster de ácido monocarboxílico									
40	Hexadecanoato de metila	270	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	-	-	-	+	270 (6)	a
41	Linoleato de metila	294	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	-	-	-	+	294 (6)	a
42	Oleato de metila	296	C ₁₉ H ₃₆ O ₂	-	-	-	+	296 (3)	a
43	Octadecanoato de metila	298	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	-	-	-	+	298 (8)	a
44	16-Hidroxihexadecanoato de metila, TMS	286	C ₁₇ H ₃₄ O ₃	-	-	-	+	358 (0)	b
45	18-Hidroxiocetadecenoato de metila, TMS	312	C ₁₉ H ₃₆ O ₃	-	-	-	+	384 (3)	b
46	9,10-Dihidroxiocetadecenoato de metila, 2TMS	330	C ₁₉ H ₃₈ O ₄	-	-	-	+	474 (0)	b
47	Docosanoato de metila	354	C ₂₃ H ₄₆ O ₂	-	-	-	+	354 (13)	a
48	Docosanoato de etila	368	C ₂₄ H ₄₈ O ₂	-	+	-	-	368 (14)	b
49	Tetracosanoato de metila	382	C ₂₅ H ₅₀ O ₂	-	-	-	+	382 (14)	a
50	Tetracosanoato de etila	396	C ₂₆ H ₄₈ O ₂	-	+	-	+	396 (16)	a
51	Hexacosanoato de metila	410	C ₂₇ H ₅₄ O ₂	-	-	-	+	410 (18)	a
52	Hexacosanoato de etila	424	C ₂₈ H ₅₆ O ₂	-	-	-	+	424 (13)	b
53	Octacosanoato de metila	438	C ₂₉ H ₅₈ O ₂	-	-	-	+	438 (18)	a
54	Triacontanoato de metila	466	C ₃₁ H ₆₂ O ₂	-	-	-	+	466 (23)	a
Diéster de ácido dicarboxílico									
56	Dimetil hexadecanodioato	314	C ₁₈ H ₃₄ O ₄	-	-	-	+	314 (0)	a
57	Dimetil octadecanodioato	340	C ₂₀ H ₃₆ O ₄	-	-	-	+	340 (1)	b
Monoéster de ácido dicarboxílico									
58	Monometil azelato, TMS	202	C ₁₀ H ₁₈ O ₄	-	-	-	+	274 (0)	a
59	Ácido hexadecanodióico monometil éster, TMS	300	C ₁₇ H ₃₂ O ₄	-	-	-	+	372 (0)	l
Monoacilglicerol									
60	1-Mono-(ácido hexadecanodioico-1- <i>oil</i>)-glicerol, 3TMS	360	C ₁₉ H ₃₆ O ₆	-	-	-	+	576 (0)	l
61	1-Mono-(docosanoil)-glicerol, 2TMS	414	C ₂₅ H ₅₀ O ₄	-	-	+	-	558 (0)	c
62	1-Mono-(tetracosanoil)-glicerol, 2TMS	442	C ₂₇ H ₅₄ O ₄	-	-	-	+	586 (0)	l
Álcool graxo primário									
63	Docosanol, TMS	326	C ₂₂ H ₄₆ O	-	+	-	-	398 (0)	l
64	Tetracosanol, TMS	354	C ₂₄ H ₅₀ O	-	+	+	+	426 (0)	a
65	Hexacosanol, TMS	382	C ₂₆ H ₅₄ O	+	+	+	+	454 (0)	l

Tabela 1. Continuação.

66	Octacosanol, TMS	410	C ₂₈ H ₅₈ O	+	-	-	+	482 (0)	l
67	Nonacosanol, TMS	424	C ₂₉ H ₆₀ O	-	-	-	+	496 (1)	l
68	Triacotanol, TMS	438	C ₃₀ H ₆₂ O	-	-	-	+	510 (0)	a
Fenólicos									
C₆-C₁									
69	Vanilina, TMS	152	C ₈ H ₈ O ₃	-	-	-	+	224 (28)	a
70	Siringaldeído, TMS	182	C ₉ H ₁₀ O ₄	-	-	-	+	254 (27)	a
71	Ácido vanílico, 2TMS	168	C ₈ H ₈ O ₄	-	-	-	+	312 (59)	a
72	Ácido siríngico, 2TMS	198	C ₉ H ₁₀ O ₅	-	-	-	+	342 (54)	a
C₆-C₃									
73	Álcool dihidroconiferílico, 2TMS	182	C ₁₀ H ₁₄ O ₃	-	-	-	+	326 (23)	a
74	Ácido ferúlico, 2TMS	194	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	-	-	+	+	338 (100)	a
Lactona									
75	3-Hidroxidecano-5-lactona, TMS	186	C ₁₀ H ₁₆ O ₃	-	-	-	+	258 (0)	a
76	4,8,12,16-Tetrametilheptadecan-4-olídeo	324	C ₂₁ H ₄₀ O ₂	-	-	-	+	324 (1)	a
Purina									
77	Ácido úrico, tetrakis-TMS	168	C ₅ H ₄ N ₄ O ₃	-	-	-	+	456 (27)	a
Diterpeno									
78	hC_37.93	--	--	+	-	-	-	-	
79	hC_38.49	--	--	+	-	-	-	464 (0)	
80	hC_42.64	--	--	+	-	-	-	492 (0)	
81	hC_42.74	--	--	+	-	-	-	454 (0)	
82	hC_43.05	--	--	+	-	-	-	492 (0)	
83	hC_43.14	--	--	+	-	-	-	492 (0)	
Esqueleto kaurano									
84	Ácido <i>ent</i> -caurenóico, TMS	302	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	+	-	-	-	374 (19)	j
85	Ácido *hidroxi- <i>ent</i> -caurenóico, 2TMS	318	C ₂₀ H ₃₀ O ₃	+	-	-	-	462 (4)	j
Esqueleto labdano									
86	Ácido 14,15-dinor-13-oxolabd-8(17)-en-19-óico, TMS	292	C ₁₈ H ₂₈ O ₃	+	-	-	-	364 (1)	d
87	#Ácido hidroxidinorlabd-8(17)-enóico, 2TMS	294	C ₁₈ H ₃₀ O ₃	+	-	-	-	438 (1)	l
88	Ácido copálico, TMS	304	C ₂₀ H ₃₂ O ₂	+	-	-	-	376 (1)	a
Lactona diterpênica									
89	Nivenolídeo, TMS	332	C ₂₀ H ₂₈ O ₄	+	-	-	-	404 (1)	a
Fitosteroide									
90	hS_dS_51.34	428	C ₃₀ H ₅₂ O	-	-	-	+	500 (57)	
Esqueleto estigmastano									
91	Estigmasterol, TMS	412	C ₂₉ H ₄₈ O	+	+	-	+	484 (12)	a
92	β-Sitosterol, TMS	414	C ₂₉ H ₅₀ O	+	+	+	+	486 (16)	a
93	Estigmasta-4,22-dien-3-ona	410	C ₂₉ H ₄₆ O	-	+	-	+	410 (25)	a
94	β-Sitostenona	412	C ₂₉ H ₄₈ O	+	+	+	+	412 (20)	a
Esqueleto ergostano									
95	Campesterol, TMS	400	C ₂₈ H ₄₈ O	+	+	-	-	472 (15)	a
96	4-Campesten-3-ona	398	C ₂₈ H ₄₆ O	-	+	-	-	398 (21)	a
Triterpeno									
97	hC_dC_49.30	-	-	+	-	-	-	560 (2)	l
98	#Metil moronato ou betulonato	468	C ₃₁ H ₄₈ O ₃	-	+	-	-	468 (10)	e
99	hC_52.09	412	C ₂₉ H ₄₈ O	+	-	-	-	412 (46)	l

Tabela 1. Continuação.

100	hC_dC_52.45	414	C ₂₉ H ₅₀ O	+	-	-	-	486 (2)	l
101	hC_52.49	456	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	+	-	-	-	528 (12)	l
Esqueleto oleano									
102	β-Amirina, TMS	426	C ₃₀ H ₅₀ O	-	-	-	+	498 (2)	b
103	β-Amirona	424	C ₃₀ H ₄₈ O	-	-	+	-	424 (5)	a
104	Ácido oleanônico, TMS	454	C ₃₀ H ₄₆ O ₃	-	-	+	-	526 (5)	f
105	Ácido oleanólico, 2TMS	456	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	+	+	+	+	600 (1)	a
106	Ácido acetil-oleanólico, TMS	498	C ₃₂ H ₅₀ O ₄	-	-	+	-	570 (1)	l
107	Ácido *hidroxioleanólico, 3TMS	472	C ₃₀ H ₄₈ O ₄	-	-	-	+	688 (0)	g
Esqueleto lupano									
108	Lupenona	424	C ₃₀ H ₄₈ O	-	+	-	+	424 (20)	a
109	Lupeol, TMS	426	C ₃₀ H ₅₀ O	-	+	-	+	498 (10)	a
110	hL_50.24	--	--	-	+	-	-	--	
111	Betulina, TMS	442	C ₃₀ H ₅₀ O ₂	+	+	-	+	586 (1)	b
112	Ácido betulônico, TMS	454	C ₃₀ H ₄₆ O ₃	+	+	+	-	526 (6)	a
113	Ácido betulínico, 2TMS	456	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	+	+	+	+	600 (2)	h
114	hL_51.01	440	C ₃₀ H ₄₈ O ₂	-	+	-	-	512 (3)	
115	Ácido acetil-betulínico, TMS	498	C ₃₂ H ₅₀ O ₄	-	-	+	-	570 (2)	l
116	Ácido platânico, 2TMS	458	C ₂₉ H ₄₆ O ₄	+	-	-	-	602 (1)	a
117	Ácido *hidroxibetulínico, 3TMS	472	C ₃₀ H ₄₈ O ₄	+	-	-	-	688 (1)	g
118	dC_56.39	474	C ₃₀ H ₅₀ O ₄	+	-	-	-	690 (2)	l
Esqueleto ursano									
119	α-Amirona	424	C ₃₀ H ₄₈ O	-	-	+	-	424 (11)	a
120	α-Amirina, TMS	426	C ₃₀ H ₅₀ O	-	-	+	+	498 (2)	a
121	Ácido ursônico, TMS	454	C ₃₀ H ₄₆ O ₃	-	-	+	-	526 (3)	l
122	Ácido ursólico, 2TMS	456	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	-	+	+	+	600 (1)	a
123	Ácido acetil-ursólico, TMS	498	C ₃₂ H ₅₀ O ₄	-	-	+	-	570 (1)	l
124	Ácido *hidroxiursólico, 3TMS	472	C ₃₀ H ₄₈ O ₄	-	-	-	+	688 (0)	g
n.i. Copaifera									
125	hC_25.14	268	C ₁₀ H ₁₂ O ₄	+	-	-	-	340 (2)	l
126	hC_51.55	--	--	+	-	-	-	--	
n.i. Leptolobium									
127	hL_34.65	--	--	-	+	-	--	-	
128	hL_dL_35.01	--	--	-	+	-	--	452 (36)	
129	dL_34.97	--	--	-	+	-	--	452 (6)	
130	hL_36.02	--	--	-	+	-	--	-	
131	hL_47.61	502	--	-	+	-	--	574 (1)	
132	hL_51.55	--	--	-	+	-	-	--	
n.i. Erythroxylum									
Diálcool ou Hidroxiácido									
133	dE_7.82	118		-	-	+	-	262 (0)	
134	dE_8.04	118	C ₆ H ₁₄ O ₂ ou	-	-	+	-	262 (0)	
135	dE_8.55	118	C ₅ H ₁₀ O ₃	-	-	+	-	262 (0)	
136	dE_8.69	118		-	-	+	-	262 (0)	
Diálcool									
137	C ₆ H ₁₂ O ₂ , 2TMS	116	C ₆ H ₁₂ O ₂	-	-	+	-	260 (1)	l
138	C ₆ H ₁₂ O ₂ , 2TMS	116	C ₆ H ₁₂ O ₂	-	-	+	-	260 (0)	l
139	hE_dE_40.71	--	--	-	-	+	-	--	
n.i. Salvertia									
140	hS_dS_15.78_16.24	114	--	-	-	-	+	258 (38)	
141	hS_dS_15.78_16.24	114	--	-	-	-	+	258 (38)	
142	hS_dS_28.10	--	--	-	-	-	+	--	

Tabela 1. Continuação.

143	dS_29.73	--	--	-	-	-	+	--
144	dS_30.65	--	--	-	-	-	+	--
145	hS_36.83	--	--	-	-	-	+	--
146	hS_dS_37.53	--	--	-	-	-	+	--
147	dS_37.90_38.12	--	--	-	-	-	+	--
148	dS_37.90_38.12	--	--	-	-	-	+	--
149	dS_40.86	--	--	-	-	-	+	--
150	dS_40.99	--	--	-	-	-	+	--
Nº total de metabólitos				43	51	38	89	

Sugestão de identidade a partir da consulta em (a) NIST; (b) LIPID MAPS® (Christie); (c) Graça & Pereira (1997); (d) Popova *et al.* (2010); (e) Budzikiewicz *et al.* (1963); (f) Pastorova *et al.* (1998); (g) Lourenço *et al.* (2021); (h) Caligiani *et al.* (2013); (j) Fernandes *et al.* (2020); I: identificado pelo padrão de fragmentação. MN: massa nominal; M+ (%): íon molecular e intensidade relativa; *n.i.*: não identificada identidade ou classe do composto. * Desconhecida a posição da hidroxila ou dupla ligação; # sugestão de metabólito com baixo grau de certeza.

Tabela 2. Porcentagem de área obtida para cada classe de metabólitos em relação à área total integrada do cromatograma de cada extrato. (--) não detectado.

	<i>C. langsdorffii</i>				<i>L. elegans</i>					
	hC1	hC2	dC1	dC3	hL1	hL2	hL3	dL1	dL2	dL3
Ácidos graxos	57.8	24.3	1.9	--	46.2	59.5	29.8	--	9.8	--
<i>Insaturados</i>	12.0	4.3	--	--	11.2	--	6.3	--	4.8	--
<i>Saturados</i>	45.8	20.0	--	--	35.0	59.5	23.5	--	4.9	--
<i>ω-hidroxiácidos</i>	--	--	--	--	0.7	--	0.7	--	4.7	--
α,ω-diácidos	--	--	--	--	4.1	3.5	5.6	3.1	16.1	--
Ésteres	--	--	--	--	1.4	--	--	--	--	--
Monoacilgliceróis	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Álcoois graxos	5.6	--	1.7	--	5.0	1.0	0.7	--	--	--
Fenólicos	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Diterpenos	--	42.1	--	--	--	--	--	--	--	--
Esteroides	16.7	5.6	--	--	19.3	2.5	24.6	9.4	11.1	8.6
Triterpenos	16.4	28.1	96.3	100.0	12.5	18.2	23.9	83.7	53.5	87.8
Outros	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
<i>n.i.</i>	3.5	--	--	--	4.0	12.7	5.1	3.9	9.6	3.7

	<i>E. suberosum</i>				<i>S. convallariodora</i>					
	hE1	hE2	dE1	dE2	hS1	hS2	hS3	dS1	dS2	dS3
Ácidos graxos	56.6	49.4	34.3	26.9	33.7	28.5	32.2	37.3	42.0	34.4
<i>Insaturados</i>	1.5	2.0	--	--	7.1	6.3	10.0	3.7	3.5	3.0
<i>Saturados</i>	56.6	49.4	34.3	26.9	26.6	22.2	22.2	32.7	36.9	30.0
<i>ω-hidroxiácidos</i>	--	--	3.2	1.2	--	--	3.9	4.3	6.6	8.1
α,ω-diácidos	4.1	4.4	10.3	14.6	--	1.3	3.6	3.6	10.7	19.5
Ésteres	--	--	--	--	10.4	23.1	10.3	0.8	7.6	2.5
Monoacilgliceróis	--	--	1.6	1.2	--	--	--	0.9	1.6	1.5
Álcoois graxos	--	1.1	1.8	1.3	23.8	17.8	22.4	19.4	12.4	15.0
Fenólicos	--	--	1.6	1.3	--	--	--	4.1	5.1	8.4
Diterpenos	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Esteroides	3.8	7.4	2.2	4.4	17.7	16.3	11.2	11.1	6.6	3.4
Triterpenos	34.0	34.8	35.3	48.1	10.4	3.4	2.3	8.2	2.2	1.1
Outros	--	--	1.1	--	1.7	1.2	0.8	2.2	4.3	3.2
<i>n.i.</i>	--	1.0	11.8	2.2	0.6	1.9	4.5	13.3	8.1	10.3

n.i.: classe não identificada; (h) extratos Hex; (d) extratos DCM; (1-3) número do espécime.

3.1. Ácidos graxos típicos

A série homóloga de ácido graxo, de cadeia média a longa, pode ser facilmente identificada pela presença dos picos de massa 73, 117, 129, 132 e 145 m/z com alta intensidade. O íon $[\text{Si}(\text{CH}_3)_3]^+$ de massa 73 m/z é ubíquo em derivados TMS. Outro íon característico de espectros de derivados TMS é $[\text{HOSi}(\text{CH}_3)_2]^+$, de massa 75 m/z . Os picos 132 e 145 estão associados ao TMS ligado à carboxila e formam, respectivamente, os íons 117 e 129 após a perda de uma metila (Harvey & Vouros 2020). Em ácidos graxos, o pico resultante da perda de um radical de metila (CH_3) do derivado TMS é bastante intenso, sendo possível inferir a massa molar e, portanto, a fórmula dos homólogos, ao somar 15 (massa nominal da metila) ao valor do pico. Esse íon é abreviado como $[\text{M} - 15]^+$ e possui grande importância na identificação de substâncias derivatizadas. Moléculas compostas apenas por carbono, hidrogênio e oxigênio, derivatizadas ou não, possuem massa nominal par e o fragmento $[\text{M} - 15]^+$ de massa ímpar.

A presença de insaturações pode ser inferida pela massa molecular, porém o local da dupla ligação não pode ser determinado sem técnicas complementares. A posição da insaturação de alguns ácidos foi inferida considerando sua ocorrência comum em plantas, presente normalmente entre os carbonos 9 e 10. A exemplo do problema na identificação de ácidos graxos insaturados, dois compostos de espectro iguais (**5** e **7**) tiveram tempo de retenção (TR) muito próximos em **hC1** (32,09 e 32,19 min); o composto de maior área relativa se trata possivelmente do ácido oleico – um dos ácidos insaturados mais predominantes em plantas – e o menor, de algum isômero.

Além da localização da dupla ligação, outra questão estrutural que é normalmente de difícil identificação por CG-EM é a presença de metilas em ácido graxos, de forma que o ácido metil-heptadecanóico apresenta mesmo padrão de fragmentação que o ácido octadecanóico. Ácidos graxos metilados são mais comumente encontrados em bactérias (Tanno *et al.* 2021) e, portanto, os ácidos detectados foram assumidos como não ramificados. Os ácidos

palmitico (**20**), docosanóico (**26**) e lignocérico (**28**) foram identificados em todos os extratos hexânicos das quatro espécies. Os ácidos araquídico (**24**) e cerótico (**30**) estavam presentes em pelo menos um dos extratos hexânicos de cada espécie. Ácidos com número ímpar de carbonos, como nonanóico (**14**), margárico (**21**), heneicosanóico (**25**) e tricosanóico (**27**) foram eventualmente encontrados em alguns espécimes em baixa proporção.

A classe dos ácidos graxos foi a predominante em todos os extratos hexânicos, variando de 24 a 60%, exceto em **hC2**, cuja área relativa foi de 24% frente aos 28% de triterpenos (classe predominante nesse extrato). Dos extratos de DCM, somente *E. suberosum* e *S. convallariodora* apresentaram alta porcentagem de ácidos graxos (26-42%). Ácidos saturados foram prevalentes em todas as espécies. O espectro dos compostos **2** e **3** geram dúvidas quanto a sua identidade. O composto **3** se assemelha ao espectro do ácido linoleico (um dos ácidos graxos mais comuns de plantas) não derivatizado, porém melhor se alinha com o espectro da octadecenolactona (sinônimo: octadecenolídeo), substância pouco citada na literatura e produto da ciclização do ácido 18-hidroxioléico (Demole & Enggist 1978).

3.2. Ácidos graxos α,ω -bifuncionais e monoacilglicerídeos

Além de ácidos graxos de estrutura típica – cadeias longas de hidrocarboneto, geralmente de número par de carbonos – foram encontrados ácidos de ocorrência mais limitada. Dentre eles estão os α,ω -diácidos (**35 a 39**) e ω -hidroxiácidos (**12, 15, 16, 23, 29, 31, 33**). Esses ácidos apresentam também um grupo funcional na posição terminal da molécula (extremidade ω), sendo uma carboxila ou hidroxila, respectivamente, e estão entre os principais monômeros das suberinas (Graça & Pereira 1999; Avato & Tava 2022), diferentemente da cutina, em que ácidos mais polares, contendo as funções epóxi, hidroxil ou di-hidroxil, compõem uma importante fração desse poliéster. A presença de grupos ligantes em ambas as extremidades da cadeia permite o crescimento desses polímeros. Ácidos α,ω -bifuncionais de suberina possuem tipicamente número par de carbonos, com comprimento entre C₁₆ e C₂₄, sendo os ácidos C₁₆

saturado e C₁₈ insaturado componentes majoritários (Kolattukudy 2001; Santos *et al.* 2013).

A identificação de ω -hidroxiácidos pode ser feita por CG-EM, com padrão de fragmentação bastante típico. Foi observado que esse grupo apresenta picos de massa típicos de derivados TMS de ácidos graxos (73, 117 e 129 m/z) e de álcool (103 m/z), além dos íons $[M - 15]^+$, $[M - 31]^+$ e $[M - 105]^+$. O íon $[M - 105]^+$ possivelmente resulta da perda de $[\text{HOSi}(\text{CH}_3)_3]$ e uma metila. A interação de dois radicais OTMS, de duas carboxilas ou carboxila e hidroxila, originam os íons de m/z 147, 204 e 217, presentes em ambos α,ω -diácidos e ω -hidroxiácidos. Todos os α,ω -diácidos apresentaram em comum os picos 73, 117, 129, 147, 204, 217, $[M - 131]^+$ e $[M - 15]^+$. A perda de 131 de massa pode ser explicado pela saída de uma metila e $[\text{HCOOSi}(\text{CH}_3)_3]$ (carboxila com TMS). Nos ácidos insaturados 18-hidroxiocetadecenoico, 2TMS (**12**) e octadecenediíico, 2TMS (**35**) o íon molecular é mais intenso.

Nenhum dos picos integrados dos extratos de *Copaifera* correspondeu a ω -hidroxiácidos ou α,ω -diácidos. Os diácidos foram mais prevalentes que hidroxiácidos no restante das espécies analisadas. Os ácidos octadecenediíico (**35**) e azelaico (**37**) foram detectados em pelo menos um espécime das três outras espécies (*Erythroxylum*, *Leptolobium* e *Salvertia*), ainda que com baixa porcentagem de área relativa. Nessas três espécies, o ácido hexadecenediíico (**38**) representa a maior parte da área total de diácidos calculada. Os sete ω -hidroxiácidos detectados estão presentes nos extratos de DCM de *Salvertia*, dentre eles C₁₆ (**23**), C₂₀ (**29**), C₂₄ (**31**), e C₂₆ (**33**) saturados e C₁₈ (**12**) insaturado. A presença dessa classe de substâncias foi pontual nos outros extratos.

Outro composto importante da suberina é o glicerol (**1**) (Philippe *et al.* 2020), que foi detectado em *Erythroxylum* e *Salvertia*. O dímero de glicerol com um ácido graxo, formado por ligações de éster, é denominado monoacilglicerídeo e pode ser obtido da despolimerização parcial da suberina (Graça & Pereira 1997, 1999). Raramente são encontrados mais do que traços dessas substâncias em tecidos vivos de plantas e animais (Christie & Han 2012).

Dependendo de qual extremidade do glicerol se liga ao ácido, podem ser formados 1- ou 2-monoacilglicerídeos. A fragmentação do primeiro resulta no pico base de $[M - 103]^+$ (desconsiderando o 73), devido à perda de $[H_2COSi(CH_3)_3]$, além dos picos de m/z 103, 117, 129, 147, 203 e $[M - 15]^+$. O íon molecular não costuma ser detectado. A fragmentação do dímero de glicerol e diácido (**60**) gerou também os íons 204, 217 e $[M - 235]^+$, o último resultante da perda do glicerol (com dois TMS). Foram detectados três 1-monoacilglicerídeos: 1-Mono-(docosanoil)-glicerol (**61**) em *Erythroxyllum*; 1-Mono-(tetracosanoil)-glicerol (**62**) e 1-Mono-(ácido hexadecanedioico-1-oil)-glicerol (**60**) em *Salvertia*. Essa classe correspondeu a uma fração mínima da área total calculada das cromatografias dos extratos de DCM de *Erythroxyllum* e *Salvertia*.

Em *S. convallariodora*, foram também detectados 9 metil (**40-43**, **47**, **48**, **51**, **53** e **54**) e 2 etil (**48**, **50**, **52**) ésteres de ácidos graxos com cadeia de hidrocarboneto; 3 ésteres metílicos de hidroxiácidos (**44-46**); 2 dimetil ésteres de diácidos graxos (**56** e **57**); e 2 monometil ésteres de diácidos (**58** e **59**). Em todos os extratos com ácidos graxos esterificados foram detectados os ácidos graxos livres (não esterificado) correspondentes, exceto 9,10-dihidroxiocetadecanoato de metila (**46**). Dos ésteres de ácidos simples, o comprimento da cadeia variou de C_{16} a C_{30} , dos quais apenas dois insaturados: linoleato e oleato de metila (**41** e **42**). O ácido hexadecanodióico foi detectado como éster mono- e dimetílico (**56** e **59**, respectivamente). Um dos extratos hexânicos de *Leptolobium* também apresentou ésteres, no caso, docosanoato (**40**) e tetracosanoato de etila (**50**), o último presente também em *Salvertia*.

3.3. Álcoois graxos

Hidrocarbonetos de cadeia alifática de média a longa (mais de 10 carbonos) e com uma hidroxila são insolúveis em água, caracterizando um álcool graxo (Rowland & Domergue 2012). Os derivados TMS de álcoois graxos primários são facilmente identificados por CG-EM, com padrão de fragmentação bastante típico. É característico da classe a presença dos picos m/z 75, 89 e 103, além do pico base $[M - 15]^+$. O íon m/z 89 é resultado da eliminação do alceno,

restando o íon $[\text{CH}_2\text{OSi}(\text{CH}_3)_3]^+$ (Harvey & Vouros 2020). Assim como os ácidos graxos, não é possível diferenciar por CG-EM um álcool graxo alifático de um ramificado de mesma massa, ou determinar a posição de dupla ligação. Essa fraqueza da técnica pouco afeta a identificação de álcoois de planta, que raramente possuem ramificações ou insaturações. Esses compostos costumam ter cadeia com número par de carbonos, geralmente superior a 20, com destaque nos comprimentos com C_{26} a C_{30} átomos. Álcoois graxos encontram-se principalmente esterificados ou livres nas ceras cuticulares, ceras associadas à suberina, ou compondo a estrutura da cutina e suberina (Mahadevan 1977; Mudge 2005; Rowland & Domergue 2012).

Foram identificados 6 álcoois graxos no total, todos saturados e com hidroxila na extremidade da cadeia (álcool primário), com cadeia de comprimento C_{20} , C_{24} , C_{26} , C_{28} , C_{29} e C_{30} (**63** a **68**, respectivamente). Nonacosanol (**67**) foi o único álcool graxo com número ímpar de carbonos, porém foi detectado apenas em dois dos extratos de *Salvertia* (**hS1** e **hS3**), com área relativa inferior a 1. Hexacosanol (**65**) está presente nas quatro espécies; entretanto, em *Erythroxylum* e *Leptolobium* foi detectado em apenas em um dos extratos (**dE1** e **hL1**), com área relativa inferior a 1. A espécie com maior porcentagem de área correspondente a álcoois graxos foi a *S. convallariodora*, com valores iguais ou superiores a 15% em todos os seis extratos. Não foram detectados álcoois graxos secundários.

3.4. Terpenoides

Terpenos apresentam padrão de fragmentação mais complexo e estruturas químicas mais diversas que as classes citadas até o momento, dificultando sua identificação.

Diterpenos

Diterpenos foram detectados em apenas um dos extratos hexânicos de *Copaifera* (**hC2**), inclusive representando 42% da área total integrada. Geralmente o padrão de fragmentação é semelhante nos diterpenos de

esqueleto labdano, caurano, pimarano e abietano, com diferenças de intensidade em alguns picos dependendo da posição das duplas ligações. Normalmente os picos resultantes da perda dos grupos funcionais são bastante evidentes. Os derivados TMS de muitos desses diterpenos tem espectro semelhante ao composto não derivatizado, com exceção dos maiores fragmentos que apresentam 72 a mais de massa para cada TMS substituído. A semelhança entre esses espectros é reflexo da formação de fragmentos a partir da quebra do íon parental sem o grupo funcional (Azemard *et al.* 2016).

Diterpenos tem ampla distribuição em plantas, uma vez que são precursores de moléculas essenciais ao metabolismo como o fitol e as giberilinas. Entretanto, a síntese e o acúmulo de diterpenos especializados são limitados a alguns tipos específicos de células e tecidos, e podem ser alterados em resposta a perturbações ambientais. Uma fonte importante de diterpenos são as óleo-resinas, obtidas p.e. de coníferas ou de espécies do gênero *Copaifera*, conhecido popularmente como “óleo de copaíba” (Pieri *et al.* 2009; Zerbe & Bohlmann 2015). Esse grupo de compostos não está entre os comumente encontrados em ceras associadas à suberina, mas foi e é extraído de cascas de diversas espécies (Veiga Jr & Pinto 2006; Kemboi *et al.* 2021; Nie *et al.* 2021; Lee *et al.* 2021).

Triterpenos

Aparecendo nos dez minutos finais da metodologia, os triterpenos estabelecem no cromatograma uma região típica, às vezes com alguns esteroides. Assim como diterpenos, o padrão de fragmentação dos derivados TMS é semelhante ao do composto não derivatizado, apenas com o acréscimo da massa do TMS nos fragmentos com grupos funcionais substituídos. Os fragmentos típicos de triterpenoides pentacíclicos são resultado da quebra do anel C com perda dos grupos funcionais. Espectros de triterpenos pentacíclicos, como β -Amirina (**102**) e α -Amirina (**120**), tipicamente apresentam fragmentos mais proeminentes em m/z 203 e 218. Esses íons são formados por reação retro-Diel-Alder e incluem os anéis E, D e parte do C. Devido à ausência de

insaturação no carbono 12 do anel C, a formação desses íons é desfavorecida em triterpenos de esqueleto lupano, tendo pico diagnóstico em m/z 189 (composto pelos anéis E e D). Triterpenos com carboxila no anel E ou D, como os ácidos betulínico (**113**), oleanólico (**105**) e ursólico (**122**), formam o íon m/z 320 como equivalente ao 218. O fragmento m/z 203 intenso em **105** e **122** é resultado da perda da carboxila e TMS (Razboršek *et al.* 2008; Lourenço *et al.* 2021). Triterpenos ácidos de esqueleto ursano foram diferenciados de oleano, pela presença do pico intenso em m/z 133. O tempo de retenção também é fundamental na identificação de esqueletos: oleanos eluem antes que lupanos com grupos funcionais idênticos, enquanto ursanos são retidos por maior tempo.

Os grupos funcionais de terpenos podem ser inferidos pela presença, por exemplo, dos picos $[M - 118]^+$ quando ocorre uma carboxila (-HCOOTMS); $[M - 90]^+$ para hidroxila (-HOTMS); e $[M - 60]^+$ para os grupos metil éster ou acetato (-HCOOCH₃). O pico em m/z 147 $[(CH_3)_3Si-O-Si(CH_3)_2]^+$ é resultado da ligação entre dois trimetilsiloxi (OTMS), indicando presença de hidroxilas próximas. A posição dos grupos funcionais nem sempre pode ser determinada por CG-EM, como no caso da hidroxila do diterpeno ácido hidroxi-*ent*-caurenólico (**85**) e do triterpeno ácido hidroxiursólico (**124**).

Nas amostras analisadas foram identificados somente triterpenos pentacíclicos. Essa classe está amplamente distribuída em folhas e superfícies da planta como a casca do caule ou ceras de frutos (Jäger *et al.* 2009). Todos os extratos das quatro espécies apresentaram área relativa de triterpenoides superior a 1%. *Salvertia* foi a que exibiu menores valores, entre 1 e 10%. Em *C. langsdorffi* e *L. elegans*, os extratos de DCM tiveram imenso predomínio de triterpenos, sobretudo do ácido betulínico (**113**), principalmente na primeira, com 96% (**hC1**) e 100% (**hC3**) de área relativa.

Jäger *et al.* (2009) testaram o conteúdo de triterpenos de esqueleto oleano, lupano e ursano em diferentes partes de algumas plantas conhecidamente ricas em triterpeno. Uma das observações desse estudo foi a prevalência de terpenos ácidos, em relação a triterpenos com função orgânica unicamente

alcoólica, somente em casca de bétula, com concentrações do segundo superiores a 1%. Das quatro espécies analisadas no presente estudos, somente os extratos hexânicos de *C. langsdorffi* e *S. convallariodora* alcançaram porcentagem de área semelhantes ou superiores quando álcoois e ácidos triterpênicos foram comparados. No restante dos extratos os ácidos foram muito mais abundantes, com destaque para DCM de *Erythroxylum* e *Leptolobium*, em que quase 100% dos triterpenos identificados foram ácidos. Os triterpenos com função de álcool identificados foram: β -amirina (**102**), lupeol (**109**), betulina (**111**) e α -amirina (**120**). Em alguns extratos também foram detectados triterpenos unicamente com função cetona – β -amirona (**103**), lupenona (**108**), α -amirona (**119**). A porcentagem desse grupo na cromatografia dos extratos foi inferior a 2%, exceto em **hE**.

Os ácidos oleanólico (**105**) e betulínico (**113**) ocorreram em todas as espécies, sendo que o **113** ocorreu em todos os extratos. O ácido ursólico (**122**) não foi detectado em *C. langsdorffi* e o ácido betulônico (**112**), em *S. convallariodora*. Kushiro & Ebizuka (2010) apontam que nos “vegetais superiores” o esqueleto oleano é predominante, seguido do ursano, afirmação não refletida no presente estudo. Em *Erythroxylum* o principal esqueleto foi o ursano, enquanto nas duas espécies de leguminosas, o domínio foi essencialmente de triterpenos da classe lupano. Os triterpenos não estiveram entre as classes de substâncias predominantes de *Salvertia*, e nenhum dos três esqueletos foi particularmente majoritário.

Esteroides

Apesar da grande diversidade química de esteroides, consequência das variações no estado de oxidação dos carbonos e metilas do núcleo tetracíclico, além da estrutura da cadeia lateral, foram identificados apenas 6 esteroides no presente estudo. Esses compostos são universais em plantas, uma vez que desempenham uma série de funções. Um dos principais grupos de esteroides, também com distribuição ubíqua nos vegetais, são os fitosteróis. Esses são álcoois esteroidais e compõem a bicamada lipídica da membrana celular, agindo

no controle da permeabilidade e fluidez (Gunaherath & Gunatilaka 2014). As fontes mais abundantes de fitosteróis são os óleos voláteis, porém são frequentemente extraídos da casca de inúmeras espécies (Huang *et al.* 2019; Hu *et al.* 2020; Owusu *et al.* 2021). Os principais esteroides encontrados nos troncos de árvores (inclusive casca) aparentam ser os mesmos daqueles encontrados em outras partes do vegetal ou em plantas filogeneticamente próximas, possivelmente reflexo de sua participação na constituição da membrana plasmática (Nes 1989). Os fitosteróis detectados foram três dos de ocorrência mais comum em plantas: estigmasterol (**91**), β -sitosterol (**92**) e campesterol (**95**). Como são substâncias já bastante conhecidas, com o *software* de busca por espectros de massa da NIST foi possível determinar suas identidades. Também foram detectados três esteroides derivados da desidrogenação do grupo 3β -hidroxila, resultando em uma carbonila no C-3. A estigmasta-4,22-dien-3-ona (**93**), β -sitostenona (**94**) e 4-campesten-3-ona (**96**) foram identificados com o auxílio do *software* da NIST.

Os esteroides **92** e **94** foram identificados em ao menos um dos espécimes de cada espécie, sendo que o **92** não foi detectado apenas nos extratos de DCM da *Copaifera*. O fitosterol **91** não foi detectado apenas no *Erythroxylum*. Os extratos **hL1** e **hL3** de *Leptolobium* apresentaram os seis esteroides identificados, sendo os únicos extratos que contiveram o esteroide **96**, e com área de elevada porcentagem, 19% e 25%, respectivamente.

3.5. Outras classes

Além das classes de substâncias já descritas, foram também identificados alguns compostos fenólicos em *Salvertia* (**69-74**) e nos extratos de DCM de *Erythroxylum* (**74**), com área relativa de 4-8% e ~1%, respectivamente. Exclusivamente **dS3** apresentou as seis substâncias fenólicas identificadas. Foram detectados apenas fenólicos simples, incluindo fenilpropanoides derivados de ácido cinâmico (C_6-C_3) e derivados do ácido benzóico (C_6-C_1), todos identificados por meio do *software* de pesquisa da NIST. O ácido cinâmico possui baixa polaridade e baixa solubilidade em água devido a sua estrutura

composta por uma pequena cadeia (C₃) insaturada de hidrocarboneto ligada a um anel benzeno (C₆). Mudanças na solubilidade nos derivados são resultado de substituições no anel. No caso do ácido ferúlico (**74**) – detectado em baixas concentrações nos extratos **dE1** (1,6%), **dE2** (1,3%), **dS1** (0,5%) e **dS3** (0,9%) – as substituições ocorrem em C4 por uma hidroxila e em C3 por um grupo metoxila. Este e outros ácidos derivados de ácido cinâmico raramente são encontrados na forma livre, estando geralmente esterificados com os ácidos quínico ou tartárico ou também derivados de carboidratos (Sova 2012). Nos extratos de DCM de *Salvertia* também foi detectado o álcool saturado do ácido ferúlico [álcool di-hidroconiferílico (**73**)]. A polimerização oxidativa de álcoois derivados de ácido cinâmico constituem a lignina (De *et al.* 2011). Hidroxicinamatos também são encontrados formando ligações covalentes com componentes alifáticos (ácidos graxos) da suberina, ou nos extrativos não poliméricos, designados como ceras associadas à suberina. O composto **74** é o ácido hidroxicinâmico mais comumente encontrado em associação com a suberina (Babel & Steinbüchel 2001; Graça 2010).

Ácidos hidroxicinâmicos também podem estar envolvidos na síntese de ácidos benzóicos (**71** e **72**). Em plantas, se conhecem mais de cinco rotas distintas de síntese de ácidos benzoicos, sendo a rota dos fenilpropanoides a mais tradicionalmente estudada. Esses metabólitos podem atuar nos vegetais na sinalização, defesa, resposta a estresse oxidativos ou incorporados na biossíntese de outras substâncias (Podstolski *et al.* 2002; Wildermuth 2006). Fenólicos C₆-C₁ – como a vanilina (**69**), siringaldeído (**70**), ácido vanílico (**71**) e ácido siríngico (**72**) – também podem ser obtidos da despolimerização da lignina ou da suberina (Abe *et al.* 2005; Graça 2010; Mota *et al.* 2016; Niu *et al.* 2021). Os quatro ácidos fenólicos citados foram detectados apenas nos extratos DCM de *Salvertia*.

Três outras substâncias, com identidade sugerida pela NIST, foram detectadas unicamente em *Salvertia*: o ácido úrico (**77**) e duas lactonas [3-hidroxidecano-5-lactona (**75**) e 4,8,12,16-tetrametil-heptadecan-4-olídeo (**76**)]. O ácido úrico (**77**), detectado em **dS2**, é gerado a partir da quebra de purinas

(Hafez *et al.* 2017). O composto **75** foi detectado em **ds2** e **ds3**. Todos os extratos de *Salvertia* apresentaram o composto **76**, com possível origem a partir da oxidação do α -tocoferol (Rontani *et al.* 2007).

3.6. *Copaifera langsdorfii* Desf.

Na Figura 1 estão apresentados os cromatogramas dos extratos de *C. langsdorfii*. No total foram detectados 43 compostos, com 41 nos extratos hexânicos e 10 em DCM. As porcentagens de área correspondente a cada metabólito detectado estão compiladas na Tabela 3.

Em Hex os ácidos graxos representaram grande porcentagem dos extratos, com 58% em **hC1** e 24% em **hC2**, sendo que, destes, 79% e 83%, respectivamente, corresponderam a ácidos saturados (Tabela 2). O ácido palmítico (**20**) foi o mais expressivo. Os ácidos saturados presentes foram os homólogos pares entre C₁₆ e C₂₈ (**20**, **22**, **24**, **26**, **28**, **30** e **32**), e o ácido margárico, de 17 carbonos (**21**). Dos ácidos insaturados detectados, um teve uma cadeia com C₁₉ carbonos (**8**) e três, com C₁₈. Dentre os C₁₈, o ácido linoleico (**4**) contém duas insaturações e o ácido oleico (**5**) e o composto **7** possuem uma dupla ligação. O ácido palmítico (**20**) foi o composto mais expressivo em **hC1** (21%) e o segundo em **hC2** (11%) (Figura 1; Tabela 3). Veiga Jr & Pinto (2006) identificaram a série homóloga de ácidos graxos composta de 14 a 28 carbonos nos extratos hexânicos de casca.

Apenas no extrato **hC2** foram detectados diterpenos, correspondendo a 42% da área total integrada. Extratos de *Copaifera* e sua óleo-resina (“óleo de copaíba”) sabidamente possuem grande diversidade de sesquiterpenos, principalmente o óleo volátil de diferentes partes da planta (p.e. folha, fruto, raiz, óleo-resina). A espécie também sintetiza grande abundância de diterpenos, com predomínio de ácidos, como ácido colavênico, ácido abiético, ácido daniélico, ácido *ent*-caurenóico (**84**) e ácido copálico (**88**) (Veiga Jr & Pinto 2006; Gelmini *et al.* 2013). As propriedades biológicas de *Copaifera* spp. são atribuídas a essas duas classes de metabólitos (Albuquerque *et al.* 2017). Em **hC2**, 12 dos picos possuem padrão de fragmentação típico de diterpenos e, se considerados os

casos como o espectro de **79**, que aparenta ser resultado da eluição de mais de um diterpeno simultaneamente, é possível contemplar a diversidade dessa classe em *C. langsdorffii*. Nessa amostra, o principal composto foi o **84** (15,6%; Tabela 3), além do **88** (6%; Tabela 3) com presença bastante marcante. Os compostos **84** e **88** foram identificados pela NIST como ácido isopimárico e copálico, respectivamente, porém a presença do fragmento $[M - 43]^+$ ao invés do $[M - 29]^+$ em **84** leva a concluir que se trata do ácido *ent*-caurenóico (Figura 1). Os diterpenos **84** e **88** também estiveram entre os constituintes majoritários do extrato de hexano de casca obtido por Veiga Jr & Pinto (2006). O estudo citado obteve também o ácido colavênico, não identificado no presente estudo.

Os ácidos *ent*-caurenóico (**84**) e copálico (**88**) estão entre os principais componentes ativos da óleo-resina de *C. langsdorffii* e de outras espécies do gênero. Do ácido *ent*-caurenóico (**84**) já foram demonstrados os efeitos: relaxante muscular, vaso relaxante, citotóxico (em eritrócitos e fibroblastos de roedores e células de leucemia, câncer de mama e colo), embriotóxico (embrião de ouriço do mar), anti-inflamatória, antibacteriana e tripanocida (Vieira *et al.* 2002a; Costa-Lotufo *et al.* 2002; Paiva *et al.* 2002; de Alencar Cunha *et al.* 2003; Tirapelli *et al.* 2004; Cavalcanti *et al.* 2006). O ácido copálico (**88**) é um produto característico de *Copaifera*, atuando como um biomarcador do gênero (Leandro *et al.* 2012). Dentre seus efeitos comprovados está a ação antibacteriana (contra bactérias associadas à cárie e periodontite), citotóxica (em células humanas de adenocarcinoma cervical e de mama, glioblastoma e eritrócitos), anti-inflamatória e tripanocida (Souza *et al.* 2011a, b; Izumi *et al.* 2012; Vargas *et al.* 2015; Abrão *et al.* 2015).

Sugestões de identidade de outros quatro ácidos diterpênicos (**85**, **86**, **87** e **89**) foram conjecturadas. O ácido 14,15-dinor-13-oxolabd-8(17)-en-19-óico (**86**), já foi descrito na óleo-resina de *C. langsdorffii* (de Melo *et al.* 2019). Não foi encontrado dentre os diterpenos descritos para o gênero nenhuma estrutura química que possa corresponder ao espectro do composto **87**. O espectro em questão indica massa molar de m/z 438, com presença de uma carboxila na região da cadeia lateral (supondo possuir esqueleto labdano) e hidroxila no anel

A, resultando numa fórmula plausível $C_{18}H_{30}O_3$. Assim, é possível que **87** se trate de um ácido hidroxi-dinor-labdenóico, com posição dos dois carbonos perdidos, carboxila e hidroxila indeterminados. É provável que a insaturação de **87** ocorra entre C-8 e C-17, visto que cinco norlabd-8(17)-enos já foram descritos no gênero (Leandro *et al.* 2012). O composto **85** foi identificado como ácido hidroxicaurenóico, a partir do seu espectro de massas [comparado com o material suplementar disponibilizado por Fernander *et al.* (2020)], não sendo possível determinar a localização da hidroxila. Não foram encontrados trabalhos na literatura com descrição da substância **85** no gênero *Copaifera* (Figura 1; Tabela 3). O Nivenolídeo (**89**), uma lactona diterpênica ácida, foi identificado com o auxílio da biblioteca da NIST, e já foi caracterizado da casca do fruto de *C. langsdorffii* (Lima Neto *et al.* 2008). Outros seis picos com fragmentação típica de diterpenos não foram identificados.

No extrato **hC1** não foram detectados diterpenos. Entretanto, 6% da área integrada correspondeu a álcoois graxos, classe não detectada em **hC2** (Tabela 2). Os álcoois graxos encontrados foram o tetracosanol (**65**) e hexacosanol (**66**). Outro composto somente detectado em **hC1** foi o **125**. É sugerida a identidade do **125** como ácido atrárico, uma substância aromática (C₆-C₁) com fórmula $C_{10}H_{12}O_4$ (Figura 1; Tabela 3).

Esteroides tiveram significativa presença nos extratos hexânicos, com 17% em **hC1** e 6% em **hC2** (Tabela 2). Os esteróis detectados em **hC1** foram aqueles comuns em vegetais - estigmasterol (**91**), β -sitosterol (**92**) e campesterol (**95**) – além de β -sitostenona (**94**) (Tabela 3; Figura 1). De **hC2** foi obtido apenas o composto **92**. Os compostos **91**, **92** e **95** foram descritos nos extratos hexânicos de casca por Veiga Jr & Pinto (2006). O metabólito **94**, foi relatado no extrato hexânico de folha de *Copaifera lutezelburgii* (Pascoal *et al.* 2020).

As extrações em *n*-hexano tiveram alto teor de triterpenos (16 e 28%) (Tabela 2), principalmente de ácido betulínico (**113**) e do composto **100** (não identificado, com possibilidade de ser uma mistura de triterpeno e esteroide), porém não se comparam aos extratos de DCM (96 e 100%). A composição

química de **dC1** apresentou nove terpenoides, enquanto em **dC3** apareceu apenas cinco, sendo que estes são os mesmos de **dC1** (Tabela 3). Pode ser que isto se deu devido ao resultado do critério de integração de picos utilizado e não da ausência desses em **dC3**. Nos dois extratos o esqueleto lupano foi predominante. O único triterpeno não ácido detectado foi a betulina (**111**) (Figura 1). Esse composto elui concomitantemente ao ácido betulônico (**112**), fenômeno observado também em *Leptolobium*. O principal metabólito dos extratos DCM foi o ácido betulínico (**113**), representando 43% de **hC1** e 73% de **hC3**, seguido do ácido platânico (**116**), com 30% em **hC1** e 15% em **hC3** (Tabela 3). O ácido betulínico (**113**) está entre os triterpenos mais estudados e é um componente majoritário de extratos de casca de espécies variadas, como por exemplo, *Betula* spp. (Liu *et al.* 2015), *Eucalyptus globulus* (Freire *et al.* 2002) e *C. langsdorffii* (Veiga Jr & Pinto 2006). Diversas atividades farmacológicas do ácido betulínico foram demonstradas, dentre elas anti-HIV, anticancerígena, antibacteriana, antimalárica, analgésica, anti-inflamatória e anti-helmíntica (Yogeeswari & Sriram 2005). Os relatos da presença de ácido platânico (**116**) em espécies vegetais estão mais concentrados em Myrtaceae, e por serem componentes minoritários, grande parte dos estudos dessa substância focam em sua síntese e de seus derivados a partir de ácido betulínico (**113**) (Khusnutdinova *et al.* 2021). As atividades biológicas de **116** incluem inibição da xantina oxidase (relacionada ao desenvolvimento de hiperuricemia e gota), citotóxica (contra cinco linhagens de células cancerígenas humanas) e anti-HIV (Fujioka *et al.* 1994; Nguyen & Nguyen 2013; Kahnt *et al.* 2018).

Outros triterpenos detectados em menor concentração em **dC1** e **dC3** foram o ácido olenólico (**105**) e ácido hidroxibetulínico (**117**) (posição da hidroxila indeterminada), além dos terpenos não identificados **97**, **100** e **118** (Tabela 3; Figura 1). A enorme maioria dos estudos fitoquímicos em *Copaifera* relatam seus sesquiterpenos e diterpenos, pouco sendo publicado sobre os triterpenos. Dos estudos com a espécie já foram detectados, na casca, os triterpenos ácido betulínico (também detectado no presente estudo), lupeol (Veiga Jr & Pinto 2006) e acetato de lupeíla (Salatino *et al.* 2020). Kato *et al.* (2021) obtiveram um triterpeno do extrato DCM da folha com fórmula $C_{30}H_{46}O_3$, porém esse não pôde

ser caracterizado. Outros triterpenos relatados no gênero incluem lupenona, β -amirina, β -amirona, epitaraxerol, friedelina, taraxasterol e acetato de taraxasterol (Pascoal *et al.* 2020).

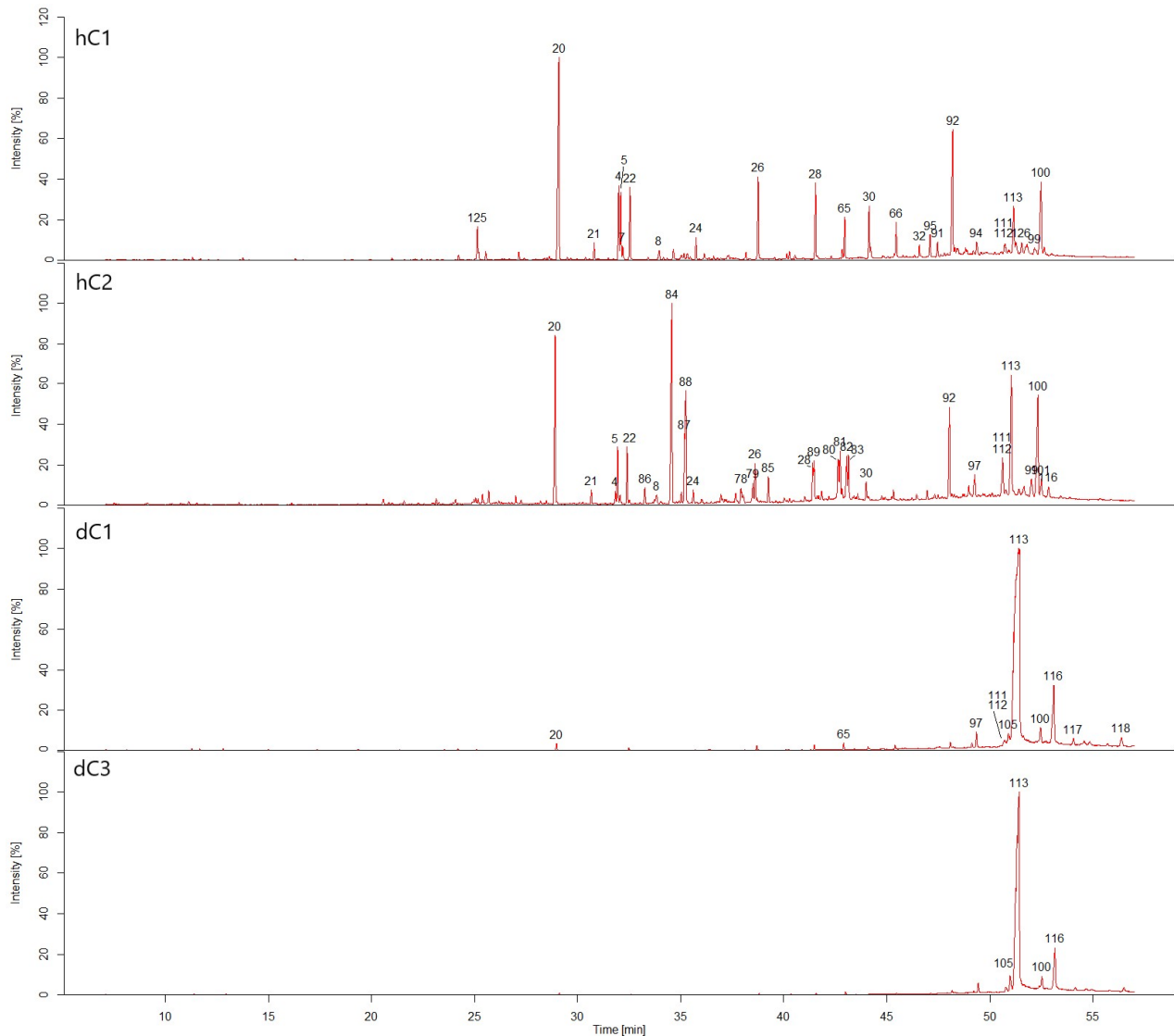


Figura 1. Cromatogramas obtidos por CG/EM dos extratos em Hex (**hC1** e **hC2**) e em DCM (**dC1** e **dC3**) de *Copaifera langsdorffii* com sugestão de identificação de seus constituintes. Os números são correspondentes aos compostos listados na Tabela 1.

Tabela 3. Metabólitos detectados nos extratos Hex (**hC1** e **hC2**) e DCM (**dC1** e **dC3**) de *C. langsdorffii*, com tempo de retenção médio (TR), classe e área relativa (%). (-) não determinado; (--) compostos não detectado pelos critérios de integração adotados.

*	TR	Classe	hC1	hC2	dC1	dC3
125	25.14	-	2.4	--	--	--
20	28.99	Ácido graxo (s)	21.5	10.6	1.9	--
21	30.73	Ácido graxo (s)	1.1	0.7	--	--
4	31.91	Ácido graxo (i)	5.2	0.7	--	--
5	32.02	Ácido graxo (i)	4.8	2.9	--	--
7	32.19	Ácido graxo (i)	1.0	--	--	--
22	32.47	Ácido graxo (s)	5.2	3.0	--	--
86	33.27	Diterpeno	--	0.9	--	--
8	33.90	Ácido graxo (i)	1.0	0.7	--	--
84	34.57	Diterpeno	--	15.6	--	--
87	35.20	Diterpeno	--	3.4	--	--
88	35.24	Diterpeno	--	6.0	--	--
24	35.68	Ácido graxo (s)	1.5	0.6	--	--
78	37.93	Diterpeno	--	1.1	--	--
79	38.49	Diterpeno	--	1.3	--	--
26	38.68	Ácido graxo (s)	6.3	1.8	--	--
85	39.25	Diterpeno	--	1.4	--	--
28	41.48	Ácido graxo (s)	5.6	2.0	--	--
89	41.46	Diterpeno	--	2.0	--	--
80	42.64	Diterpeno	--	2.6	--	--
81	42.74	Diterpeno	--	2.6	--	--
65	42.93	Álcool graxo	3.2	--	1.7	--
82	43.05	Diterpeno	--	2.4	--	--
83	43.14	Diterpeno	--	2.4	--	--
30	44.07	Ácido graxo (s)	3.8	1.1	--	--
66	45.45	Álcool graxo	2.4	--	--	--
32	46.57	Ácido graxo (s)	0.9	--	--	--
95	47.10	Esteróide	1.8	--	--	--
91	47.45	Esteróide	1.1	--	--	--
92	48.12	Esteróide	12.4	5.6	--	--
97	49.30	Triterpeno	--	1.5	4.8	--
94	49.36	Esteróide	1.4	--	--	--
111	50.68	Triterpeno	1.2	3.0	1.9	--
112	50.68	Triterpeno	--	--	4.7	5.3
105	50.94	Triterpeno	5.0	10.0	42.8	76.1
113	51.17	Triterpeno	1.0	--	--	--
126	51.55	-	1.0	--	--	--
99	52.09	Triterpeno	1.0	1.5	--	--
100	52.45	Triterpeno	9.2	9.5	5.7	3.7
101	52.49	Triterpeno	--	1.3	--	--
116	53.03	Triterpeno	--	0.9	29.5	14.8
117	54.05	Triterpeno	--	--	2.3	--
118	56.39	Triterpeno	--	--	4.7	--

(s) saturado; (i) insaturado. * Código correspondente às substâncias listadas na Tabela 1.

Um ponto a ser discutido é a presença unicamente de diterpenos no extrato **hC1**. O “óleo-de-copaíba” é rico em diterpenos e localiza-se em canais secretores em todas as partes da árvore. Entretanto, essa estrutura é mais expressiva no caule, mais especificamente no xilema secundário (Veiga Jr & Pinto 2002; Rodrigues & Machado 2009). Numerosas cavidades secretoras

também foram encontradas no floema por Carmo *et al.* (2016), em um estudo anatômico da casca de *C. langsdorffii*. Entretanto, não foram realizados testes histoquímicos para a determinação da composição da secreção. Caracterizações histoquímicas do conteúdo de canais secretores do caule de *Copaifera trapezifolia*, em início de desenvolvimento secundário, revelam a presença de resinas e substâncias lipofílicas nos canais da região do córtex (Milani *et al.* 2012). A suposição da presença de diterpenos nessa secreção seria uma possível explicação para a diferença de composição entre **hC1** e **hC2**. A descrição da casca de *C. langsdorffii* por Costa *et al.* (1997) expõe a presença de um limite bastante demarcado, no caule da espécie, entre o floema não colapsado e a região externa (constituída pelo ritidoma e floema colapsado). O material utilizado na extração dos dois espécimes, no presente estudo, foi a região mais externa e “destacável” da casca desses indivíduos, e diferenças na quantidade de floema (colapsado) e estruturas secretoras integrados na amostra poderiam, então, afetar a presença de diterpenos. As diferenças também podem ser resultado da típica variação na produção dos metabólitos em razão de variáveis relacionadas à planta (fisiologia, genética) ou ambientais (clima, solo) (Santos *et al.* 2022).

3.7. *Leptolobium elegans* Vogel

De *L. elegans* foram detectadas 51 substâncias lipofílicas, das quais 49 presentes em extratos Hex e 15 em DCM, como mostram os cromatogramas da Figura 2. A relação entre cada substância, seu tempo de retenção médio e área relativa em cada extrato de *L. elegans* está apresentada na Tabela 4.

Nos extratos hexânicos, de uma maneira geral, as classes predominantes foram ácidos graxos, esteroides e triterpenos. Entretanto, o extrato **hL2** apresentou perfil bastante diferente de **hL1** e **hL3** (Figura 2). Os três extratos apresentaram alta porcentagem de ácidos graxos, com 46% (**hL1**), 60% (**hL2**) e 30% (**hL3**) (Tabela 2). Os ácidos graxos detectados incluem a série homóloga com número de carbonos par, variando de 10 a 26 (**17-20**, **22**, **24**, **26**, **28** e **30**), mais o ácido C₂₃ (**27**) em pequenas concentrações em **hL1** e **hL3**

(Tabela 4). Os principais ácidos de **hL1** e **hL3** foram o palmítico (C₁₆, **20**), docosanóico (C₂₂, **26**) e lignocérico (C₂₄, **28**), além do esteárico (C₁₈, **22**) também bastante expressivo. Esses ácidos também estiveram presentes em **hL2**, porém **26** e **28** em menor proporção. O extrato **hL2** se diferenciou dos outros dois extratos hexânicos porque nesse espécime os ácidos graxos de cadeia mais curta (entre 12 e 16 carbonos; **18** a **20**) foram predominantes, sendo, o único em que foi obtido o ácido cáprico (C₁₀, **17**); também não foi detectado em **hL2** o ácido cerótico (C₂₆, **30**) (Figura 2; Tabela 4). Os ácidos **18**, **19** e **20** correspondem a mais de 44% da área integrada do cromatograma de **hL2**, representando cerca de 75% dos ácidos graxos detectados (Tabela 4). Nos extratos dos **espécimes 1** e **3** o conteúdo desses ácidos foi inferior a 1%. Similarmente, Kadu *et al.* (2012) observaram que em cascas de espécies de *Prunus* há uma grande variação no conteúdo dos ácidos **18** e **19** em amostras de uma mesma população. Em *L. elegans* é marcante a presença dos ácidos insaturados oleico (**5**) e linoleico (**4**) (Tabela 4; Figura 2).

Em *Leptolobium* foram detectados também quatro α,ω -diácidos: ácido octadecenedióico (**35**), azelaico (**37**), hexadecanodióico (**38**) e octadecanodióico (**39**). Essa classe teve porcentagem de área semelhante entre os três extratos hexânicos, com cerca de 4% em **hL1** e **hL2** e 6% em **hL3** (Tabela 2). O diácido **38** (C₁₆) foi detectado nos três espécimes, com destaque para os **espécimes 1** e **3**. Em relação aos hidroxiácidos, foi identificado apenas o ácido 16-hidrohexadecanóico (**23**) em baixas concentrações (inferior a 1%) em **hL1** e **hL3**, além do 18-hidroxioléico (**12**) em **hL2** (3%) (Figura 2; Tabela 4). Os álcoois graxos foram pouco significantes em **hL2** e **hL3**, somando menos de 1% desses extratos (Tabela 2). Somente tetracosanol (**64**) foi detectado em ambos (Figura 2). Essa classe foi mais pronunciada em **hL1** (5%), contendo além de **64** como principal álcool, os álcoois primários docosanol (**63**) e hexacosanol (**65**) (Tabela 4). Os ésteres docosanoato de etila (**48**) e tetracosanoato de etila (**50**) foram encontrados também somente em **hL1** (Figura 2).

Os extratos **hL1** e **hL3** apresentaram alta porcentagem de esteroides, correspondente a, respectivamente, 19% e 25% da área do cromatograma

considerada, enquanto em **hL2** essa classe correspondeu a menos de 3% da área total (Tabela 2). Os esteróis detectados foram os de ocorrência comum em plantas: campesterol (**95**), estigmasterol (**91**) e β -sitosterol (**92**). O composto **91** corresponde a um dos principais picos de **hL1** (8% de área), juntamente com os ácidos **26**, **28** e **20** (Figura 2; Tabela 4). Em **hL3**, o β -sitosterol (**92**) é predominante (10%) (Tabela 4). Foram detectados também três esteróis com grupo cetona em C3, são esses: estigmasta-4,22-dien-3-ona (**93**), β -sitostenona (**94**) e 4-campesten-3-ona (**96**) em menor concentração (Tabela 4). O composto **96** coeluiu com outra substância não identificada (Figura 2).

Os triterpenos compõem também uma alta porcentagem dos extratos **hL1**, **hL2** e **hL3**, respectivamente, 13%, 18% e 24% (Tabela 2). Predominam os triterpenos de esqueleto lupano, principalmente o ácido betulínico (**113**). Outros metabólitos da classe incluem lupenona (**108**), lupeol (**109**), betulina (**111**), ácido betulônico (**112**) e dois prováveis lupoanos não identificados (**110** e **114**) (Figura 2). Há dúvidas quanto a identificação do composto **98**, detectado nos extratos Hex. O fragmento m/z 262 (formado pelos anéis E, D e parte do C) no seu espectro indica a provável presença de esterificação da carboxila do C28 (posição na maioria dos triterpenos ácidos) e, considerando a intensidade do íon m/z 189, infere-se a ausência de insaturação no anel C. A partir dessas conjecturas, somada à delimitação do fragmento m/z 468 como íon molecular, é inferida a fórmula $C_{31}H_{48}O_3$. A princípio, devido à prevalência do esqueleto lupano nas amostras e presença do íon m/z 189, típico de espectros desse grupo, foi ponderada a possibilidade de **98** se tratar do metil betulonato, mas há carência de literatura a respeito dessa substância para sustentar essa afirmação. Ademais, esse mesmo padrão de fragmentação foi observado no metil moronato por Budzikiewicz (1963). Assim como em *C. langsdorffii*, os compostos **111** e **112** foram coeluídos na cromatografia. Os ácidos oleanólico (**105**) e ursólico (**122**) foram detectados em pequenas concentrações nesses extratos (Tabela 4). Dos extratos hexânicos, **hL3** apresentou o maior conteúdo terpênico (triterpenos e esteroides), totalizando 48% da área, comparado a 32 e 21% dos demais extratos (Tabela 2).

A composição dos extratos DCM de *L. elegans*, similarmente à *Copaifera*, foi majoritariamente triterpênica, representando 84%, 54% e 88% de **dL1**, **dL2** e **dL3**, respectivamente (Tabela 2). O ácido betulínico (**113**) foi particularmente dominante. A outra classe de metabólitos detectada nesses extratos são os esteroides (9%, 11% e 9%), incluindo **91**, **92** e **95** (Figura 2; Tabela 2). O composto não identificado **128** e o diácido **38** foram observados nos seis extratos da espécie. Os cromatogramas dos três extratos DCM exibiram maior semelhança entre si que os hexânicos; porém, novamente o **espécime 2** apresentou algumas diferenças (Figura 3). Em **dL2** além dos terpenos (65%), algumas substâncias extraídas em hexano nos **espécimes 1** e **3**, foram detectadas apenas em diclorometano: diácido **35**, hidróxiácido **23**, ácido oleico (**5**) e esteroides (**91**, **92** e **95**). O composto **12** foi detectado apenas em **dL2**. Em **dL1** e **dL3** o conteúdo terpênico foi superior a 90% (Tabela 2).

Poucos estudos foram realizados com *L. elegans* e desses, a grande maioria abrangeram extratos alcaloídicos. De extratos da casca dessa espécie foram já identificados os terpenos β -sitosterol (**92**), estigmasta-4,22-dien-3-ona (**93**), β -sitostenona (**94**), lupenona (**108**) e lupeol (**109**) (Vieira *et al.* 2002b; Salatino *et al.* 2020). O ácido betulínico (**113**) e o lupeol (**109**) foram já isolado da casca do caule de *Leptolobium bijugum*, antigo *Acosmium bijugum* (Silva *et al.* 2001). Os compostos **91**, **92**, **95**, **108** e **109** foram obtidos também da casca da raiz de outra espécie do gênero, *Leptolobium dasycarpum* (sinônimo: *Acosmium dasycarpum*) (Figueiredo 2009).

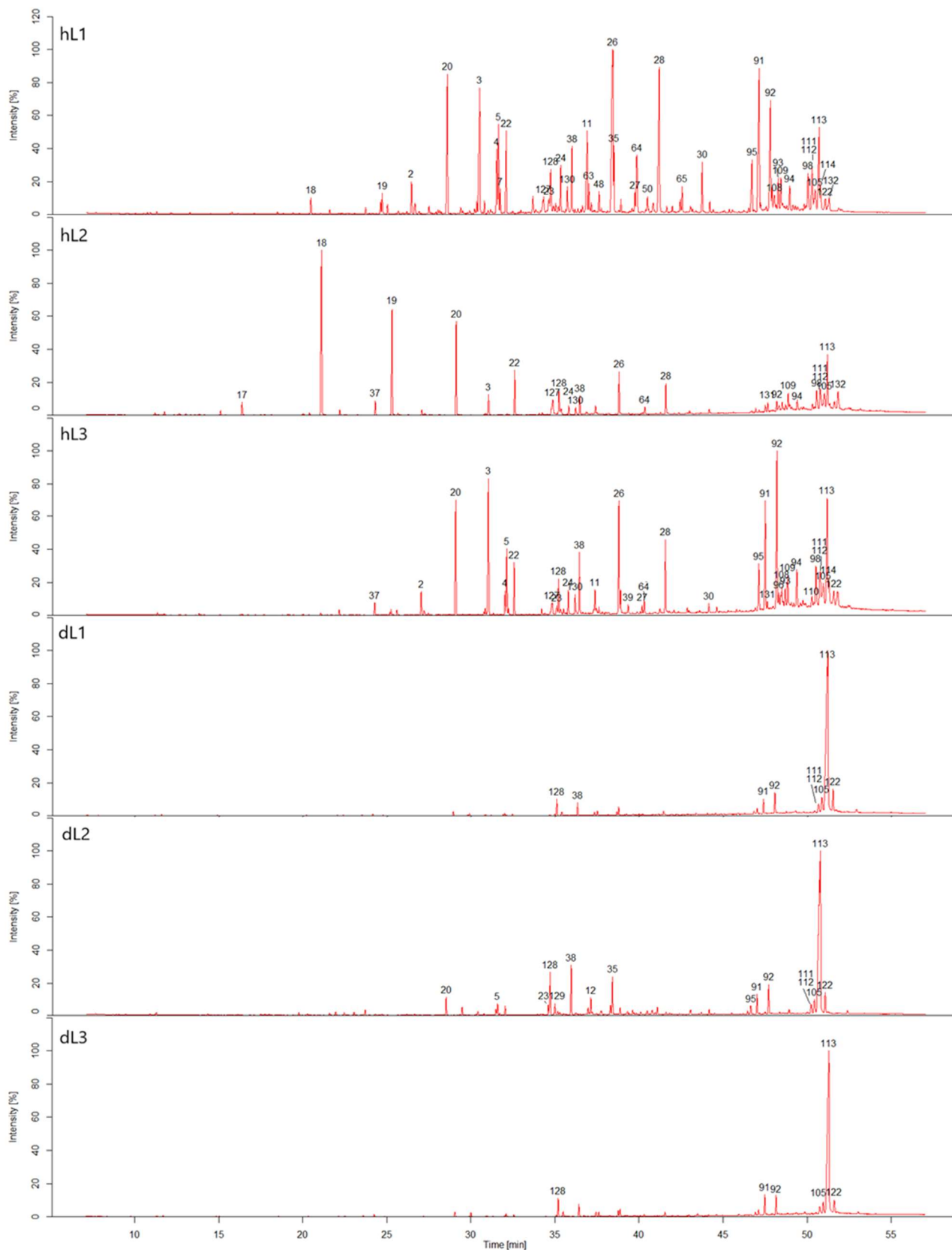


Figura 2. Cromatogramas obtidos por CG/EM dos extratos em Hex (**hL1**, **hL2** e **hL3**) e em DCM (**dL1**, **dL2** e **dL3**) de *Leptolobium elegans*, com sugestão de identificação de seus constituintes. Os números são correspondentes aos compostos listados na Tabela 1.

Tabela 4. Metabólitos detectados nos extratos Hex (**hL1**, **hL2** e **hL3**) e DCM (**dL1**, **dL2** e **dL3**) de *L. elegans*, com tempo de retenção médio (TR), classe e área relativa (%). (-) não determinado; (--) compostos não detectado pelos critérios de integração adotados.

*	TR	Classe	hL1	hL2	hL3	dL1	dL2	dL3
17	16.36	Ácido graxo (s)	--	1.6	--	--	--	--
18	20.77	Ácido graxo (s)	0.6	21.6	--	--	--	--
37	24.26	α,ω -diácido (s)	--	1.6	0.7	--	--	--
19	24.98	Ácido graxo (s)	0.7	12.2	--	--	--	--
2	26.72	Ácido graxo (i)	1.1	--	1.4	--	--	--
20	28.80	Ácido graxo (s)	6.0	10.6	6.6	--	3.1	--
3	30.84	Ácido graxo (i)	6.3	2.5	8.9	--	--	--
4	31.75	Ácido graxo (i)	2.5	--	1.2	--	--	--
5	31.76	Ácido graxo (i)	3.3	--	3.6	--	2.0	--
7	31.71	Ácido graxo (i)	0.8	--	--	--	--	--
22	32.39	Ácido graxo (s)	2.7	4.6	2.7	--	--	--
127	34.65	-	0.5	3.7	1.4	--	--	--
23	34.75	ω -hidroxiácido (s)	0.7	--	0.7	--	1.8	--
128	35.01	-	1.7	3.2	2.1	3.9	7.2	3.7
129	34.97	-	--	--	--	--	2.4	--
24	35.62	Ácido graxo (s)	1.6	1.0	1.3	--	--	--
130	36.02	-	1.0	0.9	1.2	--	--	--
38	36.22	α,ω -diácido (s)	2.3	1.9	3.2	3.1	9.3	--
11	37.11	Ácido graxo (i)	3.9	--	1.4	--	--	--
63	36.98	Álcool graxo	1.1	--	--	--	--	--
48	37.59	Éster graxo	0.7	--	--	--	--	--
12	37.09	ω -hidroxiácido (i)	--	--	--	--	2.8	--
26	38.65	Ácido graxo (s)	11.6	4.6	7.1	--	--	--
35	38.58	α,ω -diácido (i)	1.8	--	1.2	--	6.8	--
39	39.32	α,ω -diácido (s)	--	--	0.5	--	--	--
27	39.94	Ácido graxo (s)	0.6	--	0.4	--	--	--
64	40.14	Álcool graxo	3.1	1.0	0.7	--	--	--
50	40.47	Éster graxo	0.7	--	--	--	--	--
28	41.42	Ácido graxo (s)	8.5	3.5	4.3	--	--	--
65	42.53	Álcool graxo	0.9	--	--	--	--	--
30	43.92	Ácido graxo (s)	1.9	--	0.5	--	--	--
95	46.79	Esteróide	2.5	--	3.0	--	1.8	--
91	47.28	Esteróide	8.4	--	6.9	3.9	3.6	4.4
131	47.61	-	--	1.1	0.4	--	--	--
92	48.00	Esteróide	5.4	1.1	10.1	5.5	5.7	4.2
96	48.07	Esteróide	0.7	--	0.8	--	--	--
108	48.24	Triterpeno	0.6	--	0.8	--	--	--
93	48.46	Esteróide	1.2	--	1.0	--	--	--
109	48.69	Triterpeno	1.1	1.8	2.0	--	--	--
94	49.22	Esteróide	1.1	1.5	2.7	--	--	--
110	50.24	Triterpeno	--	--	0.8	--	--	--
98	50.35	Triterpeno	1.8	3.0	3.0	--	--	--
111	50.52	Triterpeno	2.4	4.0	3.9	3.3	2.5	--
112	50.52	Triterpeno	2.4	4.0	3.9	3.3	2.5	--
105	50.76	Triterpeno	1.0	2.5	1.8	5.5	4.0	3.5
113	51.02	Triterpeno	3.9	6.9	8.7	68.3	42.6	80.6
114	51.01	Triterpeno	1.1	--	1.9	--	--	--
122	51.35	Triterpeno	0.6	--	1.1	6.5	4.5	3.7
132	51.55	-	0.7	3.9	--	--	--	--

(s) saturado; (i) insaturado. * Código correspondente às substâncias listadas na Tabela 1.

3.8. *Erythroxylum suberosum* A. St.-Hil

Foram detectadas no total 38 substâncias nos extratos de casca de *E. suberosum*, das quais 24 em extratos hexânicos e 32 em DCM. Apesar do maior número de metabólitos dos extratos de DCM, parte deles possui baixa concentração e foi detectado em apenas um dos espécimes. Se contabilizados apenas os picos integrados em comum entre os espécimes, são totalizadas 17 substâncias em Hex e 15 em DCM. Os cromatogramas obtidos estão apresentados na Figura 3, seguido da Tabela 5 com a relação entre cada substância, tempo de retenção e área relativa em cada extrato de *E. suberosum*.

O perfil cromatográfico de **hE1** e **hE2** foi similar, constituídos principalmente de ácidos graxos saturados (respectivamente 57% e 50%) e triterpenos (entre 34% e 35%) (Tabela 2) Apesar da semelhança no conteúdo e diversidade de triterpenos, em **hE1** predominam os triterpenos ácidos com uma acetila em C3, identificados como ácido acetil-oleanólico (**106**), acetil-betulínico (**115**) e acetil-ursólico (**123**). Os triterpenos com um grupo cetona em C3, incluindo a β -amirona (**103**) e α -amirona (**119**), prevalecem em **hE2**. Os principais triterpenos de ambos os extratos são da classe dos ursanos (**123** e **119**) (Tabela 5). O ácido acetil-ursólico (**123**) possui atividade antimicrobiana e efeitos anti-hiperglicêmico e anti-hiperlipidêmico (Abu-Gharbieh & Shehab 2017). A β -amirona (**119**), juntamente com a α -amirona, possui atividade anti-inflamatória (de Almeida *et al.* 2015).

Foram detectados também, em menores concentrações, outros triterpenos ácidos, portando em C3 ou um grupo cetona – ácidos oleanônico (**104**), betulônico (**112**) e ursônico (**121**) –, ou hidroxila – ácidos oleanólico (**105**), betulínico (**113**) e ursólico (**122**) –, além da α -amirina (**120**), com apenas a função álcool (Tabela 5). Nos extratos **dE1** e **dE2**, os triterpenos apresentaram 35% e 48% de área relativa, respectivamente. Valores superiores aos obtidos para ácidos graxos (34% e 27%) (Tabela 5). Foram identificados somente triterpenos ácidos em **dE1** e **dE2**. O ácido ursólico (**122**) foi majoritário nesses extratos, seguido do ácido oleanólico (**105**) (Tabela 5). O ácido ursólico (**122**) possui uma ampla variedade de atividades biológicas de interesse, incluindo anticancerígena

(em diferentes tipos celulares), antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana e antidiabética, comprovadamente afetando diferentes fatores de transcrição, citocinas, enzimas e receptores do organismo de animais (Khwaza *et al.* 2020). Estudos demonstram diversos efeitos farmacológicos do ácido oleanólico (**105**), como hepatoprotetor, antioxidante, anti-hiperlipidêmico, antitumoral, anti-inflamatório e antimicrobiano (Ayeleso *et al.* 2017). Demais triterpenos detectados em ambos os extratos incluem os ácidos betulínico (**113**), ursônico (**121**) e acetil-ursólico (**123**) (Figura 3; Tabela 5).

Os ácidos graxos extraídos de *E. suberosum* são essencialmente saturados. Foram detectados o ácido palmítico (**20**) e heneicosanóico (**25**), além da série homóloga par variando de 20 a 26 carbonos (**24**, **26**, **28** e **30**) (Figura 3; Tabela 5). Os ácidos docosanóico (**26**) e lignocérico (**28**) somados correspondem a mais de 40% da área contabilizada dos cromatogramas de **hE1** e **hE2** (Tabela 5). Pouco foi extraído de **24** e **30** com DCM. A classe dos ácidos dicarboxílicos, mais especificamente o ácido hexadecanodióico (**38**), representa pouco mais de 4% da área integrada dos extratos hexânicos (Tabela 5). Essa porcentagem acresce para 10% (**dE1**) e 15% (**dE2**) nos extratos de DCM, contendo também outros dois diácidos menos expressivos (**35** e **37**) (Tabela 5). Um pequeno pico em **dE1** foi identificado como o ácido 22-hidroxicosanóico (**29**) (Figura 3). Unicamente em DCM foi extraído o monoacilglicerídeo do ácido docosanóico (**61**), que coeluiu com o ácido 22-hidroxicosanóico (**31**) (Figura 4). Outros compostos apenas detectados nos extratos DCM foram o glicerol (**1**) e o ácido ferúlico (**74**), ambos com baixa intensidade (inferior a 2%) (Tabela 5).

Os esteroides foram pouco expressivos na casca de *E. suberosum* se comparado às outras espécies, com área relativa inferior a 8% em Hex e a 5% em DCM (Tabela 2). Em Hex foram detectados o β -sitosterol (**92**) e sitostenona (**94**). Apenas **92** foi detectado nos extratos DCM (Tabela 5). Álcoois graxos foram pouco presentes nos seis extratos, com pequena porcentagem de tetracosanol (**64**) (Tabela 5). Na cromatografia de **dE1**, alguns pequenos compostos derivatizados, de cadeia de 5 a 6 carbonos e padrão de fragmentação semelhantes (**133** a **138**), eluíram logo no início da metodologia (Figura 3).

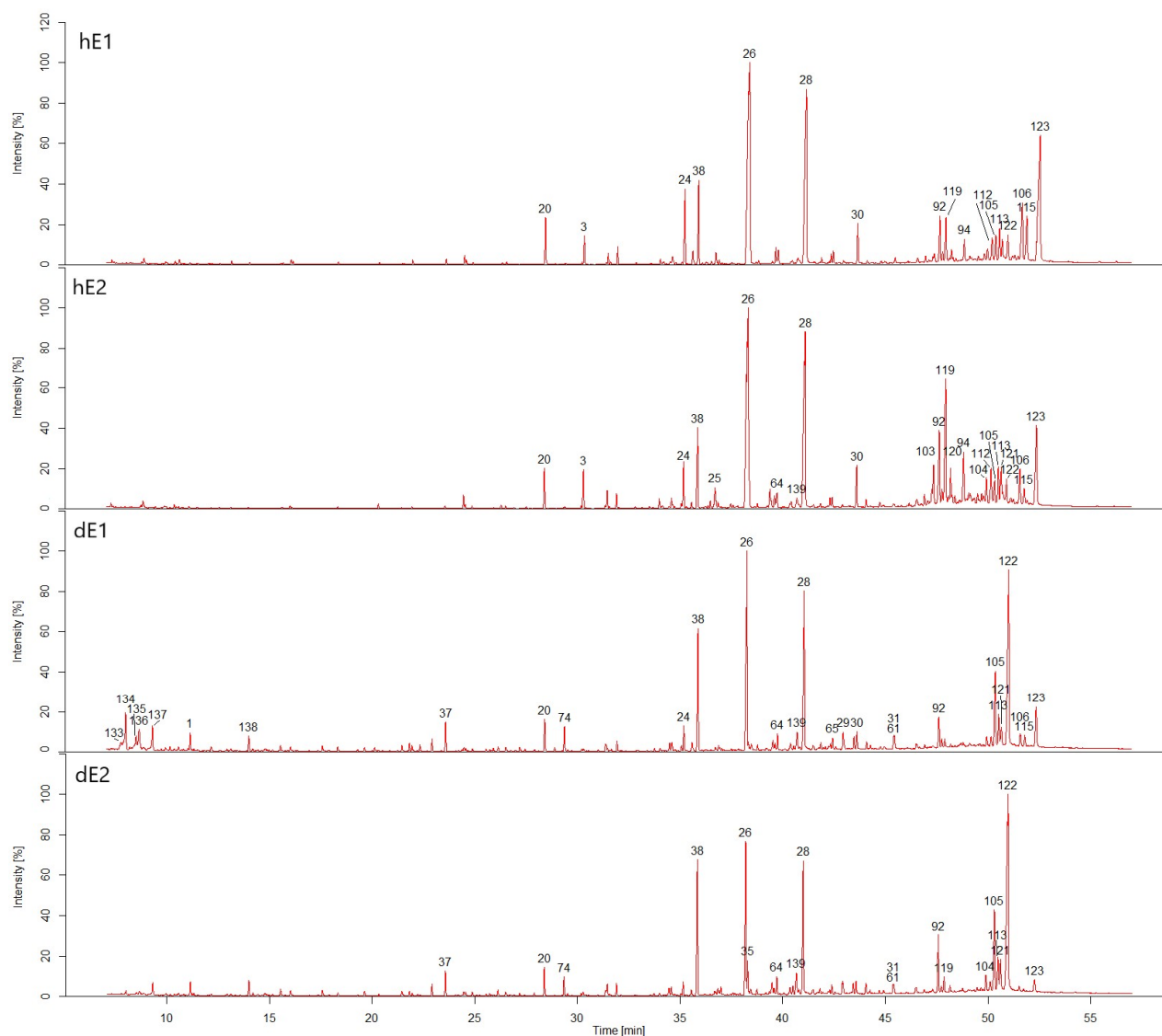


Figura 3. Cromatogramas obtidos por CG/EM dos extratos em Hex (**hE1** e **hE2**) e em DCM (**dE1** e **dE2**) de *Erythroxylum suberosum*, com sugestão de identificação de seus constituintes. Os números são correspondentes aos compostos listados na Tabela 1.

Assim como *L. elegans*, a maioria dos estudos do gênero *Erythroxylum* focam nos alcaloides, particularmente na classe dos tropânicos. Entretanto, poucos dos estudos com *E. suberosum* detectaram alcaloides na espécie, sendo relatados somente em folhas (Lucas-Filho 2009; Nascimento 2014; Oliveira *et al.* 2015). Outra classe de interesse no gênero são os diterpenos. Dos galhos de *E. suberosum* já foram relatados diferentes diterpenos de esqueleto abietano e *ent-*kaurano. Nos extratos lipofílicos de casca do presente estudo não foram obtidos compostos de nenhuma das classes citadas. Dentre os terpenos identificados, já foram relatados na casca ou caule de *E. suberosum* o estigmasterol (**91**), β -

sitosterol (**92**), β -amirina (**102**), sitostenona (**94**) e campesterol (**95**) (Nascimento 2014; Salatino *et al.* 2020). O ácido olenólico (**105**), β -amirina (**102**) e α -amirina (**120**) já foram relatados em extratos de folhas de outras espécies do gênero (Barreiros *et al.* 2002, 2005; Ribeiro *et al.* 2013).

Tabela 5. Metabólitos detectados nos extratos Hex (**hE1** e **hE2**) e DCM (**dE1** e **dE3**) de *E. suberosum*, com tempo de retenção médio (TR), classe e área relativa (%). (-) não determinado; (--) compostos não detectado pelos critérios de integração adotados.

*	TR	Classe	hE1	hE2	dE1	dE2
133	7.82	Diálcool ou Hidroxiácido	--	--	0.93	--
134	8.04	Diálcool ou Hidroxiácido	--	--	2.44	--
135	8.55	Diálcool ou Hidroxiácido	--	--	1.4	--
136	8.69	Diálcool ou Hidroxiácido	--	--	2.13	--
137	9.34	Diálcool	--	--	2.34	--
1	11.18	Poliol	--	--	1.06	--
138	14.04	Diálcool	--	--	0.96	--
37	23.60	α,ω -diácido (s)	--	--	1.74	1.66
20	28.43	Ácido graxo (s)	2.396	1.8	1.93	1.96
74	29.38	Fenólico (C ₆ -C ₃)	--	--	1.63	1.3
3	30.36	Ácido graxo (i)	1.52	1.95	--	--
24	35.24	Ácido graxo (s)	3.895	2.19	1.5	--
38	35.90	α,ω -diácido (s)	4.124	4.4	8.58	10.48
25	36.73	Ácido graxo (s)	--	1.54	--	--
26	38.32	Ácido graxo (s)	28.34	23.81	15.64	13.66
35	38.29	α,ω -diácido (i)	--	--	--	2.43
64	39.75	Álcool graxo	--	1.05	1.03	1.34
139	40.71	-	--	1	1.58	2.22
28	41.10	Ácido graxo (s)	19.837	18.05	12.43	11.23
65	42.46	Álcool graxo	--	--	0.78	--
29	42.97	ω -hidroxiácido (s)	--	--	1.61	--
30	43.66	Ácido graxo (s)	2.084	2.03	1.21	--
31	45.41	ω -hidroxiácido (s)	--	--	1.55	1.22
61	45.41	Monoacilglicerol	--	--	1.55	1.22
103	47.37	Triterpeno	--	2.19	--	--
92	47.64	Esteróide	2.548	4.59	2.21	4.35
119	47.94	Triterpeno	2.7	9.05	--	1.27
120	48.21	Triterpeno	--	1.42	--	--
94	48.86	Esteróide	1.274	2.76	--	--
104	49.92	Triterpeno	--	1.61	--	1.42
112	50.20	Triterpeno	1.415	2.29	--	--
105	50.37	Triterpeno	1.61	1.49	6.49	8.01
113	50.54	Triterpeno	2.119	2.13	2.51	3.19
121	50.65	Triterpeno	--	1.96	1.58	2.96
122	50.98	Triterpeno	1.605	1.5	18.61	29.86
106	51.63	Triterpeno	4.959	2.37	1.15	--
115	51.85	Triterpeno	3.478	1.11	0.89	--
123	52.40	Triterpeno	16.095	7.72	4.07	1.43

(s) saturado; (i) insaturado. * Código correspondente às substâncias listadas na Tabela 1.

3.9. *Salvertia convallariodora* A. St.-Hil

Os resultados da cromatografia de *S. convallariodora* estão apresentados na Figura 4 e Tabela 6. Foram detectados 89 compostos, dos quais 58 em Hex e 67 em DCM. Os três extratos de Hex e DCM apresentaram 29 e 36 substâncias em comum, respectivamente. A composição química dos extratos de *Salvertia* é típica de ceras associadas a suberina, sendo um possível indicativo de uma casca externa rica em suberina.

As extrações em ambos os solventes resultaram em uma alta diversidade de compostos, os ácidos graxos representando de 28 a 42% do total (Tabela 2). Os ácidos graxos saturados detectados foram o ácido nonanóico (**14**) e a série homóloga par de C₁₄ a C₃₀ (**19, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34**). Os principais ácidos foram o palmítico (**20**), lignocérico (**28**) e cerótico (**30**), exceto **ds3**, em que o composto **20** foi menos expressivo (Tabela 6). Os ácidos insaturados foram marcantes nos extratos Hex de *Salvertia*, com porcentagens superiores de C₁₈ insaturado (**4 e 5**) que o correspondente saturado (**22**). Os extratos hexânicos apresentaram alta porcentagem de diácidos (**35 a 39**), principalmente de ácido octadecenodióico (**35**) e hexadecanodióico (**38**), com destaque para o **espécime 3**, representando quase 20% da área em DCM e o único com mais de 2% dessa classe em *n*-hexano (Tabela 2). Os hidroxiácidos (**12, 15, 16, 23, 29, 31, 33, 36**) representaram uma boa parcela desses extratos (4-8%), novamente com destaque para o **espécime 3** (Tabela 6). Em DCM foram detectados dois monoacilglicerídeos (**60 e 62**), com área inferior a 2%.

Um diferencial dos extratos de *S. convallariodora* foi a presença marcante de álcoois graxos, especialmente o octacosanol (**66**), seguido do hexacosanol (**65**) e triacontanol (**68**). Variando de 12% a 24%, foi a segunda classe mais expressiva em *Salvertia*, com exceção de **hs2** e **ds3** (Tabela 2). Foram detectados também o tetracosanol (**64**) e nonacosanol (**67**) (Tabela 6). Outra contraposição de *S. convallariodora* em relação às outras espécies foi a diversidade e abundância de ésteres de ácido graxo. Nesse grupo são incluídos ésteres metílicos (**40-43, 47, 49, 51, 53, 54**) e etílicos (**50 e 52**) de ácidos saturados, ésteres metílicos de hidroxiácidos (**44-46**), monoésteres metílicos (**58**

e **59**) e diésteres metílicos (**56** e **57**) de diácidos graxos (Figura 4; Tabela 6). A presença dessa classe foi marcante nos extratos Hex, especialmente em **S2**, com 23% de área relativa em **hS2** (frente aos 10% em **hS1** e **hS3**), além de mais de 7% em **dS2** (**dS1** e **dS3** com menos de 2%) (Tabela 6).

Os esteroides também compreenderam os componentes de importância nos extratos de *S. convallariodora*. Exceto em **dS2** e **dS3**, os esteroides representaram mais de 11% da composição desses extratos, incluindo estigmasterol (**91**), β -sitosterol (**92**), estigmasta-4,22-dien-3-ona (**93**) e β -sitostenona (**94**). Essa classe foi bastante escassa em **dS3** (~3%) (Tabela 6). Apesar da diversidade de triterpenos detectados em *Salvertia* (**90**, **102**, **105**, **107**, **108**, **109**, **111**, **113**, **120**, **122**, **124**), as concentrações desses metabólitos foram baixas, equivalendo a menos de 4% dos extratos de **S2** e **S3** (Tabelas 2 e 6). A amostra de **S1** apresentou maior conteúdo triterpênico, representando 10% em **hS1** e 8% em **dS2** (Tabela 6). Dos triterpenos, apenas a β -amirina (**102**) e o ácido betulínico (**113**) foram detectados nos três espécimes (Figura 4). Com DCM foram extraídos alguns pequenos composto aromáticos de esqueleto C₆-C₃ (**73** e **74**) e C₆-C₁ (**69-72**), correspondendo de 4 a 8% desses extratos (Tabela 2). A extração com DCM também obteve, em pequenas concentrações (<2%), o glicerol (**1**) e duas lactonas (**75** e **76**) (Tabela 6).

Pouco se sabe a respeito da composição lipofílica de *S. convallariodora*. De sementes foram obtidos os ácidos graxos saturados de cadeia par entre 16 e 24 carbonos e os ácidos C₁₈ e C₂₂ insaturados, ocorrendo variação em suas proporções nas amostras de diferentes populações (Mayworm & Salatino 2002). De sua madeira já foi isolado o β -sitosterol (Corrêa *et al.* 1975). *S. convallariodora* integra um gênero monotípico, sendo que espécies de *Vochysia* são as mais próximas filogeneticamente. Desse gênero já foram relatados o ácido betulínico (**113**) na casca de *Vochysia pacifica* (Weniger *et al.* 2005) e ácido oleanólico (**105**) na folha de *Vochysia tucanorum* (Gomes *et al.* 2009). Tanto em *Salvertia* quanto em *Vochysia* já foram obtidos diferentes triterpenos com grande número de hidroxilas, p.e. ácido serícico isolado da madeira de *S. convallariodora* (Corrêa *et al.* 1975; de Mesquita *et al.* 2017).

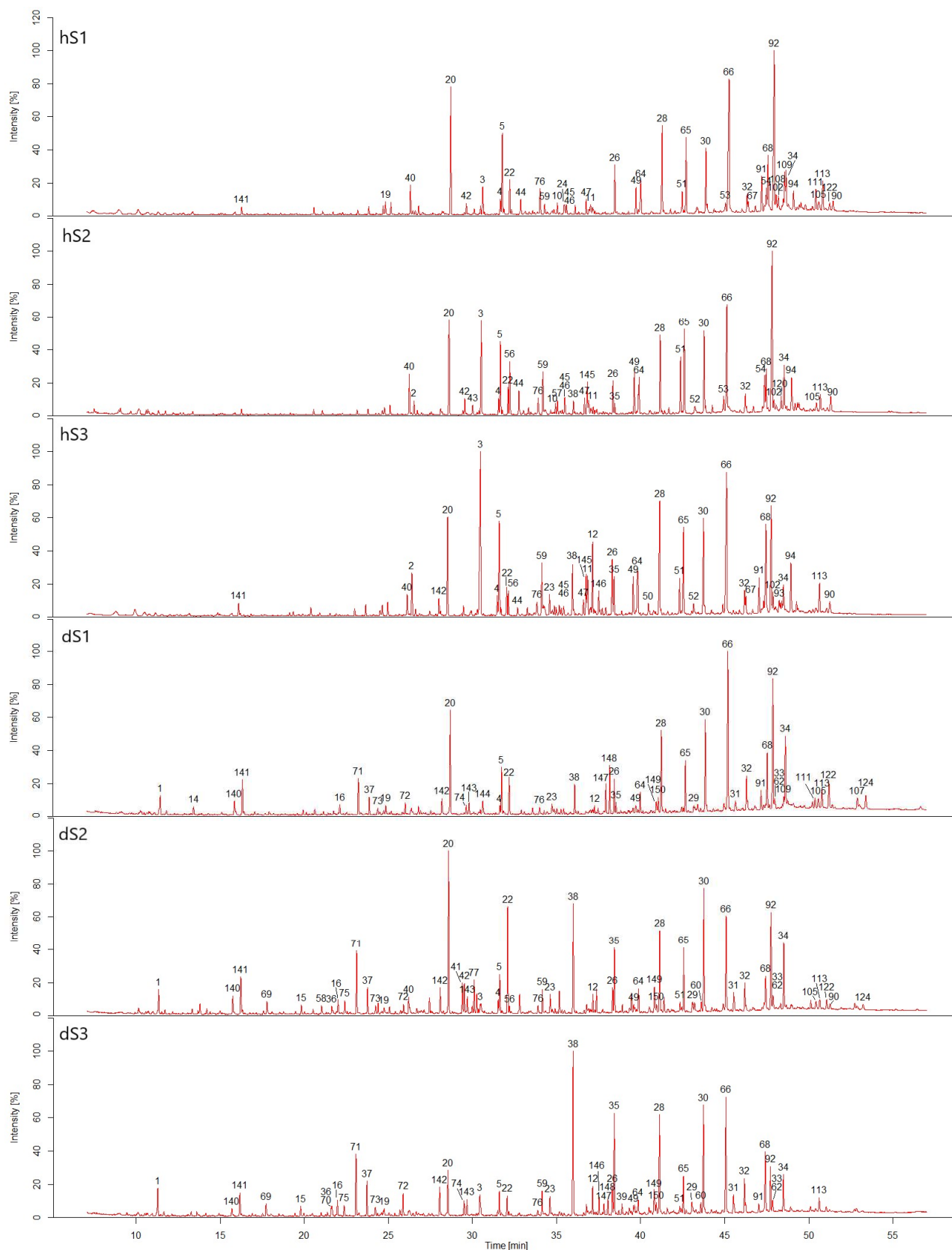


Figura 4. Cromatogramas obtidos por CG/EM dos extratos em Hex (**hS1**, **hS2** e **hS3**) e em DCM (**dS1**, **dS2** e **dS3**) de *Salvertia convallariodora*, com sugestão de identificação de seus constituintes. Os números são correspondentes aos compostos listados na Tabela 1.

Tabela 6. Metabólitos detectados nos extratos Hex (**hS1**, **hS2** e **hS3**) e DCM (**dS1**, **dS2** e **dS3**) de *S. convallariodora*, com tempo de retenção médio (TR), classe e área relativa (%). (-) não determinado; (--) compostos não detectado pelos critérios de integração adotados.

* TR	Classe	hS1	hS2	hS3	dS1	dS2	dS3	
1	11.37	Poliol	--	--	--	1.56	1.49	1.88
14	13.46	Ácido graxo (s)	--	--	--	0.56	--	--
140	15.78	-	--	--	--	1	1.17	0.59
141	16.24	-	0.58	--	0.68	2.63	2.3	1.58
69	17.75	Fenólico (C ₆ -C ₁)	--	--	--	--	0.84	0.96
15	19.81	ω-hidroxiácido (s)	--	--	--	--	0.55	0.66
58	21.04	Éster graxo	--	--	--	--	0.53	--
36	21.62	α,ω-diácido (s)	--	--	--	--	0.4	0.46
70	21.64	Fenólico (C ₆ -C ₁)	--	--	--	--	--	0.62
16	22.04	ω-hidroxiácido (s)	--	--	--	0.64	0.71	0.92
75	22.39	Lactona	--	--	--	--	0.79	0.84
71	23.15	Fenólico (C ₆ -C ₁)	--	--	--	2.35	3.41	3.83
37	23.79	α,ω-diácido (s)	--	--	--	1.07	1.37	1.99
73	24.29	Fenólico (C ₆ -C ₁)	--	--	--	0.6	0.47	0.78
19	24.81	Ácido graxo (s)	0.8	--	--	0.66	0.41	0.59
72	25.94	Fenólico (C ₆ -C ₁)	--	--	--	0.65	0.42	1.26
40	26.25	Éster graxo	1.77	2.23	0.94	--	1.27	--
2	26.50	Ácido graxo (i)	--	0.84	1.99	--	--	--
142	28.10	-	--	--	0.83	1.16	1.42	1.78
20	28.63	Ácido graxo (s)	7.63	5.85	4.53	6.71	9.25	3.18
41	29.40	Éster graxo	--	--	--	--	1.56	--
74	29.58	Fenólico (C ₆ -C ₃)	--	--	--	0.53	--	0.9
42	29.59	Éster graxo	0.66	0.88	--	--	1.66	--
143	29.73	-	--	--	--	0.75	0.98	0.98
43	30.05	Éster graxo	--	0.62	--	--	--	--
77	30.10	Purina	--	--	--	--	1.56	--
3	30.53	Ácido graxo (i)	1.69	5.72	10.81	--	0.52	1.78
144	30.65	-	--	--	--	1.14	--	--
4	31.60	Ácido graxo (i)	0.93	0.9	0.82	0.53	0.71	--
5	31.69	Ácido graxo (i)	4.94	4	4.36	2.73	1.92	1.41
22	32.14	Ácido graxo (s)	1.88	1.53	1.15	2.47	5.69	1.19
56	32.21	Éster graxo	--	2.89	1.03	--	0.41	--
44	32.81	Éster graxo	1.09	1.47	0.45	--	--	--
76	33.94	Lactona	1.72	1.16	0.8	0.63	0.48	0.46
59	34.20	Éster graxo	0.66	2.5	2.23	--	1.22	1.54
23	34.65	ω-hidroxiácido (s)	--	--	0.88	0.81	0.93	1.29
10	35.02	Ácido graxo (i)	0.64	0.57	--	--	--	--
57	35.09	Éster graxo	--	0.8	--	--	--	--
24	35.49	Ácido graxo (s)	0.88	--	--	--	--	--
45	35.53	Éster graxo	0.57	1.19	0.47	--	--	--
46	35.53	Éster graxo	0.57	1.19	0.47	--	--	--
38	36.02	α,ω-diácido (s)	--	0.68	2.11	1.79	5.69	10.57
47	36.71	Éster graxo	0.8	0.9	0.66	--	--	--
145	36.83	-	--	1.9	1.91	--	--	--
11	36.96	Ácido graxo (i)	0.55	0.8	1.83	--	--	--
12	37.20	ω-hidroxiácido (i)	--	--	3	0.44	0.86	1.55
146	37.53	-	--	--	1.03	--	--	1.01
147	37.89	-	--	--	--	1.86	--	0.63
148	38.12	-	--	--	--	2.78	--	0.89
26	38.39	Ácido graxo (s)	2.95	1.81	2.63	2.07	1.39	1.85
35	38.48	α,ω-diácido (i)	--	0.64	1.53	0.73	3.23	5.73
39	38.89	α,ω-diácido (s)	--	--	--	--	--	0.72
49	39.65	Éster graxo	1.55	2.57	1.76	0.84	0.41	0.54
64	39.93	Álcool graxo	2.35	2.77	3.29	1.38	1.4	1.14

Tabela 6. Continuação.

50	40.49	Éster graxo	--	--	0.55	--	--	--
149	40.86	-	--	--	--	1.03	1.78	2.08
150	40.98	-	--	--	--	0.97	0.4	0.72
28	41.20	Ácido graxo (s)	5.2	4.34	5.8	5.21	4.44	6.39
51	42.38	Éster graxo	1.33	3.11	1.56	--	0.56	0.44
65	42.63	Álcool graxo	4.73	4.94	4.12	3.53	3.27	2.38
29	43.11	ω -hidroxiácido (s)	--	--	--	0.48	0.99	1.26
52	43.22	Éster graxo	--	0.72	0.63	--	--	--
60	43.59	Monoacilglicerol	--	--	--	--	0.51	0.62
30	43.81	Ácido graxo (s)	3.99	4.74	4.56	5.18	6.24	7.23
53	45.03	Éster graxo	0.57	1.02	--	--	--	--
66	45.16	Álcool graxo	12.1	7.83	9.43	10.76	5.8	7.69
31	45.57	ω -hidroxiácido (s)	--	--	--	1	1.5	1.59
32	46.25	Ácido graxo (s)	1.18	1.08	1.09	2.13	1.54	2.03
67	46.36	Álcool graxo	0.64	--	0.73	--	--	--
91	47.13	Esteróide	2.4	--	1.6	1.32	--	0.56
54	47.45	Éster graxo	1.36	2.23	--	--	--	--
68	47.50	Álcool graxo	4.02	2.25	4.8	3.7	1.93	3.78
92	47.83	Esteróide	13.07	12.65	5.84	9.77	6.16	2.82
33	47.90	ω -hidroxiácido (s)	--	--	--	0.88	1.05	0.87
62	47.90	Monoacilglicerol	--	--	--	0.88	1.05	0.87
102	47.98	Triterpeno	1.19	0.77	0.72	--	--	--
108	48.22	Triterpeno	1.13	--	--	--	--	--
93	48.27	Esteróide	--	--	0.59	--	--	--
120	48.46	Triterpeno	0.55	0.7	--	--	--	--
109	48.57	Triterpeno	2.27	--	--	0.61	--	--
34	48.57	Ácido graxo (s)	2.11	2.88	1.51	4.75	3.8	2.41
94	49.03	Esteróide	1.42	2.4	2.46	--	--	--
111	50.42	Triterpeno	1.61	--	--	0.8	--	--
105	50.54	Triterpeno	0.86	0.71	--	0.97	0.59	--
113	50.72	Triterpeno	2.23	1.2	1.58	1.35	0.63	1.05
122	51.19	Triterpeno	0.58	--	--	2.12	0.63	--
90	51.34	Terpeno	0.8	1.22	0.73	--	0.4	--
107	52.92	Triterpeno	--	--	--	0.97	--	--
124	53.33	Triterpeno	--	--	--	1.39	0.39	--

(s) saturado; (i) insaturado. * Código correspondente às substâncias listadas na Tabela 1.

3.10. Análise de agrupamento

A análise de agrupamento reuniu corretamente os espécimes de cada espécie para ambos os extratos Hex e DCM (Figura 5). Entretanto, não reuniu os gêneros de acordo com suas famílias. Dessa forma, os dois gêneros de Fabaceae (*Copaifera* e *Leptolobium*) não foram agrupadas no mesmo agrupamento. O clado das Fabídeas, que inclui as duas leguminosas, como também *Erythroxylum*, não foi visto na análise. Esses resultados demonstram que o perfil químico dos extratos lipofílicos foi bastante característico de cada

espécie. Entretanto, esse perfil não se mostrou útil para o agrupamento de níveis taxonômicos superiores.

O uso do perfil de substâncias lipofílicas do súber na quimiotaxonomia foi elaborado por Salatino *et al.* (2020). Nesse trabalho foram estudadas 14 espécies, no qual a análise de agrupamento reuniu corretamente as amostras de mesma espécie. A análise permitiu, inclusive, a distinção entre os gêneros *Handroanthus* e *Tabebuia*, que anteriormente eram reunidos em *Tabebuia*. A conclusão do trabalho, assim como o presente estudo, foi que a distribuição de constituintes lipofílicos do súber, como ácidos graxos, álcoois, alcanos, triterpenos e fitosteróis, é promissora para o estabelecimento de uma “impressão digital” de espécies, ou seja, sua caracterização e delimitação. Os triterpenos, principalmente, tiveram um perfil distinto entre as espécies; como a presença de ácido acetil-ursólico, α - e β -amirona unicamente em *E. suberosum*, assim como o ácido platânico foi detectado apenas em *C. langsdorffii*. A distribuição desses compostos, entretanto, não se mostrou adequada para comparações a nível de família.

Um maior volume de dados, incluindo maior número de espécies e de indivíduos de populações distintas, seria ideal para vislumbrar o verdadeiro potencial da técnica na determinação de espécies.

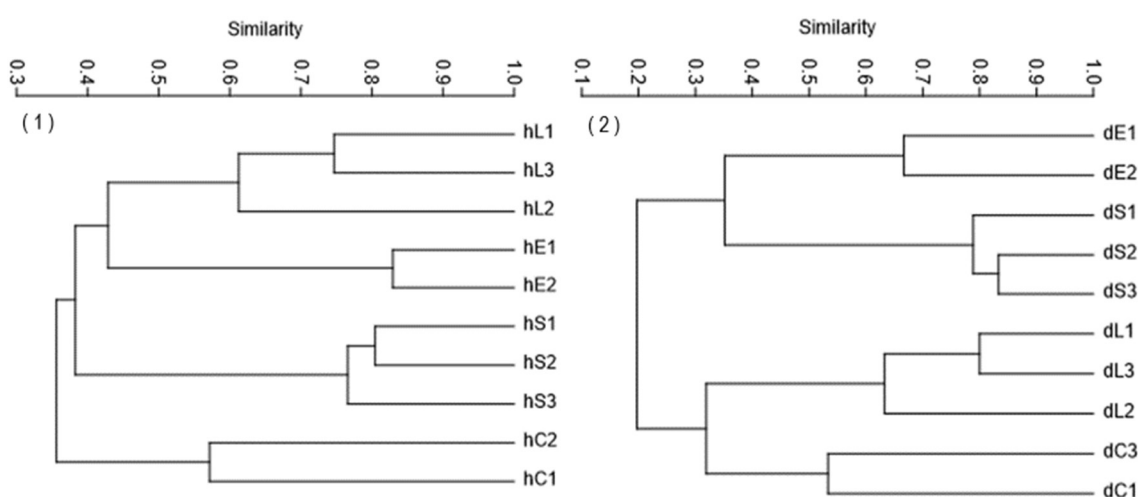


Figura 5. Análise de agrupamento do perfil químico das extrações em (1) Hex (h) e (2) DCM (d) dos espécimes (1-3) de *Copaifera langsdorffii* (C), *Leptolobium elegans* (L), *Erythroxylum suberosum* (L) e *Salvertia convalariodora* (S), pelo método UPGM.

4. CONCLUSÃO

- Os extratos de casca externa não apresentaram conteúdo de alcanos que pudesse ser usado na quimiotaxonomia, como é feito com ceras epicuticulares. Porém, o perfil geral de substâncias, determinado pela presença ou ausência de cada metabólito, foi capaz de diferenciar cada espécie. O perfil interespecífico foi bastante distinto, e somente o espécime 2 de *Leptolobium* apresentou uma maior variação intraespecífica.

- Com exceção de *Salvertia*, os extratos hexânicos apresentaram maior diversidade de substâncias comuns entre os espécimes que DCM e, portanto, maior potencial quimitaxonômico.

- Diferentemente das ceras epicuticulares de folhas, nos extratos da casca externa a presença de ácidos bifuncionais e de terpenos foi bastante marcante.

- O conteúdo de ácidos graxos foi semelhante entre as espécies, representando a principal classe de metabólitos na maioria dos extratos e, em geral, variando de C16 a C26, com predomínio de ácidos saturados.

- O perfil de terpenos, por sua vez, foi bastante distinto em cada espécie. A classe dos triterpenos possui grande potencial farmacológico. Os extratos DCM, excluindo *Salvertia*, se mostraram ótimas fontes de triterpenos. Esses extratos tiveram maior rendimento (vide Capítulo I) que o extrato hexânico, com grande conteúdo de ácido betulínico (*Copaifera* e *Leptolobium*) e ácido ursólico (*Erythroxylum*); que são importantes compostos bioativos, com diversos efeitos biológicos comprovados. Além desses terpenos majoritários, foi obtido dos extratos de DCM de *Erythroxylum* o ácido oleanólico (DCM), em concentrações relativamente boas. Os extratos hexânicos de *Erythroxylum* apresentaram considerável conteúdo de ácido acetil-ursólico, além de β -amirona. De um espécime de *Copaifera* foram extraídos com Hex dois diterpenos majoritários – ácido *ent*-caurenólico e ácido copálico –, que estão entre os compostos bioativos presentes no popularmente conhecido “óleo de copaíba”.

Considerações finais

Estudos fitoquímicos da casca das espécies *Copaifera langsdorffii*, *Salvertia convallariodora*, *Leptolobium elegans* e *Erythroxylum suberosum* são escassos. O presente estudo contribuiu para a ampliação do conhecimento de espécies nativas do cerrado brasileiro, especialmente *S. convallariodora* e *L. elegans*, duas espécies muito pouco estudadas. Com relação à primeira, nada foi encontrado relativo ao estudo de sua casca. Quanto a *C. langsdorffii*, uma espécie muito pesquisada devido ao seu uso medicinal, foram encontrados apenas quatro estudos que tratavam de metabólitos da casca.

A casca externa das espécies *C. langsdorffii* e *L. elegans* mostraram ótimo potencial farmacológico, com bom rendimento e extratos polares ricos em fenóis e taninos, além de propriedades antioxidantes. Os extratos apolares dessas espécies também são uma possível fonte de ácido betulínico e, no caso de *C. langsdorffii*, diterpenos. Essas duas espécies são ótimas candidatas para adicionais estudos de propriedades biológicas. *C. langsdorffii*, apesar da grande quantidade de estudos, foi a mais promissora em todos os ensaios, reafirmando sua importância. *L. elegans*, por sua vez, ainda possui uma grande lacuna de conhecimentos. Embora, *E. suberosum* tenha apresentado baixo rendimento em seus extratos de acetato de etila e metanol, menor capacidade antioxidante e teor fenólico mais baixo que as espécies citadas acima, seus extratos apolares (principalmente o de diclorometano) são ricos em triterpenos do tipo ursano.

Também foi observado o potencial de extratos de casca externa na caracterização de espécies. O perfil químico de extrações com solventes de baixa polaridade, especialmente com *n*-hexano, no presente estudo se mostrou bastante característico de cada espécie. Estudos adicionais, com maior número de espécies e populações de diferentes localidades, seriam necessários para determinar se o estudo do perfil químico de extratos lipossolúveis da casca externa seria uma possível alternativa para ser combinada às técnicas moleculares na determinação de espécies.

Resumo

A casca é uma estrutura heterogênea de plantas lenhosas, que inclui tecidos envolvidos na proteção e revestimento da planta (periderme) ou condução de fotossintatos (floema), sendo composta por polissacarídeos, polímeros fenólicos, poliésteres e extrativos. A camada mais externa é geralmente formada por uma ou mais peridermes. Essa estrutura desempenha importante papel ecológico (como proteção contra queimadas) e seus extrativos podem apresentar uma série de atividades biológicas. No cerrado, é comum o espessamento da casca. Dentre as espécies do cerrado utilizadas na medicina popular estão *Leptolobium elegans* Vogel, *Copaifera langsdorffii* Desf., *Erythroxylum suberosum* A. St.-Hil, e *Salvertia convallariodora* A. St.-Hil. Este trabalho propõe a avaliação das atividades antioxidante, anti-acetilcolinesterásica (AChE) e antimicrobiana de extrações de casca externa de diferentes espécimes das quatro espécies do cerrado citadas. As extrações foram feitas por maceração com os solventes *n*-hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol. A avaliação do potencial antioxidante foi feita pelos métodos de sequestro do radical DPPH e ORAC (capacidade de absorção de radicais oxigenados). A atividade anti-AChE foi avaliada pela metodologia de Ellman. A atividade antimicrobiana foi medida a partir da concentração mínima de extrato necessária para que ocorra, visivelmente, a inibição do crescimento (CIM) de *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Os extratos polares tiveram doseado seu conteúdo de fenóis totais por Folin-Ciocalteu e de taninos pelas metodologias com PVPP, BSA e vanilina-HCl. A composição química dos extratos apolares foi estudada por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM). *C. langsdorffii* apresentou o maior potencial antioxidante em ambas as metodologias testadas, semelhante ao do padrão, e foi a única com fração (obtida por cromatografia em camada delgada preparativa guiada por DPPH) com atividade anti-AChE. *C. langsdorffii* e *L. elegans* tiveram alto conteúdo fenólico e de taninos, a segunda também com alta capacidade de sequestro de DPPH. Ambas as espécies tiveram atividade antibacteriana satisfatória. *S. convallariodora* foi mais ativa no ensaio ORAC. *Erythroxylum* teve boa eficácia contra as bactérias testadas. O perfil de substâncias lipofílicas da casca externa foi característico de cada espécie. As principais classes de compostos foram os

ácidos graxos, triterpenos, esteroides e, em *S. covallariodora*, também álcoois e ésteres graxos. Os extratos de DCM de *C. langsdorffii*, *L. elegans* e *E. suberosum* apresentaram alto conteúdo triterpênico; com presença marcante do ácido betulínico nas primeiras, e ácido ursólico na terceira.

Palavras-chaves: Casca externa, espécies do cerrado, antioxidante, anti-acetilcolinesterásica, antimicrobiana, composição química.

Abstract

The bark is a heterogeneous structure from woody plants, including tissues involved on the protection and covering of the plant (periderm) or conduction of photosynthates (phloem). It is composed of polysaccharides, phenolic polymers, polyesters, and extractives. Its outer layer is usually made up of one or more periderms. This structure plays an important ecological role (e.g., against fire) and its extractives can exhibit a series of biological activities. In the Brazilian savannah (cerrado), it is common the thickening of the bark. Cerrado species with traditional medicine uses include *Leptolobium elegans* Vogel, *Copaifera langsdorffii* Desf., *Erythroxylum suberosum* A. St.-Hil, and *Salvertia convallariodora* A. St.-Hil. The current study proposes the evaluation of antioxidant, anti-acetylcholinesterase (AChE) and antimicrobial activities from extractions of outer bark of different specimens from the four cited cerrado species. The extractions were done by maceration with the solvents *n*-hexane, dichloromethane, ethyl acetate and methanol. The evaluation of antioxidant potential was performed with the DPPH radical scavenging and ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) methodologies. Anti-AChE activity was evaluated by Ellman's method. Antimicrobial activity was measured by the minimal concentration of extract necessary for the visible inhibition (MIC) of growth of *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. Total phenolic content of the polar extracts was evaluated by the method of Folin-Ciocalteu and the content of tannin was determined by methods using PVPP, BSA and vanillin-HCl. The chemical composition of the nonpolar extracts was studied by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). *C. langsdorffii* presented the highest antioxidant activity according to both methods, similar with the standard. It was the only species that provided an active fraction, isolated by preparative thin layer chromatography guided by DPPH, in the anti-AChE assay. *C. langsdorffii* and *L. elegans* had high phenolic and tannin contents, the second one also with a high DPPH scavenging capacity. Both species possess high antibacterial activity. *S. convallariodora* was more active on the ORAC assay. *E. suberosum* had moderate activity against the tested bacteria. The profile of lipophilic compounds from outer bark is characteristic for each species. The main classes of compounds detected were fatty acids, triterpenes and phytosterols. In

extracts of *S. convalliorodora* fatty alcohols and esters were also detected. The dichloromethane extracts of *C. langsdroffii*, *L. elegans* and *E. suberosum* presented high triterpene contents. Betulinic acid predominated in extracts of the first two species, and ursolic acid in *E. suberosum*.

Keywords: Outer bark, cerrado species, antioxidant, anti-acetylcholinesterase, antimicrobial, chemical composition.

Referências

- Abe, T., Masai, E., Miyauchi, K., Katayama, Y. & Fukuda, M. (2005) A Tetrahydrofolate-Dependent O -Demethylase, LigM, Is Crucial for Catabolism of Vanillate and Syringate in *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6. *Journal of Bacteriology* **187**: 2030–2037.
- Abedini, A., Colin, M., Hubert, J., Charpentier, E., Angelis, A., Bounasri, H., Bertaux, B., Kotland, A., Reffuveille, F., Nuzillard, J.-M., Renault, J.-H. & Gangloff, S. C. (2020) Abundant Extractable Metabolites from Temperate Tree Barks: The Specific Antimicrobial Activity of Prunus Avium Extracts. *Antibiotics* **9**: 111.
- Abrão, F., de Araújo Costa, L. D., Alves, J. M., Senedese, J. M., de Castro, P. T., Ambrósio, S. R., Veneziani, R. C. S., Bastos, J. K., Tavares, D. C. & Martins, C. H. G. (2015) *Copaifera langsdorffii* oleoresin and its isolated compounds: antibacterial effect and antiproliferative activity in cancer cell lines. *BMC Complementary and Alternative Medicine* **15**: 443.
- Abu-Gharbieh, E. & Shehab, N. G. (2017) Therapeutic potentials of *Crataegus azarolus* var. *eu-azarolus* Maire leaves and its isolated compounds. *BMC Complementary and Alternative Medicine* **17**: 218.
- Albuquerque, K. C. O. de, Veiga, A. do S. S. da, Silva, J. V. da S. e, Brigido, H. P. C., Ferreira, E. P. dos R., Costa, E. V. S., Marinho, A. M. do R., Percário, S. & Dolabela, M. F. (2017) Brazilian Amazon Traditional Medicine and the Treatment of Difficult to Heal Leishmaniasis Wounds with *Copaifera*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **2017**: 1–9.
- de Alencar Cunha, K. M., Paiva, L. A. F., Santos, F. A., Gramosa, N. V., Silveira, E. R. & Rao, V. S. N. (2003) Smooth muscle relaxant effect of kaurenoic acid, a diterpene from *Copaifera langsdorffii* on rat uterus in vitro. *Phytotherapy Research* **17**: 320–324.
- de Almeida, P. D. O., Boleti, A. P. de A., Rüdiger, A. L., Lourenço, G. A., da Veiga Junior, V. F. & Lima, E. S. (2015) Anti-Inflammatory Activity of Triterpenes Isolated from *Protium paniculatum* Oil-Resins. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **2015**: 1–10.
- Alves, J. M., Munari, C. C., de Azevedo Bentes Monteiro Neto, M., Furtado, R. A., Senedese, J. M., Bastos, J. K. & Tavares, D. C. (2013) *In vivo* protective effect of *Copaifera langsdorffii* hydroalcoholic extract on micronuclei induction by doxorubicin. *Journal of Applied Toxicology* **33**: 854–860.
- Arruda, C., Aldana Mejía, J. A., Ribeiro, V. P., Gambeta Borges, C. H., Martins, C. H. G., Sola Veneziani, R. C., Ambrósio, S. R. & Bastos, J. K. (2019) Occurrence, chemical composition, biological activities and analytical methods on *Copaifera* genus—A review. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **109**: 1–20.

- Avato, P. & Tava, A. (2022) Rare fatty acids and lipids in plant oilseeds: occurrence and bioactivity. *Phytochemistry Reviews* **21**: 401–428.
- Ayeleso, T., Matumba, M. & Mukwevho, E. (2017) Oleanolic Acid and Its Derivatives: Biological Activities and Therapeutic Potential in Chronic Diseases. *Molecules* **22**: 1915.
- Azemard, C., Menager, M. & Vieillescazes, C. (2016) Analysis of diterpenic compounds by GC-MS/MS: contribution to the identification of main conifer resins. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **408**: 6599–6612.
- Babel, W. & Steinbüchel, A. (Eds.) (2001) *Biopolyesters*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Bakir, S., Catalkaya, G., Ceylan, F. D., Khan, H., Guldiken, B., Capanoglu, E. & Kamal, M. A. (2020) Role of Dietary Antioxidants in Neurodegenerative Diseases: Where are We Standing? *Current Pharmaceutical Design* **26**: 714–729.
- Balandrin, M. F. & Kinghorn, A. D. (1981) Characterization of Sweetinine, a Constituent of *Sweetia elegans*, as the Ormosia Alkaloid, (\pm)-6-Epipodopetaline. *Journal of Natural Products* **44**: 619–622.
- Barbosa, F. S., Leite, G. L. D., Alves, S. M., Nascimento, A. F., D'Ávila, V. D. A. & Costa, C. A. da (2011) Insecticide effects of *Ruta graveolens*, *Copaifera langsdorffii* and *Chenopodium ambrosioides* against pests and natural enemies in commercial tomato plantation. *Acta Scientiarum. Agronomy* **33**: 37–43.
- Barbosa, W. L. R. & Pinto, L. N. (2003) Documentação e valorização da fitoterapia tradicional Kayapó nas aldeias A'Ukre e Pykanu - sudeste do Pará. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **13**: 47–49.
- Barreiros, M. L., David, J. M., Pereira, P. A. de P., Guedes, M. L. S. & David, J. P. (2002) Fatty Acid Esters of Triterpenes from *Erythroxylum passerinum*. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **13**: 669–673.
- Barreiros, M. L., David, J. M., de Queiroz, L. P. & David, J. P. (2005) Flavonoids and triterpenes from leaves of *Erythroxylum nummularia*. *Biochemical Systematics and Ecology* **33**: 537–540.
- Barros, I. M. de C., Leite, B. H. M., Leite, C. F. M., Fagg, C. W., Gomes, S. M., Resck, I. S., Fonseca-Bazzo, Y. M., Magalhães, P. O. & Silveira, D. (2017) Chemical composition and antioxidant activity of extracts from *Erythroxylum suberosum* A.St. Hil.leaves. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*.
- Batista, Â. G., Ferrari, A. S., da Cunha, D. C., da Silva, J. K., Cazarin, C. B. B., Correa, L. C., Prado, M. A., Carvalho-Silva, L. B. de, Esteves, E. A. & Maróstica Júnior, M. R. (2016) Polyphenols, antioxidants, and antimutagenic effects of *Copaifera langsdorffii* fruit. *Food Chemistry* **197**: 1153–1159.

- Bekdash, R. A. (2021) The Cholinergic System, the Adrenergic System and the Neuropathology of Alzheimer's Disease. *International Journal of Molecular Sciences* **22**: 1273.
- Bohm, B., Loo, T., Nicholls, K. & Plowman, T. (1988) Flavonoid variation in *Erythroxylum*. *Phytochemistry* **27**: 833–837.
- Boligon, A. A. (2014) Technical Evaluation of Antioxidant Activity. *Medicinal Chemistry* **4**.
- Braga, M. D. & Silva, C. C. M. (2015) Atividade antimicrobiana do extrato aquoso de *Copaifera langsdorffii* Desf. sobre *Staphylococcus aureus*. *Unimontes Científica* **9**: 91–98.
- Brancalion, A. P. S., Oliveira, R. B., Sousa, J. P. B., Groppo, M., Berretta, A. A., Barros, M. E., Boim, M. A. & Bastos, J. K. (2012) Effect of hydroalcoholic extract from *Copaifera langsdorffii* leaves on urolithiasis induced in rats. *Urological Research* **40**: 475–481.
- Brown, G. C. (2019) The endotoxin hypothesis of neurodegeneration. *Journal of Neuroinflammation* **16**: 180.
- Budzikiewicz, H., Wilson, J. M. & Djerassi, Carl. (1963) Mass Spectrometry in Structural and Stereochemical Problems. XXXII. Pentacyclic Triterpenes. *Journal of the American Chemical Society* **85**: 3688–3699.
- Butler, L. G., Price, M. L. & Brotherton, J. E. (1982) Vanillin assay for proanthocyanidins (condensed tannins): modification of the solvent for estimation of the degree of polymerization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **30**: 1087–1089.
- Caligiani, A., Malavasi, G., Palla, G., Marseglia, A., Tognolini, M. & Bruni, R. (2013) A simple GC–MS method for the screening of betulinic, corosolic, maslinic, oleanolic and ursolic acid contents in commercial botanicals used as food supplement ingredients. *Food Chemistry* **136**: 735–741.
- Carmo, J. F., Miranda, I., Quilhó, T., Sousa, V. B., Cardoso, S., Carvalho, A. M., Carmo, F. H. D. J., Latorraca, J. V. F. & Pereira, H. (2016) *Copaifera langsdorffii* Bark as a Source of Chemicals: Structural and Chemical Characterization. *Journal of Wood Chemistry and Technology* **36**: 305–317.
- Cavalcanti, B. C., Costa-lotufo, L. V., Moraes, M. O., Burbano, R. R., Silveira, E. R., Cunha, K. M. A., Rao, V. S. N., Moura, D. J., Rosa, R. M., Henriques, J. A. P. & Pessoa, C. (2006) Genotoxicity evaluation of kaurenoic acid, a bioactive diterpenoid present in Copaiba oil. *Food and Chemical Toxicology* **44**: 388–392.
- Charneau, S., de Mesquita, M. L., Bastos, I. M. D., Santana, J. M., de Paula, J. E., Grellier, P. & Espindola, L. S. (2016) *In vitro* investigation of Brazilian Cerrado plant extract activity against *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma cruzi* and *T. brucei gambiense*. *Natural Product Research* **30**: 1320–1326.

- Cheesman, M., Ilanko, A., Blonk, B. & Cock, I. (2017) Developing new antimicrobial therapies: Are synergistic combinations of plant extracts/compounds with conventional antibiotics the solution? *Pharmacognosy Reviews* **11**: 57.
- Cheyrier, V., Dueñas-Paton, M., Salas, E., Maury, C., Souquet, J.-M., Sarni-Manchado, P. & Fulcrand, H. (2006) Structure and Properties of Wine Pigments and Tannins. *American Journal of Enology and Viticulture* **57**: 298.
- Cho, N., Lee, H. K., Jeon, B. J., Kim, H. W., Kim, H. P., Lee, J. H., Kim, Y. C. & Sung, S. H. (2014) The effects of *Betula platyphylla* bark on amyloid beta-induced learning and memory impairment in mice. *Food and Chemical Toxicology* **74**: 156–163.
- Christie, W. W. The LipidWeb em The LIPID MAPS® Lipidomics Gateway.
- Christie, W. W. & Han, X. (2012) Lipids: their structures and occurrence. *Lipid Analysis* pp. 3–19. Elsevier.
- Clarke, G., Ting, K. N., Wiart, C. & Fry, J. (2013) High correlation of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging, ferric reducing activity potential and total phenolics content indicates redundancy in use of all three assays to screen for antioxidant activity of extracts of plants from the malaysian rainforest. *Antioxidants* **2**: 1–10.
- Cockerill, F. (2015) *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard*. Wayne, Pa.: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Conde, E., Cadahía, E., García-Vallejo, M. & Tomás-Barberán, F. (1995) Low molecular weight polyphenols in wood and bark of *Eucalyptus globulus*. *Wood and fiber science* **27**: 379–383.
- Corrêa, D. de B., Birchall, E., Vale-Aguilar, J. o E. & Gottlieb, O. R. (1975) Ellagic acids from Vochysiaceae. *Phytochemistry* **14**: 1138–1139.
- Cosme, P., Rodríguez, A. B., Espino, J. & Garrido, M. (2020) Plant Phenolics: Bioavailability as a Key Determinant of Their Potential Health-Promoting Applications. *Antioxidants* **9**: 1263.
- Costa, A. R. M., Freitas, L. A. P., Mendiola, J. & Ibáñez, E. (2015) *Copaifera langsdorffii* supercritical fluid extraction: Chemical and functional characterization by LC/MS and *in vitro* assays. *The Journal of Supercritical Fluids* **100**: 86–96.
- Costa, C. G., Rauber Coradin, V. T., Czarneski, C. M. & Pereira, B. A. da S. (1997) Bark Anatomy of Arborescent Leguminosae of Cerrado and Gallery Forest of Central Brazil. *IAWA Journal* **18**: 385–399.
- Costa-Lotufo, L. V., Cunha, G. M. A., Farias, P. A. M., Viana, G. S. B., Cunha, K. M. A., Pessoa, C., Moraes, M. O., Silveira, E. R., Gramosa, N. V. & Rao, V. S. N.

- (2002) The cytotoxic and embryotoxic effects of kaurenoic acid, a diterpene isolated from *Copaifera langsdorffii* oleo-resin. *Toxicon* **40**: 1231–1234.
- Cunha, A. P. S. da, Baldissera, L., Pereira, D. L., Albiero, L. R., Castoldi, L., Sinhorin, A. P. & Sinhorin, V. D. G. (2019) Evaluation of the antioxidant potential of *Copaifera multijuga* in Ehrlich tumor-bearing mice. *Acta Amazonica* **49**: 41–47.
- Danieli, B., Lesma, G., Passarella, D., Silvani, A. & Viviani, N. (1999) An efficient chemoenzymatic access to chiral 3,7-diazabicyclo[3.3.1]nonane derivatives. *Tetrahedron* **55**: 11871–11878.
- De, P., Baltas, M. & Bedos-Belval, F. (2011) Cinnamic Acid Derivatives as Anticancer Agents-A Review. *Current Medicinal Chemistry* **18**: 1672–1703.
- De Wet, H. (2011) Antibacterial activity of the five South African Erythroxylaceae species. *African Journal of Biotechnology* **10**: 11511–11514.
- Demole, E. & Enggist, P. (1978) Identification of Twenty-one Novel Constituents of Oriental Tobacco Flavour (*Nicotiana tabacum* L.) including (E)-3-methyl-non-2-en-4-one, pentadecan-15-olide, 8?, 13:9?, 13-diepoxy-15, 16-dinorlabdane, (Z)-octadec-9-en-18-olide, and (E)-2-ethylidene-6, 10, 14-trimethyl-pentadecanal. *Helvetica Chimica Acta* **61**: 2318–2327.
- Djipa, C. D., Delmée, M. & Quetin-Leclercq, J. (2000) Antimicrobial activity of bark extracts of *Syzygium jambos* (L.) Alston (Myrtaceae). *Journal of Ethnopharmacology* **71**: 307–313.
- Duarte, M. C. T., Leme, E. E., Delarmelina, C., Soares, A. A., Figueira, G. M. & Sartoratto, A. (2007) Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. *Journal of Ethnopharmacology* **111**: 197–201.
- Dwyer, J. D. (1951) The Central American, West Indian, and South American Species of *Copaifera* (Caesalpiniaceae). *Brittonia* **7**: 143.
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V. & Featherstone, R. M. (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* **7**: 88–95.
- Eloff, J. N. (2001) Antibacterial activity of Marula (*Sclerocarya birrea* (A. rich.) Hochst. subsp. *caffra* (Sond.) Kokwaro) (Anacardiaceae) bark and leaves. *Journal of Ethnopharmacology* **76**: 305–308.
- Elsas, J. D. & Bailey, M. J. (2002) The ecology of transfer of mobile genetic elements. *FEMS Microbiology Ecology* **42**: 187–197.
- Exner, M., Bhattacharya, S., Christiansen, B., Gebel, J., Goroncy-Bermes, P., Hartemann, P., Heeg, P., Ilschner, C., Kramer, A., Larson, E., Merkens, W., Mielke, M., Oltmanns, P., Ross, B., Rotter, M., Schmithausen, R. M., Sonntag, H.-G. & Trautmann, M. (2017) Antibiotic resistance: What is so special about

- multidrug-resistant Gram-negative bacteria? *GMS Hygiene and Infection Control*; **12:Doc05**.
- Feitosa, I. S., Sobral, A., Monteiro, J. M., Araújo, E. L. & Albuquerque, U. P. (2017) Impact of collection on bark regeneration from *Stryphnodendron rotundifolium* Mart. in northeastern Brazil. *Environmental Monitoring and Assessment* **189**: 234.
- Feng, S., Cheng, S., Yuan, Z., Leitch, M. & Xu, C. (2013) Valorization of bark for chemicals and materials: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **26**: 560–578.
- Fengel, D. & Wegener, G. (1989) *Wood: chemistry, ultrastructure, reactions*. Berlin e Nova Iorque: Walter de Gruyter.
- Fernandes, E. F. A., de Oliveira, A. R. M., Barros, V. P., Guaratini, T. & Lopes, N. P. (2020) Biomimetic Metabolism of Kaurenoic Acid Validated by Microsomal Reactions. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **30**: 551–558.
- Figueiredo, U. S. (2009) Química de *Acosmium dasycarpum*: identificação de alcalóides quinolizidínicos por CG-EM.
- Forman, H. J. & Zhang, H. (2021) Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy. *Nature Reviews Drug Discovery* **20**: 689–709.
- Fraga-Corral, M., Otero, P., Echave, J., Garcia-Oliveira, P., Carpena, M., Jarboui, A., Nuñez-Estevéz, B., Simal-Gandara, J. & Prieto, M. A. (2021) By-Products of Agri-Food Industry as Tannin-Rich Sources: A Review of Tannins' Biological Activities and Their Potential for Valorization. *Foods* **10**: 137.
- Freire, C. S. R., Silvestre, A. J. D., Neto, C. P. & Cavaleiro, J. A. S. (2002) Lipophilic extractives of the inner and outer barks of *Eucalyptus globulus*. *Holzforschung* **56**: 372–379.
- Frias, C. F., Gramacho, S. A. & Pineiro, M. (2014) Cromatografia gasosa-espectrometria de massas e derivatização assistida por micro-ondas na identificação de isômeros de glicose: uma prática para o ensino avançado em análise e caracterização de compostos orgânicos. *Química Nova* **37**: 176–180.
- Frutos, P., Hervás, G., Giráldez, F. J. & Mantecón, A. R. (2004) Review. Tannins and ruminant nutrition. *Spanish Journal of Agricultural Research* **2**: 191.
- Fujioka, T., Kashiwada, Y., Kilkuskie, R. E., Cosentino, L. M., Ballas, L. M., Jiang, J. B., Janzen, W. P., Chen, I.-S. & Lee, K.-H. (1994) Betulinic Acid and Platanic Acid as Anti-HIV Principles from *Syzygium claviflorum*, and the Anti-HIV Activity of Structurally Related Triterpenoids. *Journal of Natural Products* **57**: 243–247.

- Gao, H., Shupe, T. F., Eberhardt, T. L. & Hse, C. Y. (2007) Antioxidant activity of extracts from the wood and bark of Port Orford cedar. *Journal of Wood Science* **53**: 147–152.
- Gelmini, F., Beretta, G., Anselmi, C., Centini, M., Magni, P., Ruscica, M., Cavalchini, A. & Maffei Facino, R. (2013) GC–MS profiling of the phytochemical constituents of the oleoresin from *Copaifera langsdorffii* Desf. and a preliminary in vivo evaluation of its antipsoriatic effect. *International Journal of Pharmaceutics* **440**: 170–178.
- Gomes, R. de C., Bonamin, F., Darin, D. D., Seito, L. N., Di Stasi, L. C., Dokkedal, A. L., Vilegas, W., Brito, A. R. M. S. & Hiruma-Lima, C. A. (2009) Antioxidative action of methanolic extract and buthanolic fraction of *Vochysia tucanorum* Mart. in the gastroprotection. *Journal of Ethnopharmacology* **121**: 466–471.
- Gonçalves, A., Alves Filho, A. & Menezes, H. (2005) Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. *Arquivos do Instituto Biológico* **72**: 353–358.
- Graça, J. (2010) Hydroxycinnamates in suberin formation. *Phytochemistry Reviews* **9**: 85–91.
- Graça, J. & Pereira, H. (1997) Cork Suberin: A Glyceryl Based Polyester. *Holzforschung* **51**: 225–234.
- Graça, J. & Pereira, H. (1999) Glyceryl-Acyl and Aryl-Acyl Dimers in *Pseudotsuga menziesii* Bark Suberin. *Holzforschung* **53**: 397–402.
- Gunaherath, G. M. K. B. & Gunatilaka, A. A. L. (2014) Plant Steroids: Occurrence, Biological Significance and their Analysis. *Encyclopedia of Analytical Chemistry* (R. A. Meyers, ed): pp. 1–26. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.
- Gupta, G. K. (2009) Development of bark-based environmental-friendly composite panels.
- Habermann, E., Imatomi, M., Pontes, F. C. & Gualtieri, S. C. J. (2016) Antioxidant activity and phenol content of extracts of bark, stems, and young and mature leaves from *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth) O. Berg. *Brazilian Journal of Biology* **76**: 898–904.
- Hafez, R. M., Abdel-Rahman, T. M. & Naguib, R. M. (2017) Uric acid in plants and microorganisms: Biological applications and genetics - A review. *Journal of Advanced Research* **8**: 475–486.
- Hafizoğlu, H., Usta, M. & Bilgin, Ö. (1997) Wood and bark composition of *Picea orientalis* (L.) Link. *Holzforschung* **51**: 114–118.
- Haliński, Ł. P., Szafranek, J. & Stepnowski, P. (2011) Leaf cuticular n-alkanes as markers in the chemotaxonomy of the eggplant (*Solanum melongena* L.) and

- related species: Leaf n-alkanes in chemotaxonomy of eggplant and related species. *Plant Biology* **13**: 932–939.
- Haliński, Ł. P., Kalkowska, M., Kalkowski, M., Piorunowska, J., Topolewska, A. & Stepnowski, P. (2015) Cuticular wax variation in the tomato (*Solanum lycopersicum* L.), related wild species and their interspecific hybrids. *Biochemical Systematics and Ecology* **60**: 215–224.
- Hammer, Ø., Harper, D. A. T. & Ryan, P. D. (2001) PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. *Paleontologia Eletrônica* **4**: 9.
- Harbertson, J. F., Kilmister, R. L., Kelm, M. A. & Downey, M. O. (2014) Impact of condensed tannin size as individual and mixed polymers on bovine serum albumin precipitation. *Food Chemistry* **160**: 16–21.
- Harkin, J. M. & Rowe, J. W. (1971) Bark and its possible uses. *Research note FPL* **91**: 56.
- Harvey, D. J. & Vouros, P. (2020) Mass spectrometric fragmentation of trimethylsilyl and related alkylsilyl derivatives. *Mass Spectrometry Reviews* **39**: 105–211.
- Heilmann, J. (2010) New Medical Applications of Plant Secondary Metabolites. *Annual Plant Reviews Volume 39: Functions and Biotechnology of Plant Secondary Metabolites* pp. 348–380. John Wiley & Sons, Ltd.
- Hess, S. C., Brum, R. L., Honda, N. K., Cruz, A. B., Moretto, E., Cruz, R. B., Messana, I., Ferrari, F., Filho, V. C. & Yunes, R. A. (1995) Antibacterial activity and phytochemical analysis of *Vochysia divergens* (Vochysiaceae). *Journal of Ethnopharmacology* **47**: 97–100.
- Hu, Y.-L., Tian, X.-M., Wang, C.-C., Olga, Q., Yan, D., Tang, P.-F., Zhang, L.-N., Kong, L.-Y. & Luo, J. (2020) New triterpenoids, steroids and lignan from the stem barks of *Entandrophragma utile*. *Fitoterapia* **143**: 104546.
- Huang, D., Boxin, O. U. & Prior, R. L. (2005) The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**: 1841–1856.
- Huang, X.-Y., Liu, Z.-M., Shi, H.-P., Hu, J. & Han, D.-X. (2019) Ergostane steroids from the ethanol extract of *Dysoxylum mollissimum*. *Journal of Asian Natural Products Research* **21**: 103–108.
- Izumi, E., Ueda-Nakamura, T., Veiga, V. F., Pinto, A. C. & Nakamura, C. V. (2012) Terpenes from *Copaifera* Demonstrated in Vitro Antiparasitic and Synergic Activity. *Journal of Medicinal Chemistry* **55**: 2994–3001.
- Jäger, S., Trojan, H., Kopp, T., Laszczyk, M. & Scheffler, A. (2009) Pentacyclic Triterpene Distribution in Various Plants – Rich Sources for a New Group of Multi-Potent Plant Extracts. *Molecules* **14**: 2016–2031.

- Jansone, Z., Muizniece, I. & Blumberga, D. (2017) Analysis of wood bark use opportunities. *Energy Procedia* **128**: 268–274.
- Jové, P., Olivella, À. M. & Cano, L. (2011) Study of the Variability in Chemical Composition of Bark Layers of *Quercus Suber L.* From Different Production Areas. *BioResources* **6**: 1806–1815.
- Jucá, M. M., Cysne Filho, F. M. S., de Almeida, J. C., Mesquita, D. da S., Barriga, J. R. de M., Dias, K. C. F., Barbosa, T. M., Vasconcelos, L. C., Leal, L. K. A. M., Ribeiro, J. E. & Vasconcelos, S. M. M. (2020) Flavonoids: biological activities and therapeutic potential. *Natural Product Research* **34**: 692–705.
- Júnior, A. (2014) Medicinal Plants from the Brazilian Savanna with Antibacterial Properties. *European Journal of Medicinal Plants* **4**: 1–13.
- Kadu, C. A. C., Parich, A., Schueler, S., Konrad, H., Muluvi, G. M., Eyog-Matig, O., Muchugi, A., Williams, V. L., Ramamonjisoa, L., Kapinga, C., Foahom, B., Katsvanga, C., Hafashimana, D., Obama, C., Vinceti, B., Schumacher, R. & Geburek, T. (2012) Bioactive constituents in *Prunus africana*: Geographical variation throughout Africa and associations with environmental and genetic parameters. *Phytochemistry* **83**: 70–78.
- Kahnt, M., Heller, L., Grabandt, P., Al-Harrasi, A. & Csuk, R. (2018) Platanic acid: A new scaffold for the synthesis of cytotoxic agents. *European Journal of Medicinal Chemistry* **143**: 259–265.
- Kato, N. N., Stavits, V. K., Boaretto, A. G., Castro, D. T. H., Alves, F. M., Picoli Souza, K., Santos, E. L., Silva, D. B. & Carollo, C. A. (2021) Application of the metabolomics approach to the discovery of active compounds from Brazilian trees against resistant human melanoma cells. *Phytochemical Analysis* **32**: 992–1002.
- Kemboi, D., Siwe-Noundou, X., Krause, R. W. M., Langat, M. K. & Tembu, V. J. (2021) Euphorbia Diterpenes: An Update of Isolation, Structure, Pharmacological Activities and Structure–Activity Relationship. *Molecules* **26**: 5055.
- Khameneh, B., Eskin, N. A. M., Iranshahy, M. & Bazzaz, B. S. F. (2021) Phytochemicals: A Promising Weapon in the Arsenal against Antibiotic-Resistant Bacteria. *Antibiotics* **10**: 1044.
- Khusnutdinova, E., Galimova, Z., Lobov, A., Baikova, I., Kazakova, O., Thu, H. N. T., Tuyen, N. V., Gatilov, Y., Csuk, R., Serbian, I. & Hoenke, S. (2021) Synthesis of messagenin and platanic acid chalcone derivatives and their biological potential. *Natural Product Research*: 1–10.
- Khwaza, V., Oyedeji, O. O. & Aderibigbe, B. A. (2020) Ursolic Acid-Based Derivatives as Potential Anti-Cancer Agents: An Update. *International Journal of Molecular Sciences* **21**: 5920.

- Kolattukudy, P. E. (2001) Polyesters in Higher Plants. *Biopolyesters Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. (W. Babel & (A. Steinbüchel, eds): pp. 1–49. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Krogell, J., Holmbom, B., Pranovich, A., Hemming, J. & Willför, S. (2012) Extraction and chemical characterization of Norway spruce inner and outer bark. *Nordic Pulp and Paper Research Journal* **27**: 6–17.
- Kuete, V., Wabo, G. F., Ngameni, B., Mbaveng, A. T., Metuno, R., Etoa, F. X., Ngadjui, B. T., Beng, V. P., Meyer, J. J. M. & Lall, N. (2007) Antimicrobial activity of the methanolic extract, fractions and compounds from the stem bark of *Irvingia gabonensis* (Ixonanthaceae). *Journal of Ethnopharmacology* **114**: 54–60.
- Kuete, V., Nana, F., Ngameni, B., Mbaveng, A. T., Keumedjio, F. & Ngadjui, B. T. (2009) Antimicrobial activity of the crude extract, fractions and compounds from stem bark of *Ficus ovata* (Moraceae). *Journal of Ethnopharmacology* **124**: 556–561.
- Kumar, S. & Pandey, A. K. (2013) Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal* **2013**: 1–16.
- Kushiro, T. & Ebizuka, Y. (2010) Triterpenes. *Comprehensive Natural Products II: Chemistry and Biology* pp. 673–798. Elsevier Ltd.
- Laszczyk, M., Jäger, S., Simon-Haarhaus, B., Scheffler, A. & Schempp, C. M. (2006) Physical, chemical and pharmacological characterization of a new oleogel-forming triterpene extract from the outer bark of birch (*Betulae cortex*). *Planta Medica* **72**: 1389–1395.
- Leandro, L. M., de Sousa Vargas, F., Barbosa, P. C. S., Neves, J. K. O., da Silva, J. A. & da Veiga-Junior, V. F. (2012) Chemistry and Biological Activities of Terpenoids from Copaiba (*Copaifera* spp.) Oleoresins. *Molecules* **17**: 3866–3889.
- Lee, S. H., Sancheti, S. A., Bafna, M. R., Sancheti, S. S. & Seo, S. Y. (2011) Acetylcholinesterase inhibitory and antioxidant properties of *Rhododendron yedoense* var. *Poukhanense* bark. *Journal of Medicinal Plants Research* **5**: 248–254.
- Lee, T.-H., Hsieh, C.-L., Wu, H.-C., Wang, S.-W., Yu, C.-L., Hsiao, G., Cheng, M.-J., Hsieh, W.-T. & Kuo, Y.-H. (2021) Anti-lymphangiogenic diterpenes from the bark of *Calocedrus macrolepis* var. *formosana*. *Journal of Food and Drug Analysis* **29**: 606–621.
- Leite, C. F. M., Leite, H. B. M., Barros, I. M. de C., Gomes, S. M., Fagg, C. W., Simeoni, L. A., Silveira, D. & Fonseca, Y. Maria. (2014) Determinación de la rutina en extracto de *Erythroxylum suberosum* mediante cromatografía líquida:

- aplicabilidad en la estandarización de hierbas y estudios de estabilidad. *Plantas Medicinales y Aromáticas* **13**: 135–143.
- Li, Y., Beisson, F., Ohlrogge, J. & Pollard, M. (2007) Monoacylglycerols Are Components of Root Waxes and Can Be Produced in the Aerial Cuticle by Ectopic Expression of a Suberin-Associated Acyltransferase. *Plant Physiology* **144**: 1267–1277.
- Lima Neto, J. de S., Gramosa, N. V. & Silveira, E. R. (2008) Constituintes químicos dos frutos de *Copaifera langsdorffii* Desf. *Química Nova* **31**: 1078–1080.
- Liu, J., Chen, P., Yao, W., Wang, J., Wang, L., Deng, L., He, J., Zhang, G. & Lei, J. (2015) Subcritical water extraction of betulinic acid from birch bark. *Industrial Crops and Products* **74**: 557–565.
- Lopes, I. M. de C. (2016) Estudo químico de *Erythroxylum suberosum*, biomonitorado por inibição da hialuronidase.
- Lopes, J. L. C., Lopes, J. N. C. & Filho, H. F. L. (1979) 5-deoxyflavones from the Vochysiaceae. *Phytochemistry* **18**.
- Lourenço, A., Marques, A. V. & Gominho, J. (2021) The Identification of New Triterpenoids in *Eucalyptus globulus* Wood. *Molecules* **26**: 3495.
- Lucas-Filho, M. D. (2009) Estudo fitoquímico de espécies do gênero *Erythroxylum* com potencial atividade vasodilatadora e inibidora da enzima conversora de angiotensina.
- Macedo, T. B. C., Elias, S. T., Torres, H. M., Yamamoto-Silva, F. P., Silveira, D., Magalhães, P. O., Lofrano-Porto, A., Guerra, E. N. S. & Silva, M. A. G. (2016) Cytotoxic Effect of *Erythroxylum suberosum* Combined with Radiotherapy in Head and Neck Cancer Cell Lines. *Brazilian Dental Journal* **27**: 108–112.
- Mahadevan, V. (1977) Fatty alcohols: Chemistry and metabolism. *Progress in the Chemistry of Fats and other Lipids* **15**: 255–299.
- Marques, M., Hamerski, L., Garcez, F., Tieppo, C., Vasconcelos, M., Santos, E., Chang, M. & Garcez, W. (2013) *In vitro* biological screening and evaluation of free radical scavenging activities of medicinal plants from the Brazilian Cerrado. *Journal of Medicinal Plants Research* **7**: 957–962.
- Masson, D. S., Salvador, S. L., Polizello, A. C. M. & Frade, M. A. C. (2013) Antimicrobial activity of copaiba (*Copaifera langsdorffii*) oleoresin on bacteria of clinical significance in cutaneous wounds. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* **15**: 664–669.
- Masson-Meyers, D., Andrade, T., Leite, S. N. & Frade, M. A. C. (2013) Cytotoxicity and wound healing properties of *Copaifera langsdorffii* oleoresin in rabbits. **3**: 10–20.

- Mathew, M. & Subramanian, S. (2014) In Vitro Screening for Anti-Cholinesterase and Antioxidant Activity of Methanolic Extracts of Ayurvedic Medicinal Plants Used for Cognitive Disorders (G Forloni, Ed.). *PLoS ONE* **9**: e86804.
- Mayworm, M. A. S. & Salatino, A. (2002) Distribution of seed fatty acids and the taxonomy of Vochysiaceae. *Biochemical Systematics and Ecology* **30**: 961–972.
- de Melo, D. V. M., Medeiros, V., Lang, K. L. & Durán, F. J. (2019) A New Labdane Diterpene From *Copaifera langsdorffii* Oil-Resin. *7th Brazilian Conference on Natural Product/ XXXIII RESEM Proceedings, Rio de Janeiro*.
- de Menezes Filho, A. C. P. & Castro, C. F. de S. (2019) Classes fitoquímicas de metabólitos secundários em extratos etanólicos foliares de espécies do cerrado brasileiro. *Revista Saúde & Ciência Online* **8**: 45–61.
- de Menezes Filho, A. C. P., Filho, J. G. O., Christofoli, M. & Castro, C. F. de S. (2019) Atividade antioxidante e compostos bioativos em espécies de um fragmento de Cerrado goiano tipo cerradão. *Colloquium Agrariae* **15**: 01–08.
- Mercurio, M. D. & Smith, P. A. (2008) Tannin Quantification in Red Grapes and Wine: Comparison of Polysaccharide- and Protein-Based Tannin Precipitation Techniques and Their Ability to Model Wine Astringency. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**: 5528–5537.
- de Mesquita, M. L., de Paula, J. E., Espindola, L. S., Soares, L. A. L., da Silva, T. M. G., Camara, C. A. & da Silva, T. M. G. (2017) Protoflavanones from the Wood Stem of *Salvertia convallariodora*. *Natural Product Communications* **12**: 515–518.
- Milani, J. F., Rocha, J. F. & de Pádua Teixeira, S. (2012) Oleoresin glands in copaíba (*Copaifera trapezifolia* Hayne: Leguminosae), a Brazilian rainforest tree. *Trees* **26**: 769–775.
- Mitchell, A. E., Hong, Y.-J., May, J. C., Wright, C. A. & Bamforth, C. W. (2005) A Comparison of Polyvinylpyrrolidone (PVPP), Silica Xerogel and a Polyvinylpyrrolidone (PVP)-Silica Co-Product for Their Ability to Remove Polyphenols from Beer. *Journal of the Institute of Brewing* **111**: 20–25.
- Mota, M. I. F., Rodrigues Pinto, P. C., Loureiro, J. M. & Rodrigues, A. E. (2016) Recovery of Vanillin and Syringaldehyde from Lignin Oxidation: A Review of Separation and Purification Processes. *Separation & Purification Reviews* **45**: 227–259.
- Mudge, S. M. (2005) Fatty Alcohols - a review of their natural synthesis and environmental distribution.
- Mukherjee, P. K., Kumar, V., Mal, M. & Houghton, P. J. (2007) Acetylcholinesterase inhibitors from plants. *Phytomedicine* **14**: 289–300.

- Nakamura, Y., Tsuji, S. & Tonogai, Y. (2003) Analysis of Proanthocyanidins in Grape Seed Extracts, Health Foods and Grape Seed Oils. *Journal of Health Science* **49**: 45–54.
- Nascimento, C. J. do, Violante, I. M. P., Garcez, W. S., Pott, A. & Garcez, F. R. (2012) Biologically active abietane and ent-kaurane diterpenoids and other constituents from *Erythroxylum suberosum*. *Phytochemistry Letters* **5**: 401–406.
- do Nascimento, M. E., Zoghbi, M. das G. B., Brasil Pereira Pinto, J. E. & Bertolucci, S. K. V. (2012) Chemical variability of the volatiles of *Copaifera langsdorffii* growing wild in the Southeastern part of Brazil. *Biochemical Systematics and Ecology* **43**: 1–6.
- Nascimento, M. N. G. do (2014) Estudo químico de *Erythroxylum suberosum* (erythroxylaceae) frente às catepsinas K, L e V.
- Nayik, G. A. & Gull, A. (Eds.) (2020) *Antioxidants in Fruits: Properties and Health Benefits*. Singapore: Springer Singapore.
- Nes, W. R. (1989) Steroids. *Natural Products of Woody Plants* Springer Series in Wood Science. (J. W. Rowe, ed): pp. 808–842. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Neto, G. G. & Morais, R. G. de (2003) Plantas medicinais com potencial ornamental: um estudo no cerrado de Mato Grosso. *Ornamental Horticulture* **9**: 89–97.
- Nguyen, M. T. T. & Nguyen, N. T. (2013) A new lupane triterpene from *Tetracera scandens* L., xanthine oxidase inhibitor. *Natural Product Research* **27**: 61–67.
- Nie, Y.-W., Li, Y., Luo, L., Zhang, C.-Y., Fan, W., Gu, W.-Y., Shi, K.-R., Zhai, X.-X. & Zhu, J.-Y. (2021) Phytochemistry and Pharmacological Activities of the Diterpenoids from the Genus *Daphne*. *Molecules* **26**: 6598.
- Niu, J., Li, X., Qi, X. & Ren, Y. (2021) Pathway analysis of the biodegradation of lignin by *Brevibacillus thermoruber*. *Bioresource Technology* **341**: 125875.
- Nogueira, M. S., Furtado, R. A. & Bastos, J. K. (2015) Flavonoids and Methoxygalloylquinic Acid Derivatives from the Leaf Extract of *Copaifera langsdorffii* Desf. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **63**: 6939–6945.
- Oliveira, C. S. D., Moreira, P., Resende, J., Cruz, M. T., Pereira, C. M. F., Silva, A. M. S., Santos, S. A. O. & Silvestre, A. J. D. (2020) Characterization and Cytotoxicity Assessment of the Lipophilic Fractions of Different Morphological Parts of *Acacia dealbata*. *International Journal of Molecular Sciences* **21**: 1814.
- Oliveira, D. F., Pereira, A. C., Figueiredo, H. C. P., Carvalho, D. A., Silva, G., Nunes, A. S., Alves, D. S. & Carvalho, H. W. P. (2007) Antibacterial activity of plant extracts from Brazilian southeast region. *Fitoterapia* **78**: 142–145.

- Oliveira, D. S., Lima, L. S., Antonio, A. S., Wiedemann, L. S. M. & Veiga-Junior, V. (2019) Perfil Metabólico dos Extratos Polares das Folhas, Galhos e Cascas de *Copaifera multijuga* Hayne (Copaíba Mari-Mari da Amazônia) por ESI-EM. *Química Nova*.
- Oliveira, F. de, Saito, M. L. & Furukawa, C. M. (1994) Caracterização farmacognóstica da droga e extrato fluido de perobinha do campo - *Acosmium subelegans* (Mohlemb)Yakovl. *Lecta-USF* **12**: 17–34.
- Oliveira, F. de F. S. de, Aguiar, P. N. C., Ribeiro, G. de J. G., Amorim, M. L. L. de, Guimarães, P. S. S., Filho, C. V. M., Sivieri, R. R. G., Brandão, M. das G. L., dos Santos, W. T. P. & Graef, C. F. F. (2015) Antioxidant Activity and Phytochemical Screening of Extracts of *Erythroxylum suberosum* A.St.-Hil (Erythroxylaceae). *Research Journal of Phytochemistry* **9**: 68–78.
- Ostapiuk, A., Kurach, Ł., Strzemski, M., Kurzepa, J. & Hordyjewska, A. (2021) Evaluation of Antioxidative Mechanisms In Vitro and Triterpenes Composition of Extracts from Silver Birch (*Betula pendula* Roth) and Black Birch (*Betula obscura* Kotula) Barks by FT-IR and HPLC-PDA. *Molecules* **26**: 4633.
- Owusu, D. A., Afedzi, A. E. K. & Quansah, L. (2021) Phytochemical and proximate content of *Carapa procera* bark and its antimicrobial potential against selected pathogens (U Sarker, Ed.). *PLOS ONE* **16**: e0261755.
- Paiva, L. A. F., Gurgel, L. A., Silva, R. M., Tomé, A. R., Gramosa, N. V., Silveira, E. R., Santos, F. A. & Rao, V. S. N. (2002) Anti-inflammatory effect of kaurenoic acid, a diterpene from *Copaifera langsdorffii* on acetic acid-induced colitis in rats. *Vascular Pharmacology* **39**: 303–307.
- Palacios, C. E., Nagai, A., Torres, P., Rodrigues, J. A. & Salatino, A. (2021) Contents of tannins of cultivars of sorghum cultivated in Brazil, as determined by four quantification methods. *Food Chemistry* **337**: 127970.
- Pascoal, D. R. C., Velozo, E. S., Braga, M. E. M., Sousa, H. C., Cabral-Albuquerque, E. C. M. & Vieira de Melo, S. A. B. (2020) Bioactive compounds of *Copaifera* sp. impregnated into three-dimensional gelatin dressings. *Drug Delivery and Translational Research* **10**: 1537–1551.
- Pastorova, I., Weeding, T. & Boon, J. J. (1998) 3-Phenylpropanylcinnamate, a copolymer unit in Siegburgite fossil resin: a proposed marker for the Hammamelidaceae. *Organic Geochemistry* **29**: 1381–1393.
- Penido, A. B., Morais, S. M. de, Ribeiro, A. B., Alves, D. R., Rodrigues, A. L. M., Santos, L. H. dos & Menezes, J. E. S. A. de (2017) Medicinal plants from northeastern Brazil against Alzheimer's disease. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* **2017**.
- Pereira, D. L., Cunha, A. P. S. D., Cardoso, C. R. P., Rocha, C. Q. D., Vilegas, W., Sinhorin, A. P. & Sinhorin, V. D. G. (2018) Antioxidant and hepatoprotective

- effects of ethanolic and ethyl acetate stem bark extracts of *Copaifera multijuga* (Fabaceae) in mice. *Acta Amazonica* **48**: 347–357.
- Pereira, H. (2015) The Rationale behind Cork Properties: A Review of Structure and Chemistry. *BioResources* **10**: 6207–6229.
- Pfanz, H. & Aschan, G. (2001) The Existence of Bark and Stem Photosynthesis in Woody Plants and Its Significance for the Overall Carbon Gain. An Eco-Physiological and Ecological Approach. *Progress in Botany* Progress in Botany. (K. Esser, (U. Lüttge, (J. W. Kadereit & (W. Beyschlag, eds): pp. 477–510. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Philippe, G., Sørensen, I., Jiao, C., Sun, X., Fei, Z., Domozych, D. S. & Rose, J. K. (2020) Cutin and suberin: assembly and origins of specialized lipidic cell wall scaffolds. *Current Opinion in Plant Biology* **55**: 11–20.
- Pieri, F. A., Mussi, M. C. & Moreira, M. A. S. (2009) Óleo de copaíba (*Copaifera* sp.): histórico, extração, aplicações industriais e propriedades medicinais. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* **11**: 465–472.
- Pieri, F. A., Souza, C. F., Costa, J. C. M., Barrero, M. A. O., Espescht, I. F., Silva, V. O. & Moreira, M. A. S. (2011) Inhibition of *Escherichia coli* from mastitic milk by copaiba oil. *Semina: Ciências Agrárias, Londrina* **32**: 1929–1934.
- Pieri, F. A., Silva, V. O., Souza, C. F., Costa, J. C. M., Santos, L. F. & Moreira, M. A. S. (2012) Antimicrobial profile screening of two oils of *Copaifera* genus. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* **64**: 241–244.
- Pinto, P. C. R. O., Sousa, A. F., Silvestre, A. J. D., Neto, C. P., Gandini, A., Eckerman, C. & Holmbom, B. (2009) *Quercus suber* and *Betula pendula* outer barks as renewable sources of oleochemicals: A comparative study. *Industrial Crops and Products* **29**: 126–132.
- Pizzi, A. (2008) Tannins: Major Sources, Properties and Applications. *Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources* pp. 179–199. Elsevier.
- Podstolski, A., Havkin-Frenkel, D., Malinowski, J., Blount, J. W., Kourteva, G. & Dixon, R. A. (2002) Unusual 4-hydroxybenzaldehyde synthase activity from tissue cultures of the vanilla orchid *Vanilla planifolia*. *Phytochemistry* **61**: 611–620.
- Popova, M. P., Graikou, K., Chinou, I. & Bankova, V. S. (2010) GC-MS Profiling of Diterpene Compounds in Mediterranean Propolis from Greece. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **58**: 3167–3176.
- Price, M. L., Van Scoyoc, S. & Butler, L. G. (1978) A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **26**: 1214–1218.

- Queiroz, M. M. F., Queiroz, E. F., Zeraik, M. L., Ebrahimi, S. N., Marcourt, L., Cuendet, M., Castro-Gamboa, I., Hamburger, M., Da Silva Bolzani, V. & Wolfender, J. L. (2014) Chemical composition of the bark of *Tetrapterys mucronata* and identification of acetylcholinesterase inhibitory constituents. *Journal of Natural Products* **77**: 650–656.
- Raitanen, J.-E., Järvenpää, E., Korpinen, R., Mäkinen, S., Hellström, J., Kilpeläinen, P., Liimatainen, J., Ora, A., Tupasela, T. & Jyske, T. (2020) Tannins of Conifer Bark as Nordic Piquancy—Sustainable Preservative and Aroma? *Molecules* **25**: 567.
- Raven, P. H., Evert, R. F. & Eichhorn, S. E. (2014) *Biologia Vegetal*. Guanabara.
- Razboršek, M. I., Vončina, D. B., Doleček, V. & Vončina, E. (2008) Determination of Oleanolic, Betulinic and Ursolic Acid in Lamiaceae and Mass Spectral Fragmentation of Their Trimethylsilylated Derivatives. *Chromatographia* **67**: 433–440.
- Reis Giada, M. de L. (2013) Food Phenolic Compounds: Main Classes, Sources and Their Antioxidant Power. *Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases - A Role for Antioxidants* (J. A. Morales-Gonzalez, ed): p. InTech.
- Ribeiro, E. M. de O., Lima, L. S., David, J. M., Vale, A. E. do, Lopes, L. M. X. & David, J. P. (2013) A new tropane alkaloid and other constituents of *Erythroxylum rimosum* (Erythroxylaceae). *Phytochemistry Letters* **6**: 232–235.
- Rios, P., Cabral, V., Santos, S., Mori, F. & Graça, J. (2014) The chemistry of *Kielmeyera coriacea* outer bark: a potential source for cork. *European Journal of Wood and Wood Products* **72**: 509–519.
- Rodrigues, G. A., Souza, W. C., Godinho, M. G. C., Ferreira, H. D. & Vila Verde, G. M. (2015) Determinação de parâmetros farmacognósticos para as folhas de *Erythroxylum suberosum* A. St.-Hilaire (Erythroxylaceae) coletadas no município de Goiânia, GO. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* **17**: 1169–1176.
- Rodrigues, T. M. & Machado, S. R. (2009) Developmental and structural features of secretory canals in root and shoot wood of *Copaifera langsdorffii* Desf. (Leguminosae–Caesalpinioideae). *Trees* **23**: 1013–1018.
- Romero, C. (2014) Bark: Structure and Functional Ecology. *Advances in Economic Botany* **17**: 5–25.
- Rontani, J.-F., Nassiry, M. & Mouzdahir, A. (2007) Free radical oxidation (autoxidation) of α -tocopherol (vitamin E): A potential source of 4,8,12,16-tetramethylheptadecan-4-olide in the environment. *Organic Geochemistry* **38**: 37–47.

- Rowland, O. & Domergue, F. (2012) Plant fatty acyl reductases: Enzymes generating fatty alcohols for protective layers with potential for industrial applications. *Plant Science* **193–194**: 28–38.
- Sakai, K. (2001) Chemistry of Bark. *Wood and cellulosic chemistry* (D. N.-S. Hon & (N. Shiraishi, eds): pp. 243–273. Nova Iorque: Marcel Dekker.
- Salatino, A. (1993) Chemical ecology and the theory of oligotrophic scleromorphism. *Anais da Academia brasileira de Ciência* **65**: 1–13.
- Salatino, A., Ferreira, M. J. P., Udulutsch, R. G., Palacios, C. E. & Salatino, M. L. F. (2020) Fingerprinting of cerrado species based on cork lipophilic constituents. *Biochemical Systematics and Ecology* **88**: 103989.
- Salminen, J.-P. & Karonen, M. (2011) Chemical ecology of tannins and other phenolics: we need a change in approach: Chemical ecology of tannins. *Functional Ecology* **25**: 325–338.
- Sâmia, R. R., Alves, D. S., Vilas Boas, M. A., Carvalho, G. A. & Oliveira, D. F. (2009) Efeito de Extratos de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Fabaceae: Caesalpinioideae) Sobre Diferentes Características Biológicas de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *Revista Brasileira de Agroecologia* **4**: 3423–3426.
- Sâmia, R. R., de Oliveira, R. L., Moscardini, V. F. & Carvalho, G. A. (2016) Effects of Aqueous Extracts of *Copaifera langsdorffii* (Fabaceae) on the Growth and Reproduction of *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *Neotropical Entomology* **45**: 580–587.
- Santos, A. O. dos, Ueda-Nakamura, T., Dias Filho, B. P., Veiga Junior, V. F., Pinto, A. C. & Nakamura, C. V. (2008) Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **103**: 277–281.
- Santos, K. P., Sedano-Partida, M. D., Motta, L. B., Cordeiro, I. & Furlan, C. M. (2016) Antioxidant activity of flavonoids from *Croton sphaerogynus* Baill. *Brazilian Journal of Botany* **39**: 1021–1030.
- Santos, M. de O., Camilo, C. J., Macedo, J. G. F., Lacerda, M. N. S. de, Lopes, C. M. U., Rodrigues, A. Y. F., Costa, J. G. M. da & Souza, M. M. de A. (2022) *Copaifera langsdorffii* Desf.: A chemical and pharmacological review. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* **39**: 102262.
- Santos, S., Cabral, V. & Graça, J. (2013) Cork Suberin Molecular Structure: Stereochemistry of the C₁₈ Epoxy and vic-Diol ω-Hydroxyacids and α,ω-Diacids Analyzed by NMR. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **61**: 7038–7047.

- Santos, S. A. O., Villaverde, J. J., Silva, C. M., Neto, C. P. & Silvestre, A. J. D. (2012) Supercritical fluid extraction of phenolic compounds from *Eucalyptus globulus* Labill bark. *Journal of Supercritical Fluids* **71**: 71–79.
- Schofield, P., Mbugua, D. M. & Pell, A. N. (2001) Analysis of condensed tannins: a review. *Animal Feed Science and Technology* **91**: 21–40.
- Seddon, T. J. & Downey, M. O. (2008) Comparison of analytical methods for the determination of condensed tannins in grape skin. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **14**: 54–61.
- Shirmohammadli, Y., Efhamisisi, D. & Pizzi, A. (2018) Tannins as a sustainable raw material for green chemistry: A review. *Industrial Crops and Products* **126**: 316–332.
- Silva, A. F., Almeida, V. L. de, Rabelo, M. F. R., Silva, C. G., Campana, P. R. V., Enoque, M. M. & Lara, J. F. R. (2014) *Bioprospecção de espécies vegetais nativas do Cerrado com potencial para o desenvolvimento de antimicrobianos*. EPAMIG.
- Silva, C. C. F. (2008) Análise química e atividades citotóxica e antioxidante de amostras de própolis de alecrim.
- Silva, J. B. da, Salatino, A. & Panizza, S. (1976) Ensaios fitoquímicos preliminares em espécies do Cerrado. *Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo*: 129–132.
- Silva, V. N. T., de Oliveira, F. M. & Conserva, L. M. (2001) Phenolic derivatives and terpenes from *Acosmium bijugum*. *Biochemical Systematics and Ecology* **11**: 1189–1192.
- Sousa, A. F., Pinto, P. C. R. O., Silvestre, A. J. D. & Neto, C. P. (2006) Triterpenic and other lipophilic components from industrial cork byproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**: 6888–6893.
- Sousa Júnior, P. T., Dall'Oglio, E. L., Silva, L. E. da, Figueiredo, U. S., Vieira, P. C., Machado, H. V. & Santos, L. G. dos (2009) Gênero *Acosmium*: composição química e potencial farmacológico. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **19**: 150–157.
- Souza, A. B., Martins, C. H. G., Souza, M. G. M., Furtado, N. A. J. C., Heleno, V. C. G., de Sousa, J. P. B., Rocha, E. M. P., Bastos, J. K., Cunha, W. R., Veneziani, R. C. S. & Ambrósio, S. R. (2011a) Antimicrobial activity of terpenoids from *Copaifera langsdorffii* Desf. against cariogenic bacteria. *Phytotherapy Research* **25**: 215–220.
- Souza, A. B., Souza, M. G. M. de, Moreira, M. A., Moreira, M. R., Furtado, N. A. J. C., Martins, C. H. G., Bastos, J. K., Santos, R. A. dos, Heleno, V. C. G., Ambrosio, S. R. & Veneziani, R. C. S. (2011b) Antimicrobial Evaluation of Diterpenes

- from *Copaifera langsdorffii* Oleoresin Against Periodontal Anaerobic Bacteria. *Molecules* **16**: 9611–9619.
- Sova, M. (2012) Antioxidant and Antimicrobial Activities of Cinnamic Acid Derivatives. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* **12**: 749–767.
- Spellberg, B. (2014) The future of antibiotics. *Critical Care* **18**: 228.
- Stafford, H. A., Smith, E. C. & Weider, R. M. (1989) The development of proanthocyanidins (condensed tannins) and other phenolics in bark of *Pseudotsuga menziesii*. *Canadian Journal of Botany* **67**: 1111–1118.
- Sun, B., Ricardo-da-Silva, J. M. & Spranger, I. (1998) Critical Factors of Vanillin Assay for Catechins and Proanthocyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46**: 4267–4274.
- Tamokou, J. D. D., Tala, M. F., Wabo, H. K., Kuate, J. R. & Tane, P. (2009) Antimicrobial activities of methanol extract and compounds from stem bark of *Vismia rubescens*. *Journal of Ethnopharmacology* **124**: 571–575.
- Tanase, C., Coșarcă, S. & Muntean, D.-L. (2019) A Critical Review of Phenolic Compounds Extracted from the Bark of Woody Vascular Plants and Their Potential Biological Activity. *Molecules* **24**: 1182.
- Tanno, H., Sassa, T., Sawai, M. & Kihara, A. (2021) Production of branched-chain very-long-chain fatty acids by fatty acid elongases and their tissue distribution in mammals. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **1866**: 158842.
- Tegelaar, E. W., Hollman, G., Van Der Vegt, P., De Leeuw, J. W. & Holloway, P. J. (1995) Chemical characterization of the periderm tissue of some angiosperm species: recognition of an insoluble, non-hydrolyzable, aliphatic biomacromolecule (Suberan). *Organic Geochemistry* **23**: 239–251.
- The Catalogue of Life Partnership (2017) APG IV: Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants.
- Tirapelli, C. R., Ambrosio, S. R., da Costa, F. B., Coutinho, S. T., de Oliveira, D. C. R. & de Oliveira, A. M. (2004) Analysis of the mechanisms underlying the vasorelaxant action of kaurenoic acid in the isolated rat aorta. *European Journal of Pharmacology* **492**: 233–241.
- Tong, Z., He, W., Fan, X. & Guo, A. (2022) Biological function of plant tannin and its application in animal health. *Frontiers in Veterinary Science* **8**: 803657.
- Torres, P. B., Nagai, A., Jara, C. E. P., Santos, J. P., Chow, F. & Santos, D. Y. A. C. dos (2021) Determination of sulfate in algal polysaccharide samples: a step-by-step protocol using microplate reader. *Ocean and Coastal Research* **69**: e21021.

- Trevisan, M. T. S. & Macedo, F. V. V. (2003) Seleção de plantas com atividade anticolinesterase para tratamento da doença de Alzheimer. *Química Nova* **26**: 301–304.
- Tuzimski, T. & Petruczynik, A. (2022) Determination of Anti-Alzheimer's Disease Activity of Selected Plant Ingredients. *Molecules* **27**: 3222.
- Vargas, F. de S., de Almeida, P. D. O., Aranha, E., Boleti, A. de A., Newton, P., de Vasconcellos, M., Junior, V. & Lima, E. (2015) Biological Activities and Cytotoxicity of Diterpenes from *Copaifera* spp. Oleoresins. *Molecules* **20**: 6194–6210.
- Veiga Jr, V. F. & Pinto, A. C. (2002) O gênero *Copaifera* L. *Química Nova* **25**: 273–286.
- Veiga Jr, V. F. & Pinto, A. C. (2006) Constituintes químicos das cascas de *Copaifera langsdorfii* Desf. *Revista Fitos* **2**: 59–64.
- Veridiana, V. de L. W., de Souza, A. R., Cavassan, O., Alarcon, R. T. & Bannach, G. (2020) Súber: isolante térmico e retardador do efeito do fogo nas árvores. *Aprendendo Ciência (ISSN 2237-8766)* **9**: 06–10.
- Vieira, H. S., Takahashi, J. A., Oliveira, A. B. de, Chiari, E. & Boaventura, M. A. D. (2002a) Novel Derivatives of Kaurenoic Acid. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **13**: 151–157.
- Vieira, R. A., Lapa, A. J. & Lima, T. C. M. de (2002b) Evaluation of the central activity of the ethanolic extract of *Acosmium subelegans* (Mohlenbr) in mice. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **12**: 50–51.
- Vila Verde, G. M., Paula, J. R. de & Caneiro, D. (2003) Levantamento etnobotânico das plantas medicinais do cerrado utilizadas pela população de Mossamedes (GO). *Revista Brasileira de Farmacognosia* **13**: 64–66.
- Violante, I. M. P., Hamerski, L., Garcez, W. S., Batista, A. L., Chang, M. R., Pott, V. J. & Garcez, F. R. (2012) Antimicrobial activity of some medicinal plants from the cerrado of the central-western region of Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology* **43**: 1302–1308.
- Wargo, P. M. (1988) Amino nitrogen and phenolic constituents of bark of American beech, *Fagus grandifolia*, and infestation by beech scale, *Cryptococcus fagisuga*. *European Journal of Forest Pathology* **18**: 279–290.
- Weniger, B., Lobstein, A., Um, B.-H., Vonthron-Sénéchau, C., Anton, R., Usuga, N. J., Basaran, H. & Lugnier, C. (2005) Bioactive triterpenoids from *Vochysia pacifica* interact with cyclic nucleotide phosphodiesterase isozyme PDE4. *Phytotherapy Research* **19**: 75–77.
- Wildermuth, M. C. (2006) Variations on a theme: synthesis and modification of plant benzoic acids. *Current Opinion in Plant Biology* **9**: 288–296.

-
- Wink, M. (2010) Introduction. *Annual Plant Reviews Volume 39: Functions and Biotechnology of Plant Secondary Metabolites* pp. 1–20. John Wiley & Sons, Ltd.
- Yogeeswari, P. & Sriram, D. (2005) Betulinic Acid and Its Derivatives: A Review on their Biological Properties. *Current Medicinal Chemistry* **12**: 657–666.
- Zazouli, S., Chigr, M., Ramos, P. A. B., Rosa, D., Castro, M. M., Jouaiti, A., Duarte, M. F., Santos, S. A. O. & Silvestre, A. J. D. (2022) Chemical Profile of Lipophilic Fractions of Different Parts of *Zizyphus lotus* L. by GC-MS and Evaluation of Their Antiproliferative and Antibacterial Activities. *Molecules* **27**: 483.
- Zerbe, P. & Bohlmann, J. (2015) Plant diterpene synthases: exploring modularity and metabolic diversity for bioengineering. *Trends in Biotechnology* **33**: 419–428.
- Zygodlo, J. A., Maestri, D. M. & Grosso, N. R. (1994) Alkane distribution in epicuticular wax of some Solanaceae species. *Biochemical Systematics and Ecology* **22**: 203–209.

Apêndice

Metabólito	Picos diagnósticos (%)
Poliol	
1 Glicerol, 3TMS	73 (100), 103 (26), 117 (29), 133 (14), 147 (65), 205 (47), 218 (15), 293 (1)
Ácido graxo	
Insaturado	
2 Ácido palmitoleico (16:1)	55 (100), 69 (60), 83 (49), 97 (37), 111 (17), 124 (10), 236 (7)
3 # Ácido <i>linoleico</i> (18:2)	55 (90), 67 (86), 82 (100), 96 (75), 109 (31), 123 (17), 262 (4)
4 Ácido <i>linoleico</i> (18:2), TMS	73 (100), 117 (28), 129 (32), 150 (14), 262 (11), 337 (32)
5 Ácido <i>oleico</i> (18:1), TMS	73 (100), 117 (78), 129 (59), 145 (30), 339 (49)
7 Ácido * <i>octadecenoico</i> (18:1), TMS	73 (100), 117 (62), 129 (57), 145 (27), 339 (45)
8 Ácido * <i>nonadecenoico</i> (19:1), TMS	73 (100), 117 (54), 129 (44), 145 (26), 353 (27)
9 Ácido * <i>eicosenoico</i> (20:1)	55 (100), 69 (60), 83 (51), 97 (43), 111 (20), 292 (9)
10 Ácido * <i>eicosenoico</i> (20:1), TMS	73 (100), 117 (59), 129 (53), 132 (15), 145 (26), 367 (35)
11 Ácido * <i>docosenoico</i> (22:1)	55 (100), 69 (65), 83 (56), 97 (50), 111 (24), 125 (11), 149 (12), 320 (12)
12 Ácido 18-hidroxi <i>oleico</i> , 2TMS	73 (100), 103 (11), 117 (16), 129 (20), 147 (19), 204 (12), 217 (17), 337 (5), 411 (6), 427 (8)
13 Ácido * <i>tetracosenoico</i> (24:1)	55 (100), 69 (71), 83 (61), 97 (53), 111 (25), 348 (8)
Saturado	
14 Ácido <i>nonanoico</i> (9:0), TMS	73 (100), 117 (67), 129 (23), 132 (23), 145 (11), 215 (77)
15 Ácido 8-hidroxi <i>octanoico</i> , 2TMS	73 (100), 103 (21), 117 (19), 129 (8), 147 (66), 199 (25), 273 (6), 289 (27)
16 Ácido 9-hidroxi <i>nonanoico</i> , 2TMS	73 (100), 103 (18), 117 (17), 129 (11), 147 (48), 204 (7), 213 (16), 217 (3), 287 (8), 303 (33)
17 Ácido <i>capríco</i> (10:0), TMS	73 (100), 117 (69), 129 (27), 132 (25), 145 (13), 229 (64)
18 Ácido <i>láurico</i> (12:0), TMS	73 (100), 117 (91), 129 (35), 132 (37), 145 (20), 257 (79)
19 Ácido <i>mirístico</i> (14:0), TMS	73 (100), 117 (93), 129 (37), 132 (41), 145 (24), 285 (64)
20 Ácido <i>palmitico</i> (16:0), TMS	73 (87), 117 (100), 129 (41), 132 (50), 145 (32), 313 (80)
21 Ácido <i>margárico</i> (17:0), TMS	73 (100), 117 (95), 129 (40), 132 (49), 145 (31), 327 (58)
22 Ácido <i>esteárico</i> (18:0), TMS	73 (95), 117 (100), 129 (42), 145 (36), 341 (63)
23 Ácido 16-hidroxi <i>hexadecanoico</i> , 2TMS	73 (100), 103 (18), 117 (17), 129 (17), 147 (23), 204 (25), 217 (15), 311 (16), 385 (14), 401 (31)
24 Ácido <i>araquídico</i> (20:0), TMS	73 (97), 117 (100), 129 (43), 132 (57), 145 (42), 369 (57)
25 Ácido <i>heneicosanoico</i> (21:0), TMS	73 (100), 129 (43), 132 (44), 145 (34), 383 (41)
26 Ácido <i>docosanoico</i> (22:0), TMS	73 (82), 117 (100), 129 (45), 132 (62), 145 (50), 397 (63)
27 Ácido <i>tricosanoico</i> (23:0), TMS	73 (100), 117 (86), 129 (42), 132 (52), 145 (43), 411 (38)
28 Ácido <i>lignocérico</i> (24:0), TMS	73 (100), 117 (84), 129 (39), 132 (52), 145 (44), 425 (36)
29 Ácido 22-hidroxi <i>docosanoico</i> , 2TMS	55 (35), 103 (19), 117 (25), 129 (23), 147 (25), 204 (44), 217 (23), 395 (15), 469 (17), 485 (43)
30 Ácido <i>cerótico</i> (26:0), TMS	73 (92), 117 (100), 129 (47), 132 (67), 145 (58), 453 (47)
31 Ácido 24-hidroxi <i>tetracosanoico</i> , 2TMS	73 (100), 103 (20), 117 (27), 129 (23), 147 (23), 204 (44), 217 (22), 423 (9), 497 (11), 513 (28)
32 Ácido <i>octacosanoico</i> (28:0), TMS	73 (100), 117 (87), 129 (43), 132 (58), 145 (54), 481 (29)
33 Ácido 26-hidroxi <i>hexacosanoico</i> , 2TMS	73 (99), 103 (23), 117 (28), 129 (34), 147 (25), 204 (50), 217 (25), 451 (7), 525 (8), 541 (28)
34 Ácido <i>triacontanoico</i> (30:0), TMS	73 (100), 117 (90), 129 (47), 132 (62), 509 (29)
Diácido graxo	
Insaturado	
35 Ácido <i>octadecenedioico</i> , 2TMS	73 (100), 117 (20), 129 (37), 147 (17), 204 (7), 217 (10), 276 (12), 366 (5), 397 (9), 441 (17)
Saturado	
36 Ácido <i>subérico</i> (8:0), 2TMS	73 (100), 117 (18), 129 (20), 147 (22), 187 (26), 204 (8), 217 (10), 303 (15)
37 Ácido <i>azelaico</i> (9:0), 2TMS	73 (100), 117 (22), 129 (25), 147 (20), 201 (26), 204 (13), 217 (7), 317 (28)
38 Ácido <i>hexadecanedioico</i> , 2TMS	73 (100), 117 (31), 129 (34), 204 (57), 217 (36), 229 (2), 415 (39)

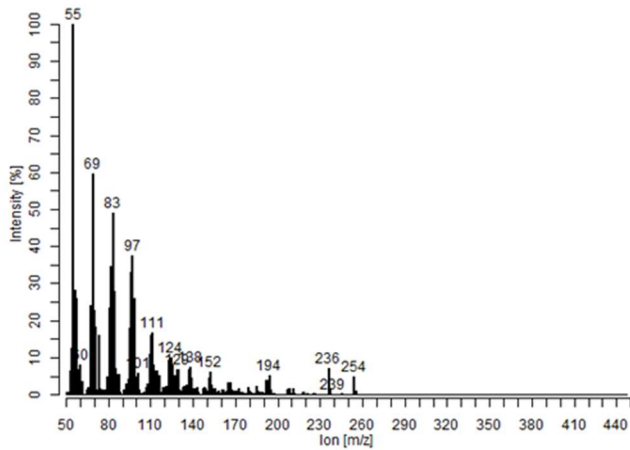
39	Ácido octadecanedióico, 2TMS	73 (100), 117 (30), 129 (31), 147 (11), 204 (43), 217 (26), 327 (10), 443 (23)
	Éster graxo	
	Éster de ácido monocarboxílico	
40	Hexadecanoato de metila	74 (100), 87 (63), 129 (6), 143 (14), 171 (3), 185 (4), 199 (3), 227 (8), 239 (4), 241 (2)
41	Linoleato de metila	67 (100), 81 (83), 95 (55), 109 (25), 123 (12), 135 (9), 150 (9), 220 (2), 263 (5)
42	Oleato de metila	55 (100), 69 (64), 74 (57), 83 (49), 97 (40), 111 (19), 180 (8), 222 (10), 264 (15)
43	Octadecanoato de metila	74 (100), 87 (67), 129 (6), 143 (16), 157 (2), 185 (2), 199 (6), 213 (2), 255 (9), 267 (3)
44	16-Hidroxihexadecanoato de metila, TMS	75 (74), 103 (31), 129 (6), 146 (17), 159 (11), 311 (100), 327 (4), 343 (30)
45	18-Hidroxiocetadecanoato de metila, TMS	75 (92), 81 (59), 95 (48), 109 (27), 123 (13), 146 (12), 159 (15), 337 (17), 353 (3), 369 (6)
46	9,10-Dihidroxiocetadecanoato de metila, 2TMS	73 (100), 103 (24), 129 (18), 147 (7), 215 (16), 243 (2), 259 (14), 332 (2), 443 (1)
47	Docosanoato de metila	74 (100), 87 (71), 97 (10), 129 (9), 143 (19), 185 (3), 199 (4), 255 (4), 311 (8), 323 (2)
48	Docosanoato de etila	57 (32), 88 (100), 101 (64), 157 (17), 325 (6)
49	Tetracosanoato de metila	74 (100), 87 (76), 129 (10), 143 (21), 185 (3), 199 (4), 297 (11), 339 (7)
50	Tetracosanoato de etila	88 (100), 101 (67), 157 (18), 353 (6)
51	Hexacosanoato de metila	74 (100), 87 (74), 97 (15), 129 (12), 143 (22), 199 (4), 207 (6), 311 (2), 367 (7)
52	Hexacosanoato de etila	57 (46), 69 (24), 88 (100), 101 (69), 143 (7), 157 (18), 381 (4)
53	Octacosanoato de metila	74 (100), 87 (80), 97 (15), 143 (24), 185 (3), 199 (5), 221 (4), 395 (6)
54	Triacotanoato de metila	74 (100), 87 (82), 97 (17), 143 (25), 185 (3), 199 (5), 423 (6)
	Diéster de ácido dicarboxílico	
56	Dimetil hexadecanodioato	55 (77), 69 (45), 74 (68), 84 (47), 98 (100), 112 (31), 209 (9), 241 (12), 250 (3), 283 (16)
57	Dimetil octadecenedioato	55 (100), 67 (58), 74 (39), 81 (59), 95 (40), 98 (39), 109 (20), 276 (20), 290 (4), 309 (10)
	Monoéster de ácido dicarboxílico	
58	Monometil azelato, TMS	73 (100), 117 (54), 129 (21), 152 (20), 159 (14), 171 (19), 183 (10), 201 (9), 243 (8), 259 (25)
59	Ácido hexadecanedióico monometil éster, TMS	73 (100), 74 (29), 98 (51), 117 (82), 129 (32), 146 (32), 159 (33), 269 (17), 307 (11), 313 (8), 341 (8), 357 (31)
	Monoacilglicerol	
60	1-Mono-(ácido hexadecanedioico-1-oil)-glicerol, 3TMS	73 (100), 103 (34), 117 (20), 129 (28), 147 (28), 203 (10), 204 (20), 217 (9), 341 (10), 473 (22), 561 (2)
61	1-Mono-(docosanoil)-glicerol, 2TMS	73 (77), 103 (26), 117 (15), 129 (39), 147 (43), 203 (15), 218 (7), 397 (5), 455 (100), 543 (10)
62	1-Mono-(tetracosanoil)-glicerol, 2TMS	73 (100), 103 (29), 129 (45), 147 (45), 203 (19), 205 (28), 483 (73), 571 (10)
	Álcool graxo primário	
63	Docosanol, TMS	75 (64), 103 (25), 383 (100)
64	Tetracosanol, TMS	75 (65), 83 (20), 103 (26), 411 (100)
65	Hexacosanol, TMS	75 (70), 83 (29), 103 (29), 439 (100)
66	Octacosanol, TMS	75 (72), 83 (25), 103 (31), 467 (100)
67	Nonacosanol, TMS	75 (83), 83 (30), 103 (33), 481 (100)
68	Triacotanol, TMS	75 (89), 83 (32), 103 (38), 495 (100)
	Fenólicos	
	C₆-C₁	
69	Vanilina, TMS	73 (29), 194 (100), 209 (43)
70	Siringaldeido, TMS	59 (11), 73 (42), 224 (100), 239 (42)
71	Ácido vanílico, 2TMS	73 (87), 126 (45), 223 (63), 253 (51), 267 (75), 282 (31), 297 (100)
72	Ácido sirngico, 2TMS	73 (100), 141 (32), 223 (20), 253 (35), 283 (17), 297 (49), 312 (56), 327 (76)
	C₆-C₃	

73	Álcool dihidroconiferílico, 2TMS	73 (100), 141 (29), 179 (23), 206 (80), 221 (14), 236 (12), 311 (11)
74	Ácido ferúlico, 2TMS	73 (94), 146 (21), 219 (22), 249 (52), 279 (10), 293 (36), 308 (54), 323 (58)
Lactona		
75	3-Hidroxidecano-5-lactona, TMS	73 (80), 101 (100), 117 (14), 129 (20), 145 (30), 201 (19), 225 (14), 243 (16)
76	4,8,12,16-Tetrametilheptadecan-4-olídeo	55 (29), 69 (24), 83 (14), 99 (100), 114 (15), 126 (12), 151 (3), 196 (2), 254 (1)
Purina		
77	Ácido úrico, tetrakis-TMS	73 (100), 100 (5), 131 (4), 147 (17), 353 (1), 367 (4), 382 (7), 441 (31)
Diterpeno		
78	hC_37.93	73 (100), 121 (33), 189 (8), 227 (14)
79	hC_38.49	73 (100), 215 (8), 270 (21), 332 (5), 373 (10), 449 (2)
80	hC_42.64	73 (100), 121 (29), 186 (35), 239 (7), 474 (1), 477 (1)
81	hC_42.74	73 (100), 117 (22), 121 (24), 186 (30), 439 (8)
82	hC_43.05	73 (100), 121 (31), 208 (8), 284 (8), 359 (3), 402 (3), 448 (1), 474 (1), 477 (1)
83	hC_43.14	73 (100), 121 (29), 208 (7), 284 (8), 359 (3), 402 (3), 448 (1), 474 (1), 477 (1)
Esqueleto kaurano		
84	Ácido <i>ent</i> -caurenóico, TMS	73 (100), 241 (24), 257 (34), 331 (15), 359 (21)
85	Ácido *hidroxi- <i>ent</i> -caurenóico, 2TMS	73 (100), 156 (19), 182 (13), 239 (11), 254 (11), 344 (2), 357 (4), 372 (3), 447 (7)
Esqueleto labdano		
86	Ácido 14,15-dinor-13-oxolabd-8(17)-en-19-óico, TMS	73 (100), 121 (65), 188 (17), 229 (15), 246 (11), 349 (2)
87	#Ácido hidroxidinorlabd-8(17)-enóico, 2TMS	73 (100), 121 (43), 230 (10) [M-118-90], 305 (12), 320 (9), 423 (6)
88	Ácido copálico, TMS	73 (95), 156 (78), 172 (100), 229 (21), 244 (56), 361 (9)
Lactona diterpênica		
89	Nivenolídeo, TMS	73 (100), 121 (60), 271 (17), 286 (28), 307 (9), 389 (5)
Fitosteroide		
90	hS_dS_51.34	73 (100), 129 (69), 161 (39), 187 (21), 410 (10), 395 (29), 485 (7)
Esqueleto estigmastano		
91	Estigmasterol, TMS	73 (71), 83 (100), 129 (60), 255 (26), 394 (15), 469 (2)
92	β -Sitosterol, TMS	73 (49), 129 (100), 357 (55), 381 (20), 396 (41), 471 (5)
93	Estigmasta-4,22-dien-3-ona	55 (100), 69 (49), 81 (49), 97 (42), 123 (29), 147 (27), 245 (24), 271 (40), 298 (26), 367 (19)
94	β -Sitostenona	124 (100), 229 (37), 289 (13), 397 (5)
Esqueleto ergostano		
95	Campesterol, TMS	73 (57), 129 (100), 343 (52), 367 (19), 382 (38), 457 (5)
96	4-Campesten-3-ona	124 (100), 147 (28), 229 (35), 271 (7), 275 (14), 383 (8)
Triterpeno		
97	hC_dC_49.30	73 (100), 149 (24), 189 (36), 266 (10), 353 (4), 431 (7), 443 (3), 455 (2), 470 (3), 545 (3)
98	#Metil moronato ou betulonato	189 (100), 203 (39), 249 (20), 262 (29), 354 (6), 393 (5), 409 (11), 453 (2)
99	hC_52.09	55 (100), 147 (93), 205 (89), 327 (23), 397 (6)
100	hC_dC_52.45	73 (100), 189 (68), 219 (85), 355 (3), 357 (34), 381 (17), 396 (26), 429 (15), 471 (2)
101	hC_52.49	73 (100), 147 (36), 205 (28), 410 (19), 513 (8)
Esqueleto oleano		
102	β -Amirina, TMS	73 (81), 189 (22), 203 (41), 218 (100), 279 (3), 483 (5)
103	β -Amirona	189 (20), 203 (59), 218 (100), 409 (3)
104	Ácido oleanônico, TMS	73 (73), 189 (56), 203 (100), 307 (9), 320 (8), 408 (37), 511 (7)
105	Ácido oleanólico, 2TMS	73 (95), 189 (37), 203 (100), 320 (21), 482 (9), 585 (2)
106	Ácido acetil-oleanólico, TMS	73 (48), 189 (39), 203 (100), 307 (5), 320 (15), 452 (16), 555 (3)
107	Ácido *hidroxioleanólico, 3TMS	73 (100), 147 (33), 187 (17), 203 (54), 320 (14), 391 (2), 508 (1), 570 (3), 583 (1), 598 (1), 673 (1)
Esqueleto lupano		

108	Lupenona	81 (83), 95 (94), 109 (100), 189 (55), 205 (99), 245 (24), 313 (21), 409 (11)
109	Lupeol, TMS	73 (100), 109 (85), 189 (90), 203 (45), 218 (23), 279 (10), 369 (14), 393 (6), 408 (4), 483 (4)
110	hL_50.24	-
111	Betulina, TMS	73 (100), 95 (48), 189 (73), 203 (46), 279 (7), 393 (8), 483 (10), 496 (8), 571 (1)
112	Ácido betulônico, TMS	73 (100), 189 (80), 203 (31), 218 (11), 226 (18), 307 (11), 320 (9), 354 (8), 409 (14), 444 (13), 511 (7)
113	Ácido betulínico, 2TMS	73 (100), 189 (86), 203 (32), 292 (22), 320 (17), 585 (3)
114	hL_51.01	189 (54), 203 (26) 497 (3)
115	Ácido acetil-betulínico, TMS	73 (100), 189 (87), 203 (38), 307 (13), 320 (11), 453 (5), 495 (4), 510 (4), 555 (4)
116	Ácido platânico, 2TMS	73 (100), 189 (61), 203 (10), 279 (5), 295 (7), 335 (3), 473 (11), 512 (6), 587 (2)
117	Ácido *hidroxibetulínico, 3TMS	73 (100), 187 (36), 201 (20), 279 (6), 481 (5), 598 (3), 673 (1)
118	dC_56.39	73 (100), 147 (28), 189 (27), 203 (7), 559 (9), 587 (3), 600 (1), 675 (2)
	Esqueleto ursano	
119	α-Amirona	189 (24), 203 (27), 218 (100), 409 (6)
120	α-Amirina, TMS	73 (34), 189 (26), 203 (18), 218 (100), 279 (5), 483 (1)
121	Ácido ursônico, TMS	73 (100), 133 (76), 189 (36), 203 (100), 307 (21), 320 (34), 408 (22), 511 (6)
122	Ácido ursólico, 2TMS	73 (100), 133 (44), 189 (30), 203 (71), 320 (40), 585 (2)
123	Ácido acetil-ursólico, TMS	73 (59), 133 (60), 189 (34), 203 (100), 307 (15), 320 (46), 452 (9), 555 (4)
124	Ácido *hidroxiursólico, 3TMS	73 (100), 133 (37), 147 (41), 189 (20), 203 (65), 278 (7), 320 (43), 508 (1), 570 (2), 598 (2), 673 (1)
	n.i. Copaifera	
125	hC_25.14	73 (32), 309 (9), 325 (100)
126	hC_51.55	73 (29), 131 (100), 215 (14)
	n.i. Leptolobium	
127	hL_34.65	-
128	hL_dL_35.01	73 (100), 131 (77), 309 (38), 347 (16), 381 (10), 437 (3)
129	dL_34.97	73 (66), 131 (100), 347 (32), 437 (1)
130	hL_36.02	-
131	hL_47.61	73 (57), 484 (100), 559 (1)
132	hL_51.55	-
	n.i. Erythroxyllum	
	Diálcool ou Hidroxiácido	
133	dE_7.82	73 (98), 117 (40), 131 (100), 147 (29), 247 (2)
134	dE_8.04	73 (55), 115 (2), 131 (100), 147 (20), 247 (2)
135	dE_8.55	73 (91), 131 (31), 145 (100), 157 (9), 233 (3), 247 (2)
136	dE_8.69	73 (94), 131 (52), 145 (100), 147 (38), 233 (3), 247 (3)
	Diálcool	
137	C ₆ H ₁₂ O ₂ , 2TMS	73 (100), 117 (13), 129 (14), 147 (42), 155 (87), 170 (60), 245 (3)
138	C ₆ H ₁₂ O ₂ , 2TMS	73 (44), 117 (16), 131 (100), 147 (9), 191 (1), 219 (1), 233 (2), 245 (1)
139	hE_dE_40.71	73 (100), 147 (14), 204 (7), 217 (9), 329 (77), 343 (5), 441 (3), 529 (3)
	n.i. Salvertia	
140	hS_dS_15.78_16.24	73 (100), 117 (8), 129 (11), 143 (24), 147 (36), 163 (6), 169 (11), 205 (29), 217 (5), 243 (34)
141	hS_dS_15.78_16.24	73 (100), 117 (8), 129 (11), 143 (24), 147 (36), 163 (6), 169 (11), 205 (29), 217 (5), 243 (34)
142	hS_dS_28.10	73 (46), 125 (17), 223 (34), 135 (2), 250 (19), 265 (100), 325 (22), 340 (8)
143	dS_29.73	73 (100), 117 (16), 147 (27), 205 (18), 223 (89), 297 (8), 312 (23), 398 (2), 413 (5), 428 (2)
144	dS_30.65	57 (100), 73 (83), 111 (74), 129 (35), 201 (31), 245 (23)
145	hS_36.83	73 (100), 81 (34), 129 (52), 147 (16), 276 (11), 383 (10), 443 (2), 458 (1)
146	hS_dS_37.53	57 (31), 73 (100), 125 (17), 147 (25), 191 (8), 203 (21), 218 (24), 231 (8), 247 (99)

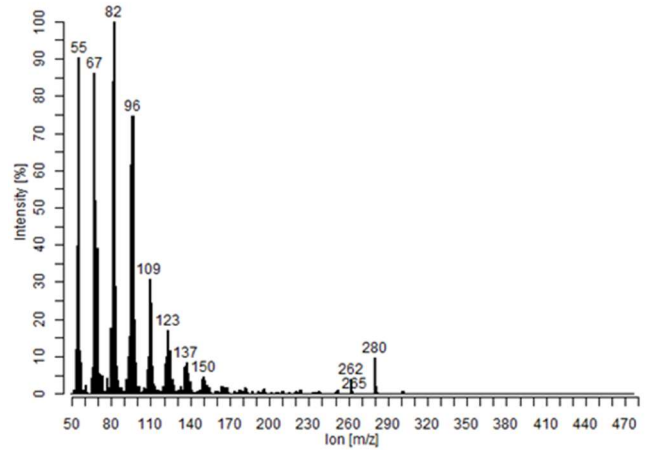
147 dS_37.90_38.12	73 (59), 103 (2), 117 (1), 129 (1), 133 (1), 147 (4), 179 (2), 192 (3), 209 (6), 223 (3), 267 (2), 281 (1), 297 (100)
148 dS_37.90_38.12	73 (64), 103 (1), 117 (1), 129 (1), 133 (1), 147 (3), 179 (2), 192 (3), 209 (5), 223 (3), 267 (2), 281 (1), 297 (100)
149 dS_40.86	57 (89), 73 (100), 101 (36), 129 (25), 155 (27), 173 (20), 217 (23), 329 (37), 343 (5)
150 dS_40.99	73 (72), 223 (100), 311 (6), 444 (2), 519 (2), 534 (1)

Hexadecanolactone

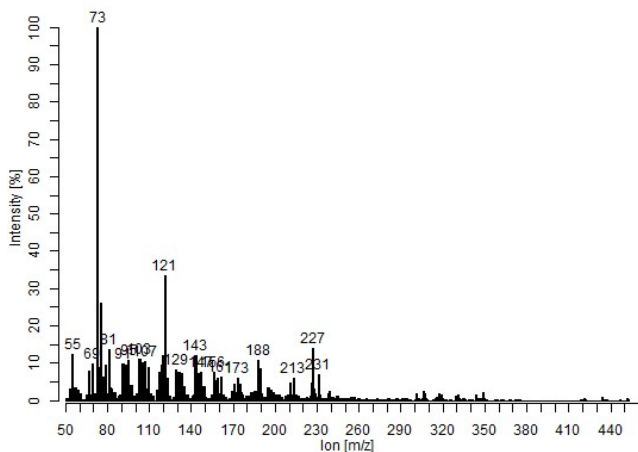


hc_37.93

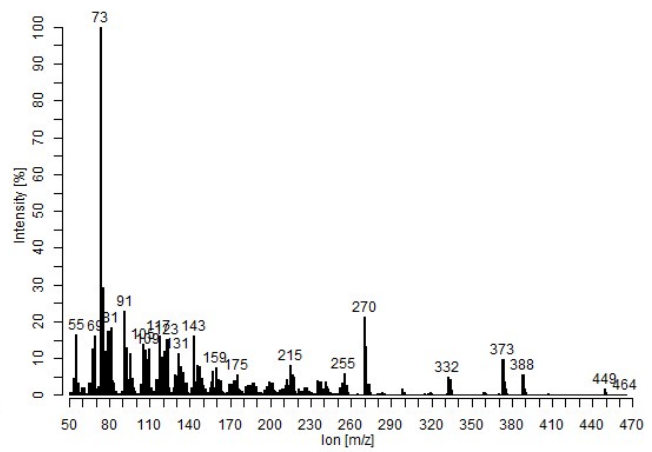
Octadecenolactone



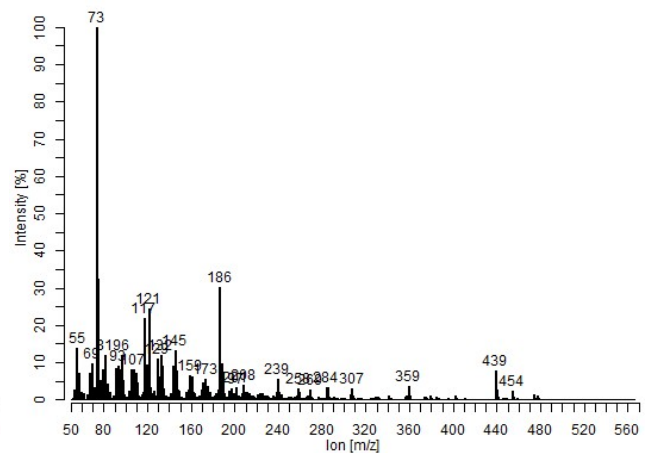
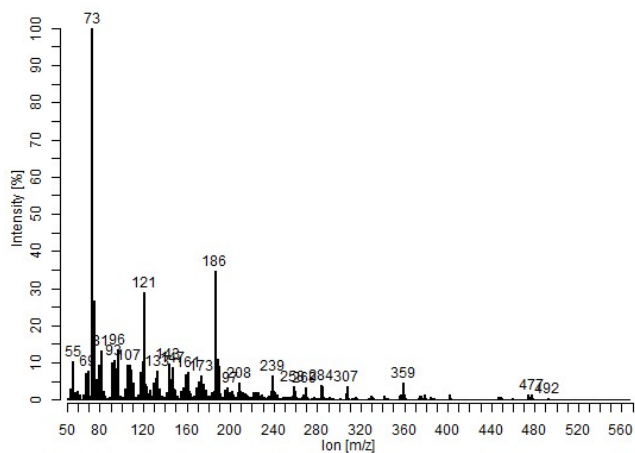
hc_38.49



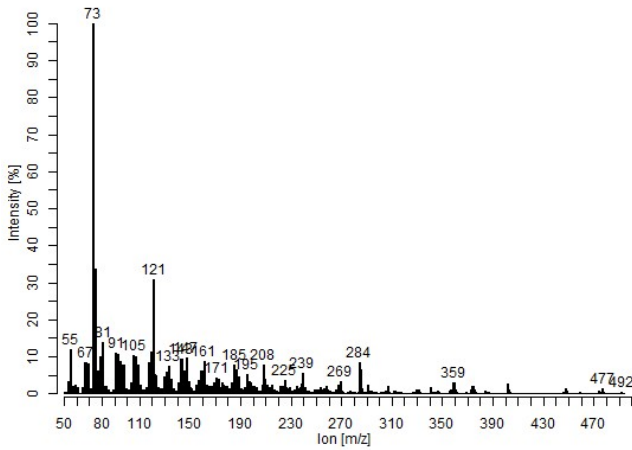
hc_42.64



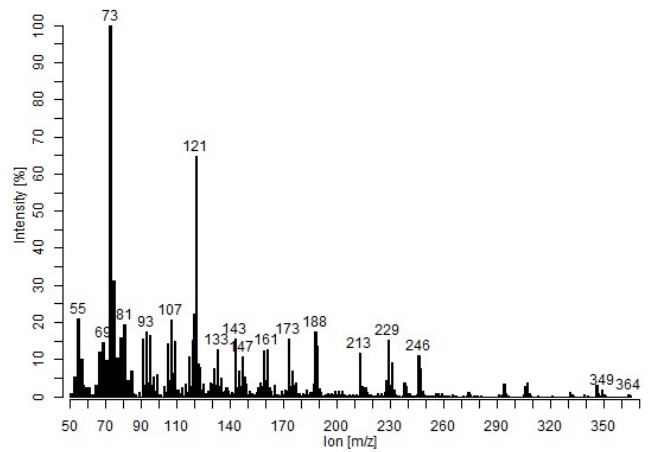
hc_42.74



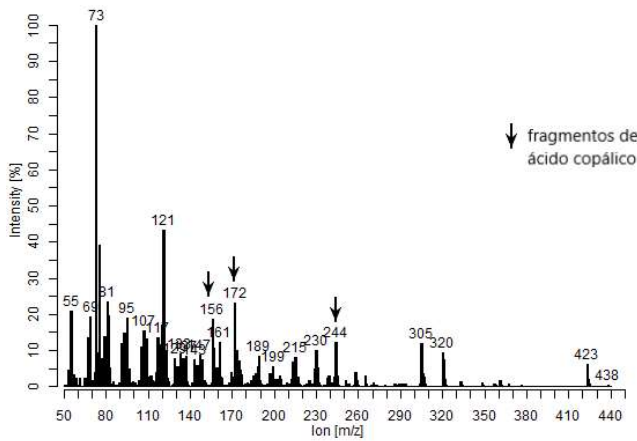
hC_43.05/43.14



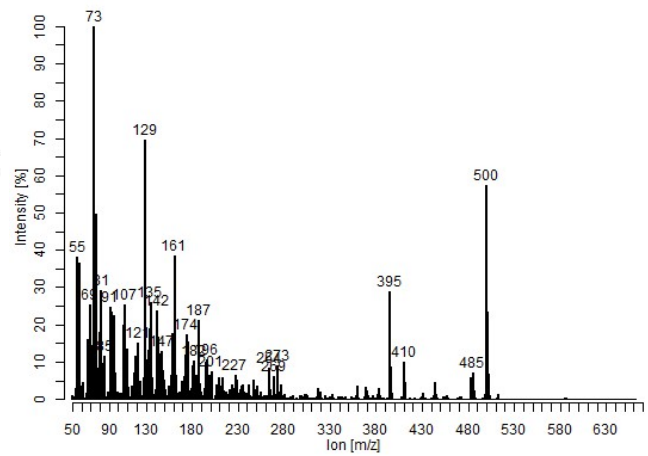
Ácido 14,15-dinor-13-oxo-8(17)-labden-19-óico, TMS



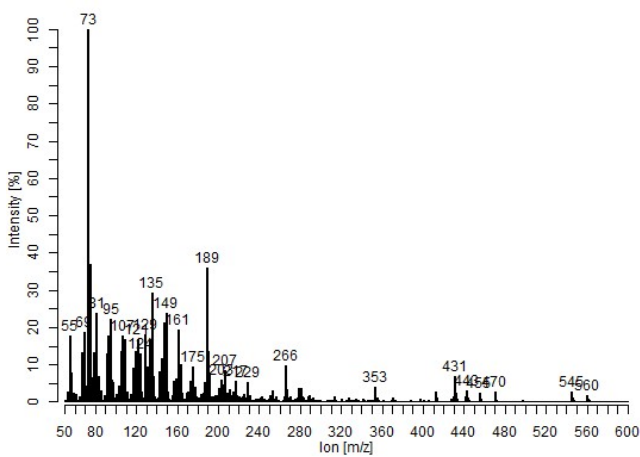
hC_35.20



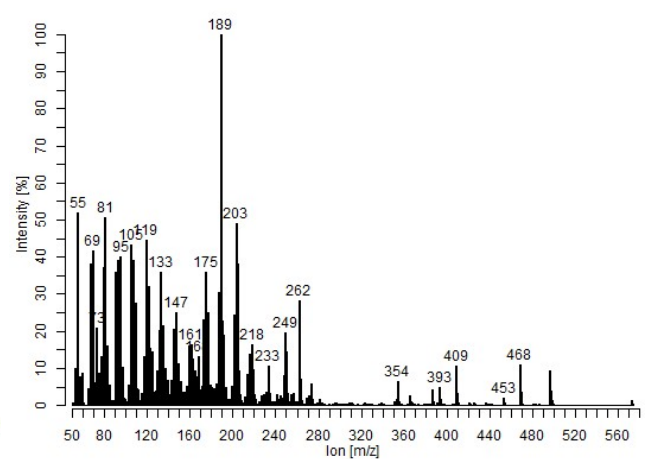
hS_dS_51.34



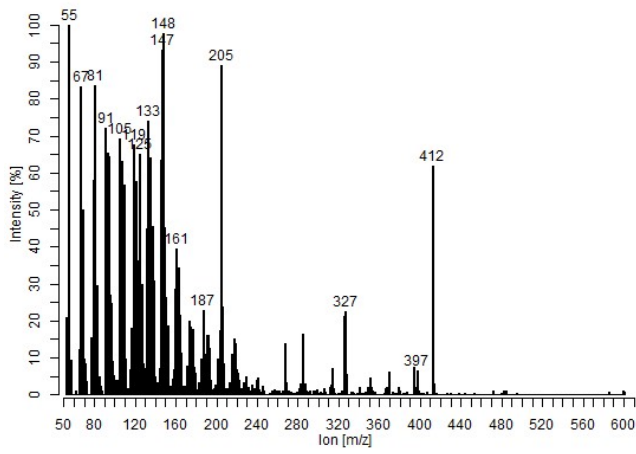
hC_49.26



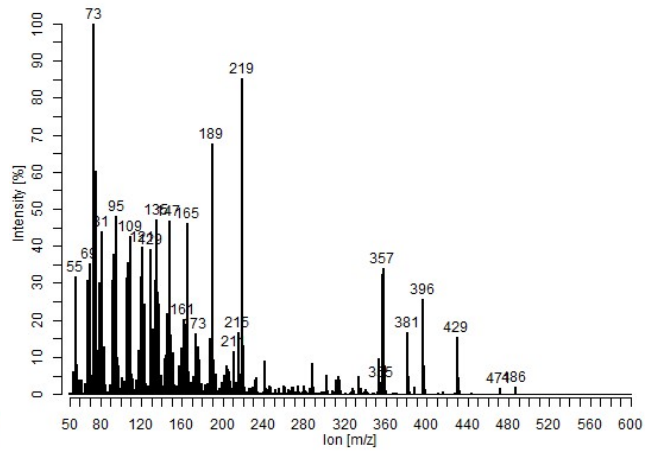
Metil moronato



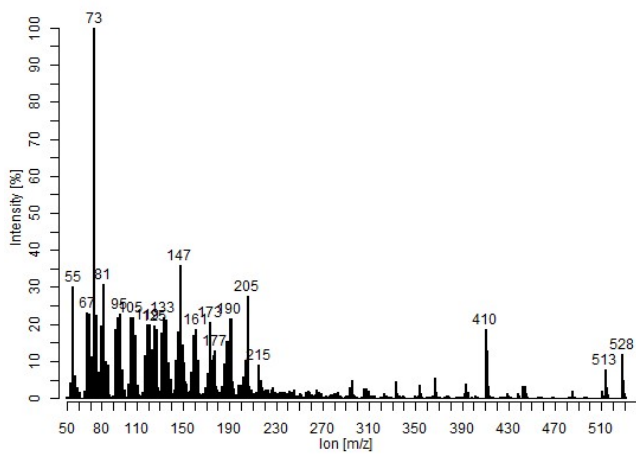
hc_52.09



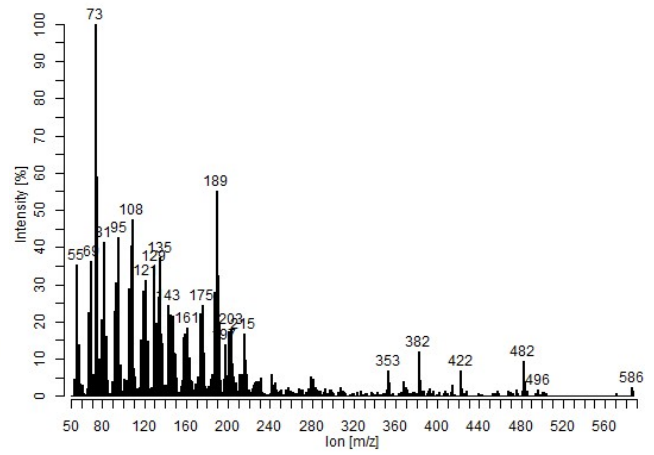
hc_52.41



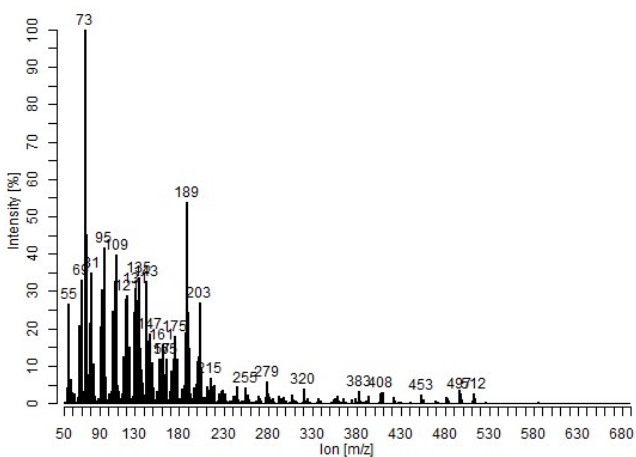
hc_52.49



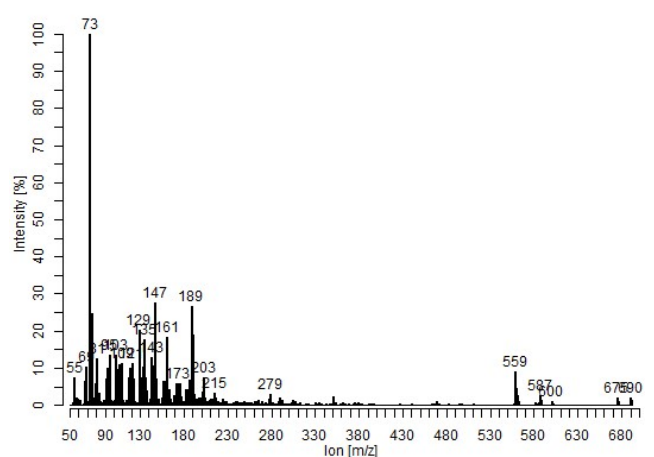
hL_50.24



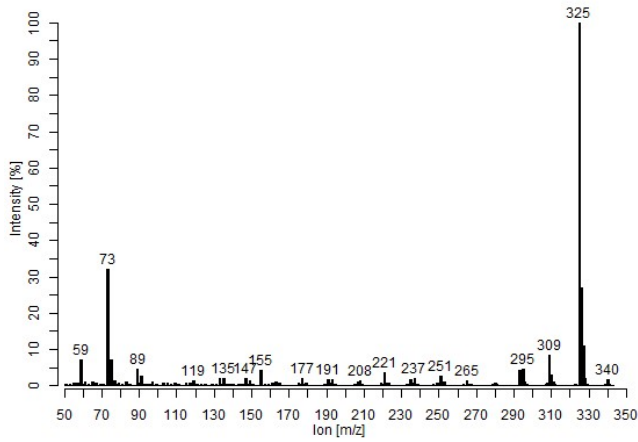
hL_51.01



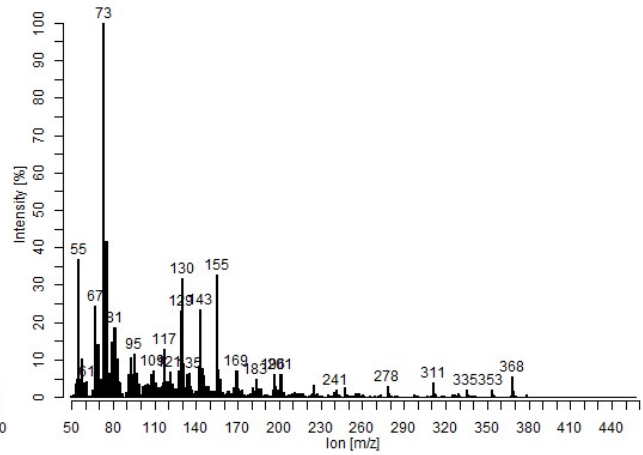
dC_56.39



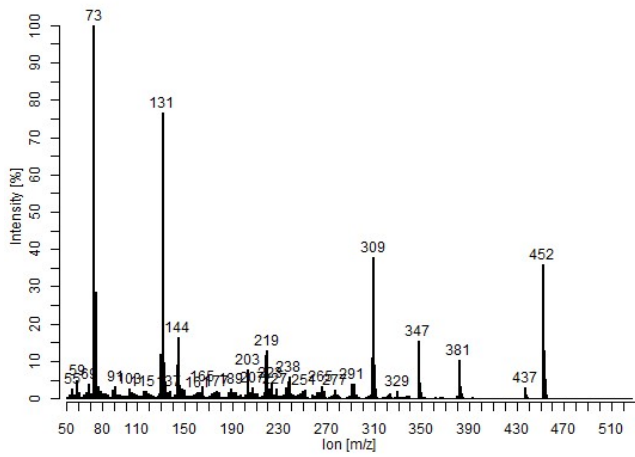
hC_25.14



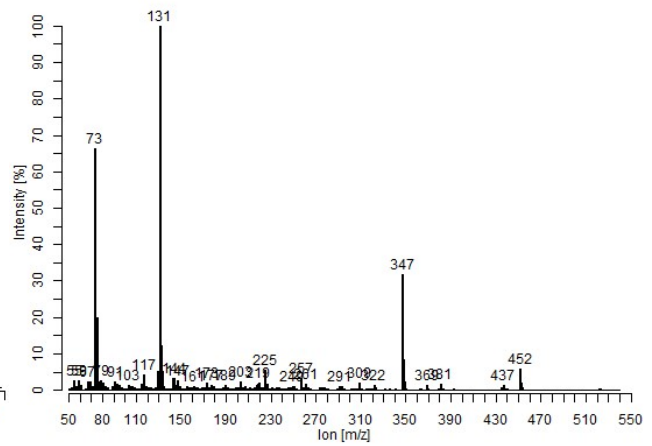
hL_34.65



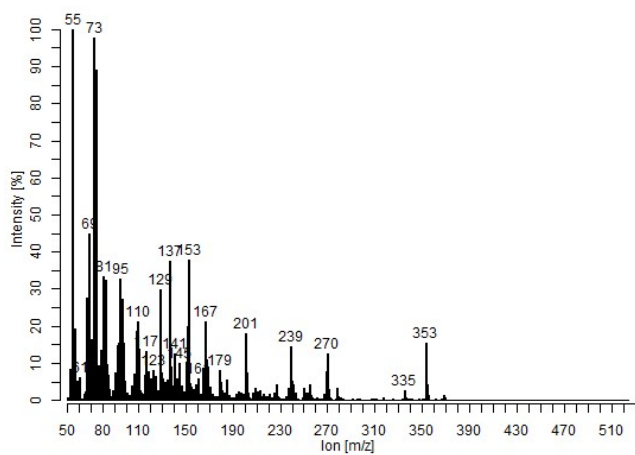
hL_dL_35.01



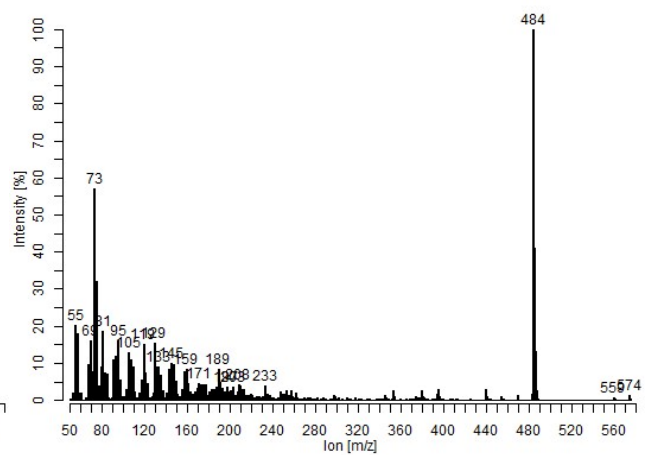
dL_34.97



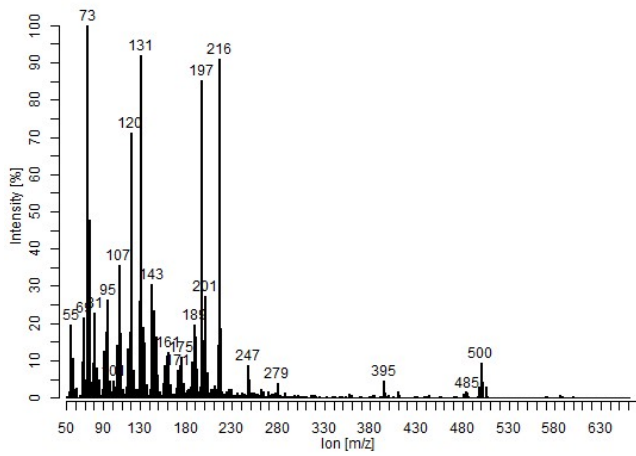
hL_36.02



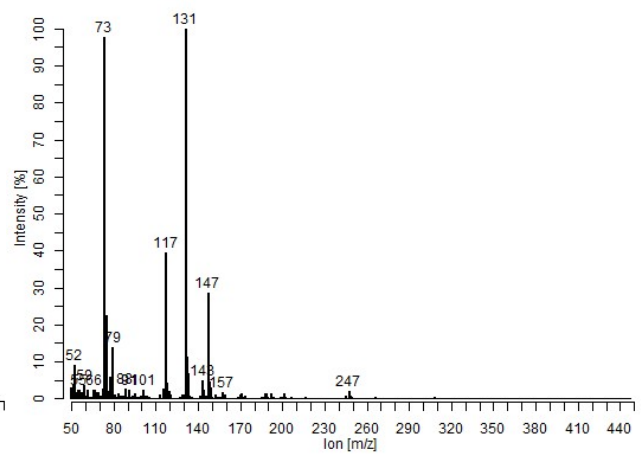
hL_47.61



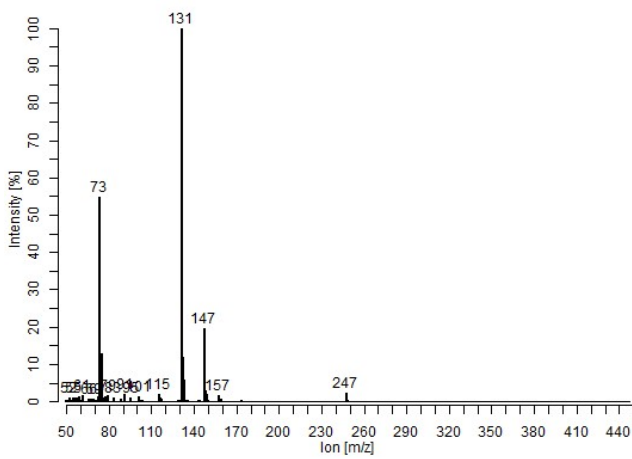
hL_51.55



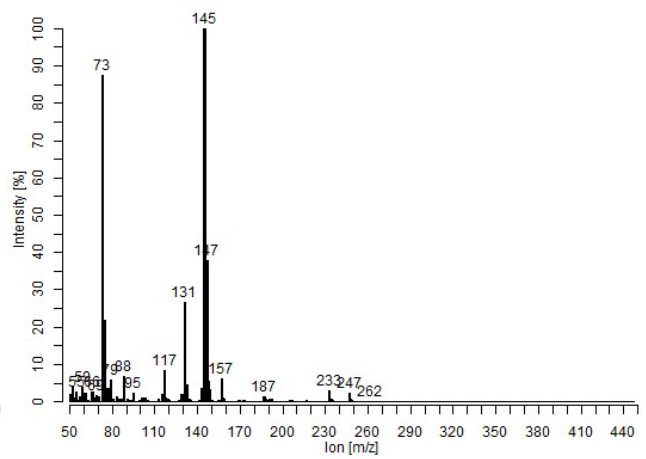
dE_7.82



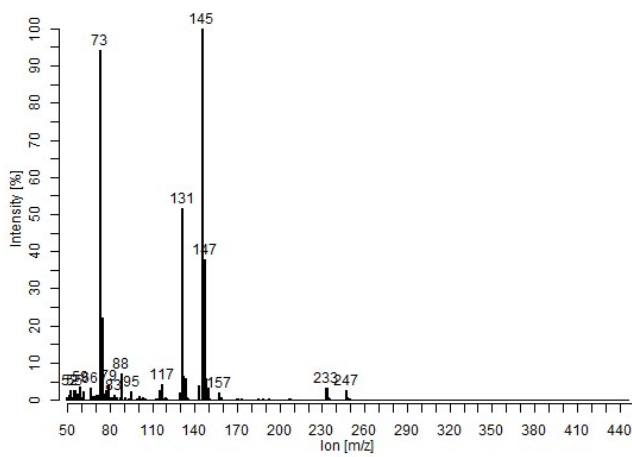
dE_8.04



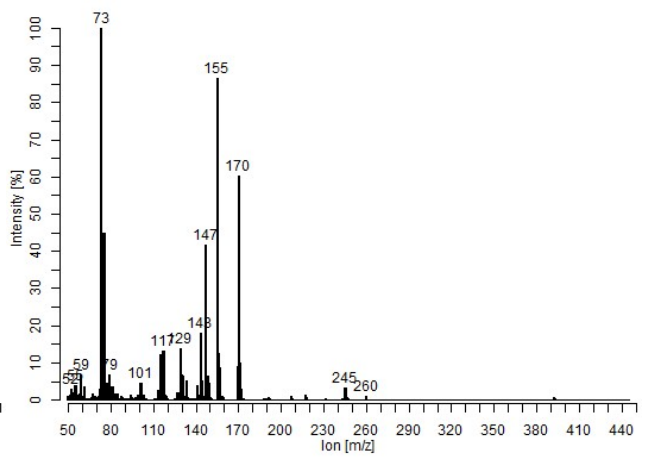
dE_8.55



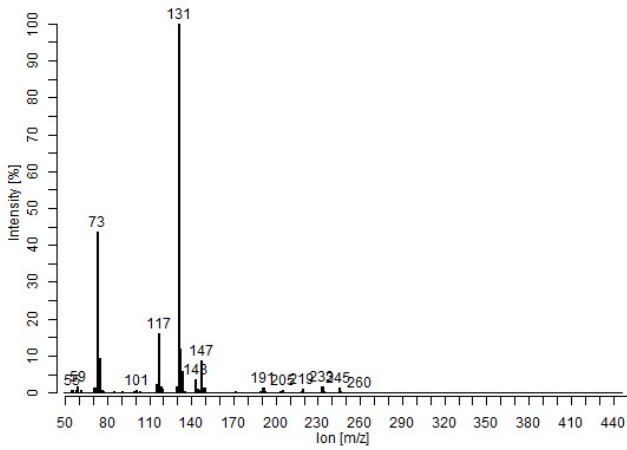
dE_8.70



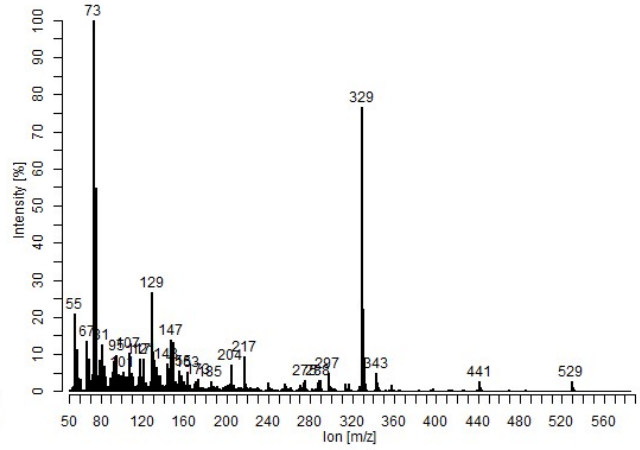
dE_9.34



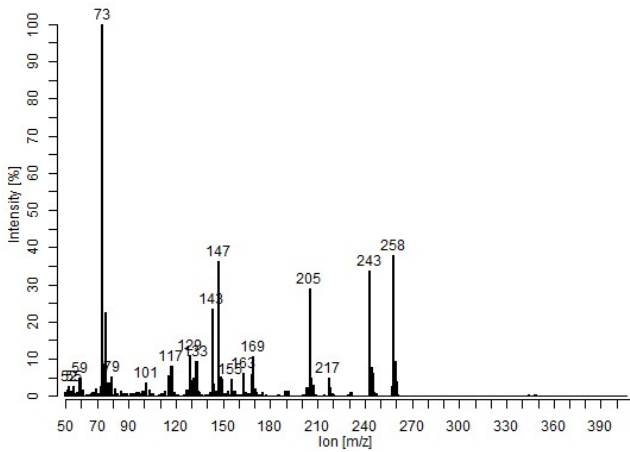
dE_14.03



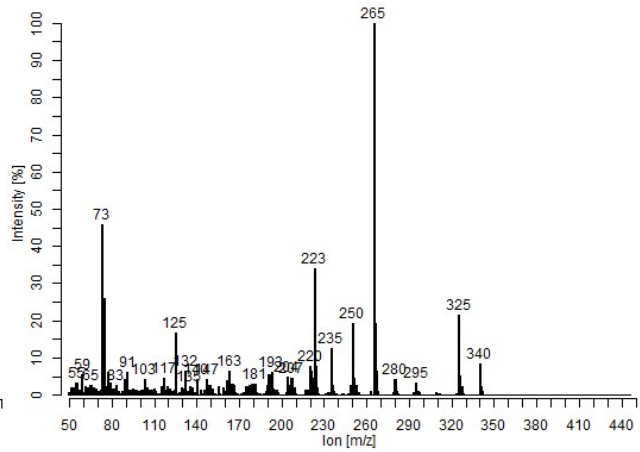
hE_dE_40.71



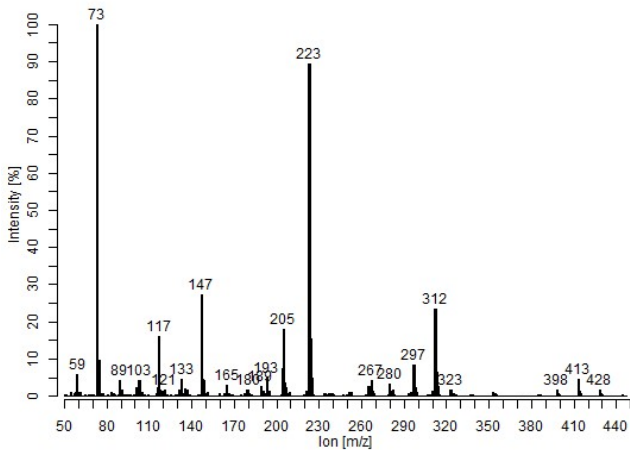
hS_hS_15.78_16.24



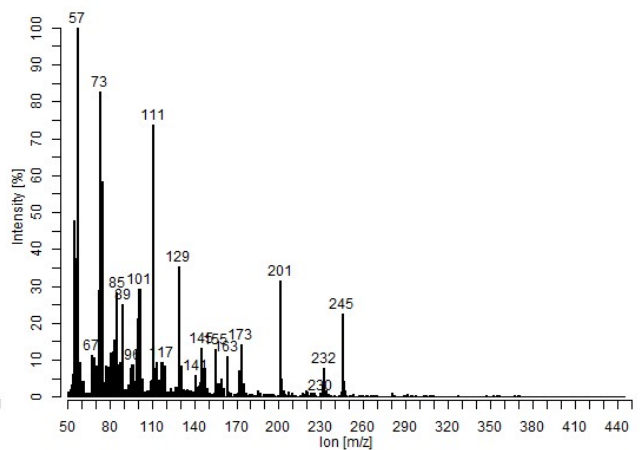
hS_dS_28.01



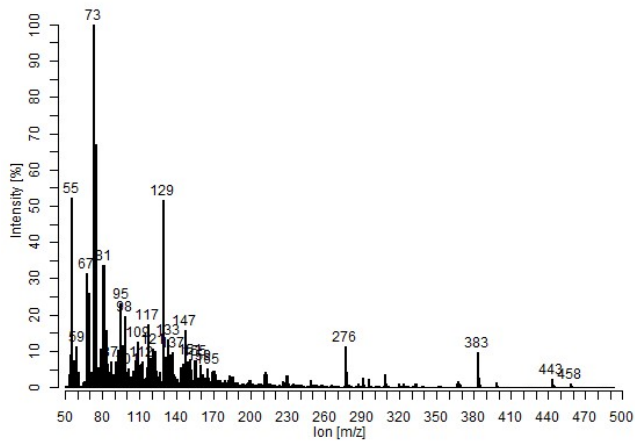
dS_29.73



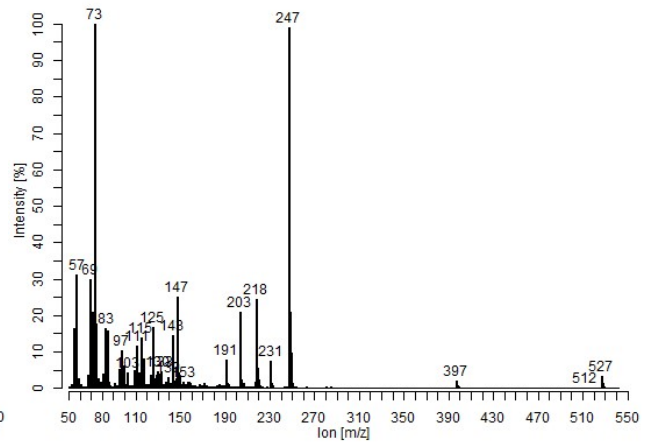
dS_30.65



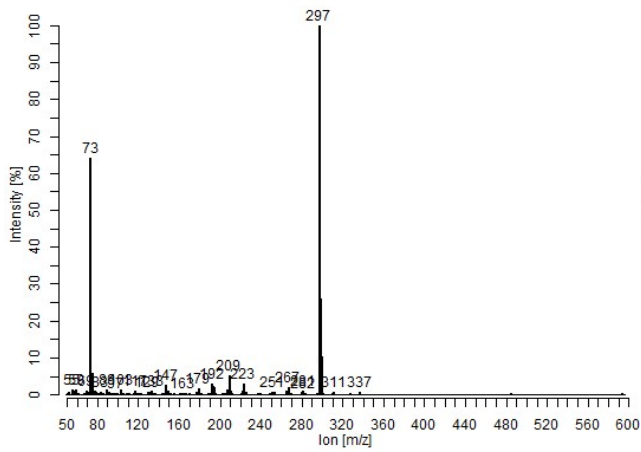
hs_36.83



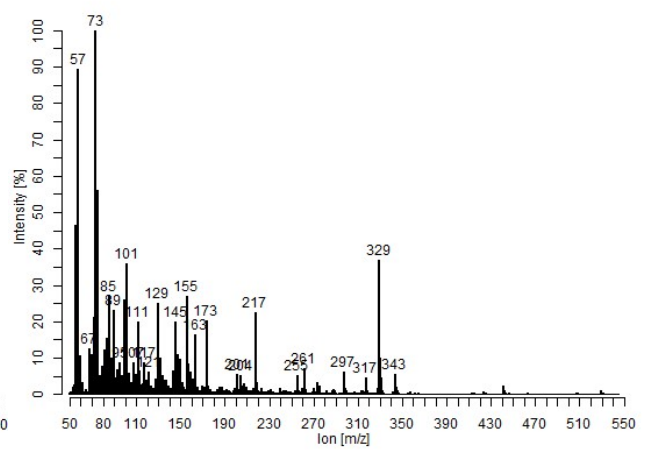
hs_ds_37.53



ds_37.90_38.12



ds_40.86



ds_40.99

