

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

**RESÍDUOS MADEIREIROS DE *Cedrela odorata* L. DE DEMOLIÇÃO:
INVESTIGAÇÃO FITOQUÍMICA E ATIVIDADE ANTIFÚNGICA**

PAULO ALAN DUARTE NOGUEIRA

MANAUS
2018

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

PAULO ALAN DUARTE NOGUEIRA

**RESÍDUOS MADEIREIROS DE *Cedrela odorata* L. DE DEMOLIÇÃO:
INVESTIGAÇÃO FITOQUÍMICA E ATIVIDADE ANTIFÚNGICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Química.

Área de concentração: Química Orgânica.

Orientadora: Dra. Maria da Paz Lima (INPA)

Co-orientadora: Dra. Claudete Catanhede do Nascimento (INPA)

MANAUS
2018

Ficha Catalográfica

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

N778r Nogueira, Paulo Alan Duarte
Resíduos madeireiros de Cedrela odorata L. de demolição:
Investigação fitoquímica e atividade antifúngica / Paulo Alan Duarte
Nogueira. 2018
91 f.: il. color; 31 cm.

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

1. Resíduos madeireiros de demolição. 2. Mexicanolída. 3.
Limonoides. 4. Cadaleno. I. Lima, Maria da Paz II. Universidade
Federal do Amazonas III. Título

“RESÍDUOS MADEIREIROS DE *Cedrela odorata* L. DE DEMOLIÇÃO: INVESTIGAÇÃO FITOQUÍMICA E ATIVIDADE ANTIFÚNGICA”.

Paulo Alan Duarte Nogueira

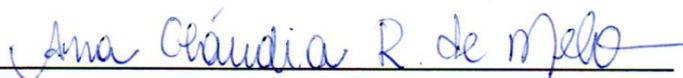
Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal do Amazonas como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre em Química.

Aprovado, em 10 de dezembro de 2018.

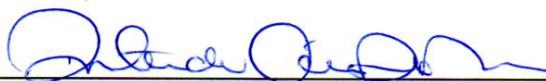
COMISSÃO EXAMINADORA



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



Prof.ª Dr.ª Ana Claudia Rodrigues de Melo
Membro Externo



Prof.ª Dr.ª Rita de Cássia Saraiva Nunomura
Membro UFAM

Universidade Federal do Amazonas
Manaus, 10 de dezembro de 2018.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por toda boa obra realizada em minha vida, sempre me dando forças e esperança para vencer os obstáculos.

Aos meus pais, Margareth Duarte e Antônio Gomes, que me ensinaram a valorizar o mais importante da vida, o amor, a perseverança, o respeito, a honestidade e a fé. Obrigado, por serem os melhores pais que Deus poderia ter me dado neste mundo!

À minha esposa, Lindy Duarte, por todo amor, paciência, companheirismo e compreensão. Imagino o quanto foi difícil suportar tanta ausência. Essa conquista também é nossa! Obrigado por tudo my love!

Aos meus tesouros mais que preciosos, meus filhos Camille e Arthur Duarte, por suportarem minha ausência na fase mais importante de suas vidas. Papai ama mais que tudo na vida!

Aos meus sogros Sr. Luiz Avelino e Dona Lucia Soares.

À minha orientadora Dra. Maria da Paz Lima, por ter me aceitado como orientando mesmo sem nunca ter me visto na vida. Agradeço todas as contribuições e orientações neste trabalho, além do carinho com o qual sempre me tratou durante todo meu tempo aqui.

À Dra. Claudete Nascimento, por disponibilizar os resíduos madeireiros e ajudar a tirar minhas dúvidas de forma carinhosa e gentil.

À Dra. Lyege Oliveira, por ter me apresentado a minha orientadora e pelo carinho.

À Dra. Loretta Ennes, por ter me apresentado a rotina do LQPN e contribuído bastante para minha iniciação no mundo da fitoquímica.

Aos amigos Henrique Cativo, Moacir Guimarães, Bruno Jensen e Berna Souza, pela força dada, a qual tanto me ajudou a seguir em frente. A amizade de vocês é um presente de Deus!

Aos colegas do Laboratório de Química de Produtos Naturais da COTI/INPA, Renan Feitosa, Jean Lucas, Jenifer Santiago e Welen Santiago, Daniele Roque, Ayrton Teles e Priscila Brasil pelo companheirismo durante as atividades do dia-a-dia e pelos momentos de descontração.

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

Aos professores da Banca.

À Ana Cortez e Marielle Macêdo, pelos ensaios antifúngicos.

Aos professores Raimundo Viana e Euller Eleotério, pela grande parceria para a realização deste trabalho.

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) pelo uso de suas instalações.

“Nas grandes batalhas da vida, o primeiro passo para a vitória é o desejo de vencer”

Mahatma Gandhi

RESUMO

A crescente preocupação com a conservação e a valoração das espécies florestais da Amazônia, aliadas as descobertas de novas substâncias provenientes dessas espécies, tem tornado a busca por princípios ativos cada vez maior. O grupo “Plantas da Amazônia: Química, Quimiosistemática e Atividade Biológica” (INPA) desenvolve investigações fitoquímica a partir de resíduos madeireiros. Neste estudo foi avaliada a espécie *Cedrela odorata* L. (Meliaceae). O material, proveniente de demolição, foi disponibilizado pelo projeto INCT Madeiras da Amazônia através, do LTM, após prévia identificação e utilizada na investigação química e avaliação da atividade antifúngica. Após os fracionamentos cromatográficos e análise por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), o trabalho com o extrato hexânico resultou no isolamento do sesquiterpeno cadaleno (**1**); na obtenção, em misturas, dos triterpenos cicloeucalenona (**2**), α e β -amirenona (**3** e **4**) e o acetato de butirospermol (**5**); dos esteroides β -sitosterol e estigmasterol (**6** e **7**), além do isolamento do limonóide mexicanolída (**8**). O fracionamento com extrato metanólico conduziu o isolamento do limonóide gedunina (**9**). Ao considerar o elevado potencial biológico dos limonóides, foi realizado o ensaio antifúngico com o mexicanolída frente às cepas de *Cryptococcus neoformans* (VNI WM 148/08), *Cryptococcus gattii* (VGII WM 178/08) e *Cândida albicans* (ATCC 13803). O limonóide mexicanolída apresentou maior atividade contra as cepas de *C. neoformans* (CIM 160 μ g/ml) através da técnica de microdiluição em caldo.

Palavras-chave: Resíduos madeireiros de demolição; Mexicanolída; Limonóides; cadaleno.

ABSTRACT

The growing concern about the conservation and valuation of the Amazonian forest species, together with the discovery of new substances from these species, has become increasingly active. The group "Plants of the Amazon: Chemistry, Chemistry and Biological Activity" (INPA) develops phytochemical investigations from wood residues. In this study the species *Cedrela odorata* L. (Meliaceae) was evaluated. The material, from demolition, was made available by the INCT Madeiras da Amazônia project through the LTM, after previous identification and used in chemical research and evaluation of antifungal activity. After the chromatographic fractionations and analysis by Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy, the work with the hexane extract resulted in the isolation of sesquiterpene cadalene (1); (2), α and β -amirenone (3 and 4) and butyrospermol acetate (5); of steroids β -sitosterol and stigmasterol (6 and 7), besides the isolation of the mexicanolida limonoide (8). Fractionation with methanolic extract led to the isolation of the gonadal limonide (9). When considering the high biological potential of the limonoids, the antifungal test with mexicanolide against the strains of *Cryptococcus neoformans* (VNI WM 148/08), *Cryptococcus gattii* (VGII WM 178/08) and *Candida albicans* (ATCC 13803) were carried out. The mexicanolida limonoide presented greater activity against the strains of *C. neoformans* (MIC 160 μ g / ml) through the broth microdilution technique.

Keywords: Demolition logging waste, mexicanolide, limonoids, cadalene.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Principais produtores de toras de Madeira tropical
- Figura 2.** Distribuição geográfica da Família Meliaceae
- Figura 3.** a) madeira de demolição de *C. odorata*; b) obtenção de corpo-de-prova
- Figura 4.** a) resíduos de *C. odorata* moídos, b) maceração em frasco tipo mariote.
- Figura 5.** Estrutura do cadaleno (1,6-dimethyl-4-isopropyl-naphthalene)
- Figura 6.** Espectro de RMN ^1H de COH-2 (300 MHz, CDCl_3)
- Figura 7.** Expansão dos sinais de RMN de ^1H de **COH-2** nas regiões de 8,1 a 6,9 ppm
- Figura 8.** Expansão dos sinais de RMN de ^1H de **COH-2** nas regiões de 4,0 a 1,3 ppm
- Figura 9.** Expansão dos sinais de RMN de ^1H de **COH-2** nas regiões de 4,0 a 2,4 ppm
- Figura 10.** Mapa de contorno de COSY de **COH-2** (300 MHz, CDCl_3)
- Figura 11.** Espectro de RMN de ^{13}C de **COH-2** (75 MHz, CDCl_3)
- Figura 12.** Espectro de dept-135 de ^{13}C de **COH-2** (75 MHz, CDCl_3)
- Figura 13.** Mapa de contorno HSQC de **COH-2** (300/75 MHz, CDCl_3)
- Figura 14.** Mapa de contorno HMBC de **COH-2** (300/75 MHz, CDCl_3)
- Figura 15.** CCD de COH-3.6.3.3 eluída em hexano:AcOEt (7:3)
- Figura 16.** Espectro de Massas de Alta Resolução de COH-3.6.3.3 (ESI, modo positivo)
- Figura 17.** Espectro de Massas de Alta Resolução de COH-3.6.3.3
- Figura 18.** Espectro de RMN ^1H de **COH-3.6.3.3** (300 MHz)
- Figura 20.** Expansão do RMN de ^1H de COH-3.6.3.3 nas regiões de 2,9 a 0,0 ppm
- Figura 21.** Espectro de RMN ^{13}C de **COH-3.6.3.3** (75 MHz)
- Figura 22.** Espectro de DEPT-135 de **COH-3.6.3.3** (75 MHz).
- Figura 23.** Mapa de contorno HSQC de **COH-3.6.3.3** (300/75 MHz).
- Figura 24.** Mapa de contorno HMBC de **COH-3.6.3.3** (300/75 MHz).
- Figura 25.** Espectro de RMN ^1H de COH-6 (300 MHz, CDCl_3)
- Figura 26.** Expansão dos sinais de RMN de ^1H de **COH-6** nas regiões de 5,40 a 4,90 ppm
- Figura 27.** Estrutura Química da fração **COH-7** (mexicanólida)
- Figura 28.** Espectrometria de Massas de Alta Resolução de **COH-7** (mexicanólida)

Figura 29. Espectro de RMN ^1H de COH-7 (300 MHz, CDCl_3)

Figura 30. Expansão dos sinais de RMN de ^1H de COH-7 nas regiões de 7,80 a 5,10 ppm

Figura 31. Expansão dos sinais de RMN de ^1H de COH-7 nas regiões de 4,00 a 0,10 ppm

Figura 32. Espectro de RMN ^{13}C de COH-7 (75 MHz, CDCl_3)

Figura 33. Expansão dos sinais de RMN de ^1H de COH-7 nas regiões de 7,80 a 5,10 ppm

Figura 34. Mapa de contorno HSQC de COH-7 (300/75 MHz, CDCl_3)

Figura 35. Mapa de contorno HMBC de COH-7 (300/75 MHz, CDCl_3)

Figura 36 – Proposta da biossíntese do mexicanolída

Figura 37 – Proposta de correlações do HMBC do H-15 e H-17

Figura 38 – Estrutura Química da fração COM-16.H.4.6 (gedunina)

Figura 39 – Espectrometria de Massas de Alta Resolução de COM-16.H.4.6

Figura 40. Espectro de RMN ^1H de COM-16.H.4.6 (300 MHz, CDCl_3)

Figura 41. Expansão dos sinais de ^1H de COM-16.H.4.6, regiões de 7,70 a 5,10 ppm

Figura 42. Expansão dos sinais de RMN ^1H de COM-16.H.4.6, regiões de 3,75 a 3,45 ppm

Figura 43. Expansão dos sinais de RMN ^1H de COM-16.H.4.6, regiões de 2,50 a 0,80 ppm

Figura 44 – COSY de COM-16.H.4.6 (75 MHz, CDCl_3)

Figura 45. Espectro de RMN ^{13}C de COM-16.H.4.6 (75 MHz, CDCl_3)

Figura 46. DEPT 135 de COM-16.H.4.6 (75 MHz, CDCl_3)

Figura 47. Mapa de contorno HSQC de COM-16.H.4.6 (300/75 MHz, CDCl_3)

Figura 48. Mapa de contorno HMBC de COM-16.H.4.6 (300/75 MHz, CDCl_3)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Limonóides na madeira de *C. odorata*

Tabela 2: Triterpenos na madeira de *C. odorata*

Tabela 3: Esteroides na madeira de *C. odorata*

Tabela 4. Rendimentos dos extratos brutos de *C. odorata*, após maceração

Tabela 5. Reunião de frações, com respectivos códigos massas.

Tabela 6. Reunião de frações COH-3, com respectivos códigos massas.

Tabela 7. Reunião de frações COH-3.6., com respectivos códigos massas.

Tabela 8. Reunião de frações COH-3.6.3, com respectivos códigos massas.

Tabela 9. Reunião de frações COM, com respectivos códigos massas.

Tabela 10. Reunião de frações COM-16.H.4, com respectivos códigos massas.

Tabela 11. Cepas utilizadas

Tabela 12. Dados de RMN de COH-2 (Substância 1) em CDCl_3

Tabela 13. Dados de RMN ^1H de COH-3.6.3.3 (Substâncias 2, 3, 4 e 5) em CDCl_3

Tabela 14. Dados de RMN ^{13}C de COH-3.6.3.3 (Substâncias 2, 3, 4 e 5) em CDCl_3

Tabela 15. Dados dos hidrogênios olefínicos e carbinólicos da fração **COH-6**

Tabela 16. Dados dos RMN de ^1H e ^{13}C da fração COH-7

Tabela 17. Dados dos RMN de ^1H e ^{13}C da fração COM-16.H.4.6

Tabela 18. Resultados da CIM das substâncias sobre as cepas de fungos

LISTA DE QUADROS

Quadro 01. Estrutura dos Limonoides na madeira de *C. odorata*

Quadro 2. Estrutura dos triterpenos na madeira de *C. odorata*

Quadro 3. Estrutura dos Esteroides na madeira de *C. odorata*

Quadro 4. Outras substâncias identificadas a partir da madeira de *C. odorata*

Quadro 5. Estruturas químicas das substâncias **2, 3, 4 e 5** identificadas na mistura

Quadro 6. Mistura de esteroides **6 e 7** na fração **COH-6**

LISTA DE LISTAS

Lista 1. Gêneros da família Meliaceae, reconhecidos pelo APG

Lista 2. Sinonímia na espécie *C. odorata*

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 01. Obtenção dos extratos hexânico e metanólico

Esquema 02. Fracionamento cromatográfico de COH

Esquema 03. Fracionamento cromatográfico de COH-3, COH-3.6 e COH-3.6.3

Esquema 04. Fracionamento cromatográfico de COM, COM-16, COM-16a, COM-16b

Esquema 05. Fracionamentos cromatográficos de COM-16.H, COM-16.H.4, COM-16.H.4.6

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

¹H – Hidrogênio

¹³C – Carbono 13

A - Acetato de etila

APG – *Angiosperm Phylogeny Group*

C – Cromatografia em Coluna

CCD – Cromatografia em Camada Delgada

CDCl₃ – Clorofórmio deuterado

COH – *Cedrela odorata* Hexânico

COM – *Cedrela odorata* Metanólico

COSY - homonuclear COrrrelation SpectroscopY.

D - Diclorometano

d - Dupleto

dd – Duplo Dupleto

ddd – Duplo Duplo Dupleto

EH – Extrato Hexânico

EM – Extrato Metanólico

H – Hexano

HMBC - *Heteronuclear MultipleBond Coherence*

HPLC - *High Performance Liquid Chromatography*

HSQC - *Heteronuclear Single Quantum Coherence*

INCT - Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia

J – Constante de acoplamento

LC – *Liquid Chromatography*

LQPN – Laboratório de Química de Produtos Naturais

LTM – Laboratório de Tecnologia da Madeira

M - Metanol

MeOD – Metanol deuterado

mult. – Multiplicidade

NP-PEG – Difenilboriloxietilamina- Polietilenoglicol

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

s – Sínpleto

t – Triplete

δ – Deslocamento químico

\emptyset – Diâmetro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. OBJETIVOS.....	22
2.1 GERAL.....	22
2.2 ESPECÍFICOS	22
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	23
3.1. CONSTITUINTES QUÍMICOS DA MADEIRA	23
3.2 CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS.....	24
3.2.1 A FAMÍLIA MELIACEAE	24
3.2.1.1 CEDRELA ODORATA L.	27
4. EXPERIMENTAL.....	37
4.1 EQUIPAMENTOS.....	37
4.2 MATERIAIS UTILIZADOS.....	38
4.3 IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL.....	39
4.4 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS	40
4.5 AVALIAÇÃO POR CCD DO PERFIL QUÍMICO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES.....	41
4.6 FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DOS EXTRATOS E ISOLAMENTO DE SUBSTÂNCIAS	41
4.6.1. FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DO EXTRATO HEXÂNICO (COH).....	41
4.6.2. FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DO EXTRATO METANÓLICO (COM)	45
4.7 ENSAIO ANTIFÚNGICO	48
4.7.1 CEPAS DOS INÓCULOS FÚNGICOS	48
4.7.2. TESTE DE MICRODILUIÇÃO.....	48
5. RESULTADO E DISCUSSÃO.....	49
5.1. SUBSTÂNCIAS ENCONTRADAS	49
5.2. DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS DO EXTRATO HEXÂNICO...	49
5.2.1. IDENTIFICAÇÃO DE COH-2 (SUBSTÂNCIA 1)	49
5.2.2. IDENTIFICAÇÃO DE COH-3.6.3.3 (SUBSTÂNCIAS 2, 3, 4 E 5).....	56
5.2.3. IDENTIFICAÇÃO DE COH-6 (SUBSTÂNCIAS EM MISTURA 6 E 7)	64
5.2.4. IDENTIFICAÇÃO COH-7, COM-16A.6 E COM-16B.1 (SUBSTÂNCIA 8).....	67
5.2.5. IDENTIFICAÇÃO COM-16.H.4.6 (SUBSTÂNCIAS 9).....	74
5. 3. ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DA SUBSTANCIA 8 (MEXICANOLÍDA)	82
6. CONCLUSÕES	83
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85

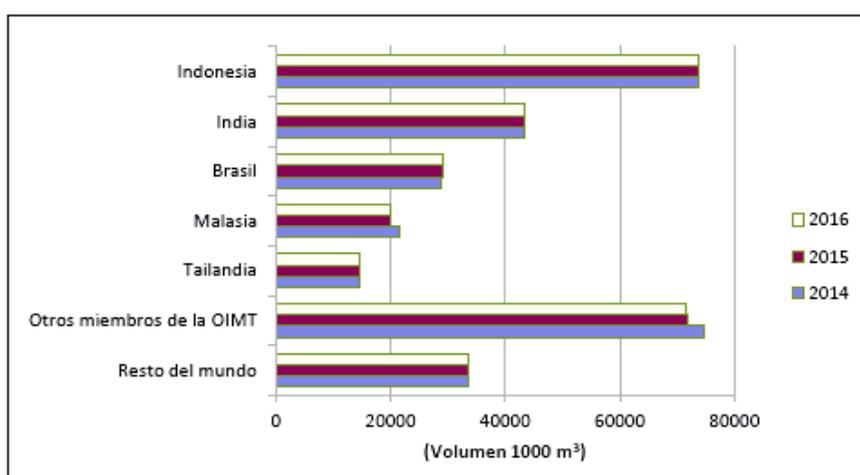
1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui a maior biodiversidade do planeta, pois é detentor de mais de 20% de todas as espécies da fauna e flora existente na Terra. Entre os 17 países megadiversos, é considerado o principal (MMA, 2018). Possui cerca 8,5 milhões de km², o que equivale à aproximadamente 50% da América do Sul e, é o local onde se encontra grande parte da maior floresta tropical úmida do mundo (MMA, 2018), sendo uma das principais produtoras de madeira tropical no planeta, perdendo apenas para Indonésia e Índia, em volume de produção (figura 1) (OIMT/ ITTO, 2016; VERISSÍMO e PEREIRA, 2014; SANTOS et. al., 2013; VERISSÍMO, 2006).

Em 2001 havia registro de aproximadamente 3000 espécies florestais identificadas na região da Amazônia legal com potencial de extração madeireira (BARBOSA et. al., 2001), porém, apenas algumas delas eram extraídas para fins comerciais e devido à isso certas espécies foram e estão sendo extintas por meio de sua exploração concentrada e desordenada (CARDOSO et. al., 2012; BARBOSA et. al., 2001).

Atualmente a produção brasileira de madeiras tropicais se concentra principalmente no do sul do Pará, Amazonas e Mato Grosso, enquanto as plantações estão localizadas nas regiões não tropicais do sul e sudeste do país. A produção aumentou ligeiramente para 29,2 milhões de m³ em 2015 e 2016 (figura 1), embora a produção em geral tenha registado uma tendência descendente nos últimos anos. A indústria madeireira no Amazonas têm sofrido redução na disponibilidade de madeira em toras, e isso ocasionou o fechamento de muitos operadores do setor (OIMT/ ITTO, 2016).

Segundo Santos et. al., (2013) foi observada uma forte redução na produção de madeira nativa entre os anos 1998 á 2010 de 28,3 para 11,6 milhões de m³. Para Veríssimo e Pereira (2014), essa queda expressiva na atividade do setor madeireiro foi associada a três fatores: a substituição da madeira nativa por madeira plantada; a utilização de materiais como alumínio e plástico usados na construção civil, fabricação de móveis entre outros e; pelo acirramento da fiscalização ambiental contra as madeireiras ilegais.



Fonte: Reseña Biental 2015-2016. OIMT (ITTO), 2016.

Figura 1: Principais produtores de toras de Madeira tropical

Com base nesses dados pode-se afirmar que houve uma alta produtividade de resíduos madeireiros, e isso estimulou a busca por novas formas de aproveitamento sustentável desses resíduos. Porém isso só é possível por meio do conhecimento geral dos aspectos tecnológicos, físicos e químicos da madeira de cada espécie para então, com base nisto, explorar os recursos florestais de forma mais adequada, e possibilitar um gerenciamento mais adequado desses rejeitos (CERQUEIRA et. al., 2012).

Nascimento & Colaboradores (2012), propõe como uma das alternativas para o aproveitamento de resíduos madeireiros no Amazonas, a produção de Pequenos Objetos de Madeira (POM), por proporcionar diversos benefícios que incluem o

incentivo à cultura tradicional, geração de renda além da inserção e capacitação de alunos da rede pública de ensino, nestas atividades. E em outros estados brasileiros têm surgido propostas de aproveitamento de resíduos como exemplificado pelos trabalhos de Abreu et. al., (2009) e Cerqueira et. al., (2012), que consideram a produção de POM's uma alternativa favorável para minimizar os impactos ambientais ocasionados pelo acúmulo indevido desses resíduos no meio ambiente, além de difundir e valorizar o trabalho artesanal.

Outra forma de aproveitamento dos resíduos madeireiros vem sendo difundida no Amazonas pelo grupo de pesquisa "Plantas da Amazônia: Química, Quimiosistemática e Atividade Biológica", que têm realizado diversos estudos fitoquímicos em busca do conhecimento de químico e/ou potencial biológico, a exemplo, Hayasida e cols. (2008), investigaram os resíduos madeireiros do cerne de pau-rainha (*Brosimum rubescens* Taubert, Moraceae), evidenciando um alto teor extrativo (19,87%), além de constatarem a presença de xantilentina, uma cumarina com atividade antiplaquetária (TENG et. al., 1992), herbicida (ANAYA et. al., 2005), dentre outras.

Horta e cols. (2010), investigaram os resíduos madeireiros de *Guarea trichilioides* (Meliaceae) constatando a presença do piceatanol, um tetrahidroxiestilbeno com propriedade antioxidante e antileucêmica. O grupo do LQPN em parceria com o Instituto Nacional Ciência e Tecnologia Madeiras da Amazônia, vem realizando investigações fitoquímicas a partir de resíduos madeireiros de demolição, como é caso do cedro-rosa (*Cedrela odorata* L.), o qual foi objeto dessa pesquisa.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

✓ Realizar investigação fitoquímica e busca de atividade antifúngica em resíduos madeireiros de demolição de *Cedrela odorata* L.

2.2 Específicos

✓ Purificar, Identificar e/ou elucidar as estruturas das substâncias encontradas nos extratos, através das técnicas de Cromatografia Clássica, Ressonância Nuclear Magnética e Espectrometria de Massas;

✓ Comparar as substâncias presentes neste resíduo madeireiro de demolição com outras encontradas em estudos anteriores realizados na madeira desta espécie.

✓ Realizar a busca por atividade antifúngica, através da técnica de Microdiluição em Caldo.

✓ Contribuir para o conhecimento químico dos resíduos madeireiros de demolição espécies amazônicas.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Constituintes químicos da Madeira

Os constituintes químicos contidos na madeira relacionam-se com suas propriedades e são importantes para definir a forma mais adequada de uso, bem como sua caracterização tecnológica e proteção contra xilófagos. Sua composição química pode ser dividida em metabólitos primários e secundários (SEVERO *et. al.*, 2006; KLOCK *et. al.*, 2005).

Metabólitos primários possuem um alto grau de polimerização como a celulose, a hemicelulose (ou poliose) e a lignina, que são responsáveis pela morfologia e estrutura das plantas (SILVA, 2002). A celulose é o principal componente da parede celular dos vegetais e tem característica de polímero linear de alto peso molecular, constituído exclusivamente de β -D-glucose. Já as hemiceluloses são formadas basicamente por hexoses e pentoses, algumas possuem ácido urônico, com cadeias mais curtas que as celulosas podendo apresentar ramificações. As ligninas são constituídas por sistemas aromáticos de unidades de fenilpropano, que ajudam a fortalecer e enrijecer a parede celular (KLOCK *et. al.*, 2005).

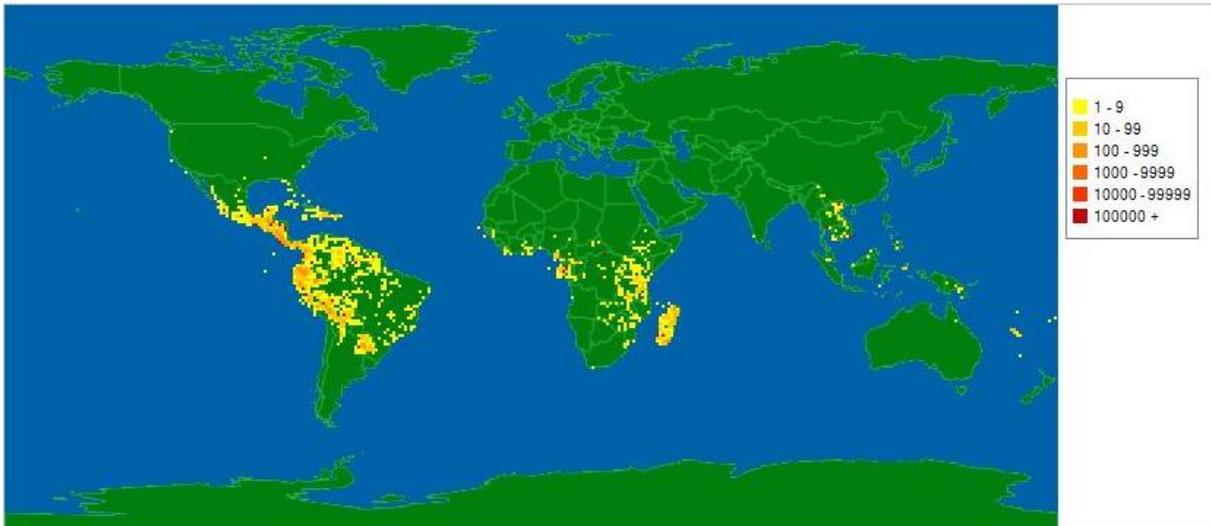
Entendem-se como metabólitos secundários aqueles que participam das interações de defesa entre as células das plantas e agentes externos como ataques por pestes e doenças, garantindo a sua sobrevivência (BRAZ-FILHO, 2010). A grande variedade desses metabólitos, mesmo estando em pequena quantidade, confere aos seus extratos: cor, odor entre outras propriedades e, podem sofrer alterações causadas por enzimas, produtos químicos e radiações eletromagnéticas (KLOCK *et. al.*, 2005; FEIST e HON, 1984).

Os estudos químicos de madeiras estão, em grande parte, concentrados nos metabólitos primários, os quais são importantes para a sua caracterização tecnológica. Entretanto, os estudos dos metabólitos secundários ainda são escassos e os que existem se relacionam principalmente com as suas funções ecológicas, mas, podem representar uma fonte imensurável de substâncias farmacologicamente ativas (MELO, 2016). Os estudos dos metabólitos secundários encontrados em diversas madeiras agregam valor às mesmas e auxiliam na busca de novas aplicações para os seus rejeitos, além de proporcionar conhecimento sobre o seu perfil químico (GRANATO *et. al.*, 2005). Neste cenário de aproveitamento de resíduos madeireiros, surge a oportunidade de investigar uma espécie do gênero *Cedrela* (Meliaceae) que apresenta alguns metabólitos secundários reportados na literatura como triterpenos, limonóides, esteróides, entre outros, os quais podem, também, ser obtidos através do aproveitamento dos seus resíduos madeireiros.

3.2 Considerações botânicas

3.2.1 A família Meliaceae

A família Meliaceae pertence à ordem Sapindales (= Rutales), compreendendo 50 gêneros (Lista 1) e 705 espécies, divididos em duas subfamílias: A **Melioideae**, possuindo 36 gêneros e 585 espécies, sendo que mais da metade das espécies pertencem a apenas 6 gêneros: *Aglaia* (120 espécies), *Dysoxylum* (80), *Guarea* (75), *Trichilia* (70), *Turraea* (60) e *Chisocheton* (50); A **Cedreloideae**, possuindo 14 gêneros e 56 espécies, cujo gênero mais representativo é o *Cedrela* com 14 espécies cuja distribuição é feita por toda a região Pantropical (Figura 2) (APG, 2018).



Fonte: <http://www.tropicos.org/>

Figura 2. Distribuição geográfica da Família Meliaceae

Lista 1. Gêneros da família Meliaceae, reconhecidos pelo APG

<i>Aglaia</i> Loureiro	<i>Melia</i> L.
<i>Anthocarapa</i> Pierre	<i>Munronia</i> Wight
<i>Aphanamixis</i> Blume	<i>Naregamia</i> Wight & Arnott
<i>Astrotrichilia</i> (Harms) Pennington	<i>Neobeguea</i> J.-F. Leroy
<i>Azadirachta</i> A. Jussieu	<i>Nymania</i> Lindb.
<i>Cabralea</i> A. Jussieu	<i>Owenia</i> F. Mueller
<i>Calodecaryia</i> J.-F. Leroy	<i>Pseudocedrela</i> Harms
<i>Capuronianthus</i> J.-F. Leroy	<i>Pseudoclausena</i> T. Clark
<i>Carapa</i> Aublet	<i>Pterorhachis</i> Harms
<i>Cedrela</i> P. Browne	<i>Quivisianthe</i> Baillon
<i>Chisocheton</i> Blume	<i>Reinwardtiodendron</i> Koorders
<i>Chukrasia</i> A. Jussieu	<i>Ruagea</i> H. Karst.
<i>Cipadessa</i> Blume	<i>Sandoricum</i> Cavanilles
<i>Dysoxylum</i> Blume	<i>Schmardaea</i> H. Karsten
<i>Ekebergia</i> Sparrmann	<i>Soymida</i> A. Jussieu

<i>Entandrophragma</i> C. E. C. Fischer	<i>Sphaerosacme</i> Royle
<i>Guarea</i> F. Allemão	<i>Swietenia</i> Jacquin
<i>Heckeldora</i> Pierre	<i>Synoum</i> A. Jussieu
<i>Heynea</i> Roxburgh	<i>Toona</i> (Endlicher) M. Roemer
<i>Humbertioturraea</i> J.-F. Leroy	<i>Trichilia</i> P. Browne
<i>Khaya</i> A. Jussieu	<i>Turraea</i> L.
<i>Lansium</i> Corrêa	<i>Turraeanthus</i> Baillon
<i>Lepidotrichilia</i> (Harms) Pennington	<i>Vavaea</i> Bentham & J. D. Hooker
<i>Lovoa</i> Harms	<i>Walsura</i> Roxburgh
<i>Malleastrum</i> (Baillon) J.-F. Leroy	<i>Xylocarpus</i> J. Koenig

Fonte: APG, 2018.

Durante muito tempo, as madeiras de algumas espécies de meliáceas, especialmente dos gêneros *Cedrela* e *Swietenia*, passaram por um processo de elevada exploração em todo o mundo, sendo utilizada principalmente na construção civil, o que levou ao esgotamento de muitas de suas populações naturais em diversas regiões do planeta (O'NEILL et. al., 2001; LAURANCE, 1999; VERISSIMO et. al., 1998; KEAY, 1996). Além disso, foram bastantes empregadas na fabricação de móveis finos, bem como de outras maneiras (MABBERLEY et. al., 1995).

O metabolismo secundário da família Meliaceae é bastante conhecido na literatura pelos registros de diversas substâncias pertencentes às classes dos alcalóides, flavonóides, esteróides, cumarinas, terpenóides incluindo os limonóides, entre outros (BOGORNÍ e VENDRAMIM, 2005; MATOS et. al., 2009; LEITE et. al., 2010; OLIVEIRA et. al., 2011 e SOARES, 2014). Vários limonóides possuem atividades biológicas como antialimentar e repelentes de insetos (VALLADARES et.

al., 1999; ABDELGALEIL et. al., 2001; SIMMONDS et. al., 2001; MATOS et. al., 2009; LEITE et. al., 2010; SOARES, 2014), inseticida (SCHNEIDER et. al., 2000; GREGER et. al., 2001; MATOS et. al., 2009), fungicida (GOVINDACHARI et. al., 1999; ENGELMEIER et. al., 2000), bactericida (KUMAR e GOPAL, 1999, ABOUTATB et. al., 2000), antimalárica (MACKINNON et. al., 1997;) e tripanocida (LEITE et. al., 2009; LEITE et. al., 2010).

3.2.1.1 Cedrela odorata L.

A *C. odorata* L. é típica das regiões neotropicais, encontradas em florestas subtropicais e tropicais úmidas e estacionais, desde a costa do México, através da América Central e América do Sul, em terras baixas até altitudes serranas de 1200 m, com seu limite sul ao redor da Argentina. Pode ser encontrada naturalmente em solos bem drenados, tolera larga temporada de seca, mas não suporta áreas com precipitações superiores a 3000 mm anuais (PENNINGTON, et. al., 1981).

Na região das Américas a madeira dessa espécie é conhecida como "Spanish cedar" e teve alta demanda no mercado internacional de madeiras para uso em móveis de alto acabamento (KLEIN, 1984). No Brasil é mais conhecida como cedro, cuja madeira foi muito explorada devido ao alto valor comercial (BACKES & IRGANG, 2002). Outros nomes populares são cedro-rosa, cedro-vermelho, cedro-fêmea, cedro-cheiroso, cedro-branco, cedro-paraíso (KLEIN, 1984). É comumente encontrada na Amazônia, Cerrado, Caatinga e Mata Atlântica (STEFANO, et. al., 2011). Sua madeira é bastante utilizada na confecção de esculturas, instrumentos musicais, construção civil, carvão, carpintaria, marcenaria, chapas e compensados,

além de outras partes serem usadas para fabricação de óleos, artesanato e mesmo com fins medicinais (CARVALHO, 2003; ROWEDER, 2012).

A lista 2 mostra as sinonímias botânicas de *C. odorata* L., de acordo com o Missouri Botanical Garden (MOBOT, 2018).

Lista 2. Sinonímia na espécie *C. odorata*

Cedrela adenophylla Mart

Cedrela brachystachya (C. DC.) C. DC

Cedrela brownii Loefl.

Cedrela brownii Loefl. ex Kuntze

Cedrela caldasana C. DC.

Cedrela ciliolata S.F. Blake

Cedrela cubensis Bisse

Cedrela dugesii S. Watson

Cedrela glaziovii C. DC

Cedrela guianensis A. Juss

Cedrela hassleri (C. DC.) C. DC.

Cedrela huberi Ducke

Cedrela mexicana var. *puberula* C. DC.

Cedrela occidentalis C. DC. & Rose

Cedrela imparipinnata C. DC.

Cedrela longipes S.F. Blake

Cedrela longipetiolulata Harms

Cedrela mexicana M. Roem.

Cedrela mourae C. DC.

Cedrela odorata var. *xerogeiton* Rizzini & Heringer

Cedrela palustris Handro

Cedrela paraguariensis Mart.

Cedrela paraguariensis var. *brachystachya* C. DC.

Cedrela paraguariensis var. *hassleri* C. DC.

Cedrela paraguariensis var. *multijuga* C. DC.

Cedrela rotunda S.F. Blake

Cedrela sintenisii C. DC

Cedrela velloziana M. Roem.

Cedrela whitfordii S.F. Blake

Cedrela yucatanana S.F. Blake

Surenus brownii Kuntze

Surenus glaziovii (C. DC.) Kuntze

Surenus guianensis (A. Juss.) Kuntze

Surenus mexicana (M. Roem.) Kuntze

Surenus paraguariensis (Mart.) Kuntze

Surenus velloziana (M. Roem.) Kuntze

Em *C. odorata*, os estudos fitoquímicos têm sido realizados com diversas partes vegetativas, sendo os limonoides os metabólitos secundários predominantes em suas folhas, galhos, madeira e casca. Na madeira foram identificados limonoides com esqueletos dos tipos anel lactona D-modificado (**1 a 5**), esqueleto intacto (**6 a 9**), do tipo mexicanolídeo (**10 a 12**) e com anel B,D-modificado (**13**) (Tabela 1).

Ressalta-se a importância do potencial biológico e/ou farmacológico da gedunina (**1**) que é reportada como inseticida natural, principalmente para

Lepidoptera (CHAMPAGNE et. al., 1992; ARNASON, et. al., 1993; CÉSPEDES, et. al., 2002; OMAR, et. al., 2007), como antimalárico para *Plasmodium falciparum* (MACKINNON, et. al., 1997; LAKSHMI, et. al., 2012), antitumoral humano de câncer de pulmão em células NCI-H460 (CAZAL, et. al., 2010) e de ovário em células SKOV3 e OVCAR4 (KAMATH, et. al., 2009). Também foram observadas atividades, anti-úlceras pépticas (LAKSHMI, et. al., 2010) e antifilarial humana (*Brugia malayi*) em hospedeiros vertebrados (MISRA, et. al., 2011), para gedunina e fotogedunina (3). Já a 7-desacetilgedunina (5) e a 7-desacetil-7-oxogedunina (2) demonstraram atividade antiprotozoária *in vitro* para *Leishmania donovani*, *Trypanosoma brucei* rhodesiense, *T. cruzi* e *P. falciparum* (HAY, et. al., 2007).

Tabela 1: Limonóides na madeira de *C. odorata*

SUBSTÂNCIAS	REFERÊNCIA
gedunina (1)	Chan et. al., 1967; Burke et. al., 1969; Campos, et. al., 1991; *de Paula et. al., 1997; Mackinnon, et. al., 1997
7-desacetoxi-7-oxogedunina (2)	Bevan et. al., 1963; Chan et. al., 1967; *de Paula et. al., 1997
fotogedunina (3)	Burke et. al., 1969
1 α -metoxi-1,2-dihidrogedunina (4)	*de Paula et. al., 1997
7-desacetilgedunina(5)	
azadiradiona (6)	
20,21,22,23-tetrahidro-23-oxoazadirona (7)	
1 α -metoxi-1,2-dihidroepoxiazadiradiona (8)	
desoxicedrelona (9)	Campos, et. al., 1991
3 β -desacetilfissinólida (10)	*de Paula et. al., 1997
febrifugina (11)	

mexicanolida (12)

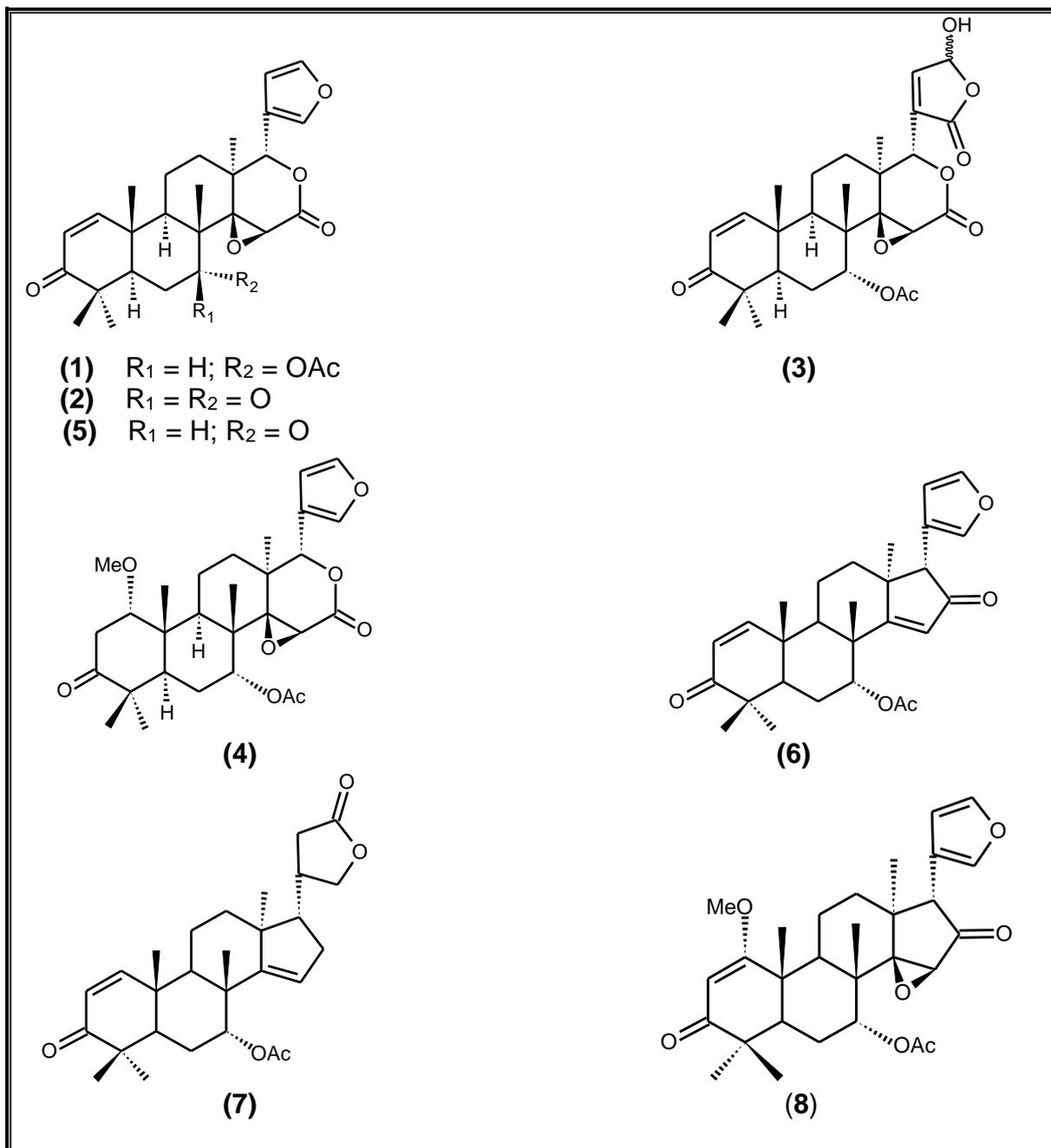
Bevan et. al., 1965

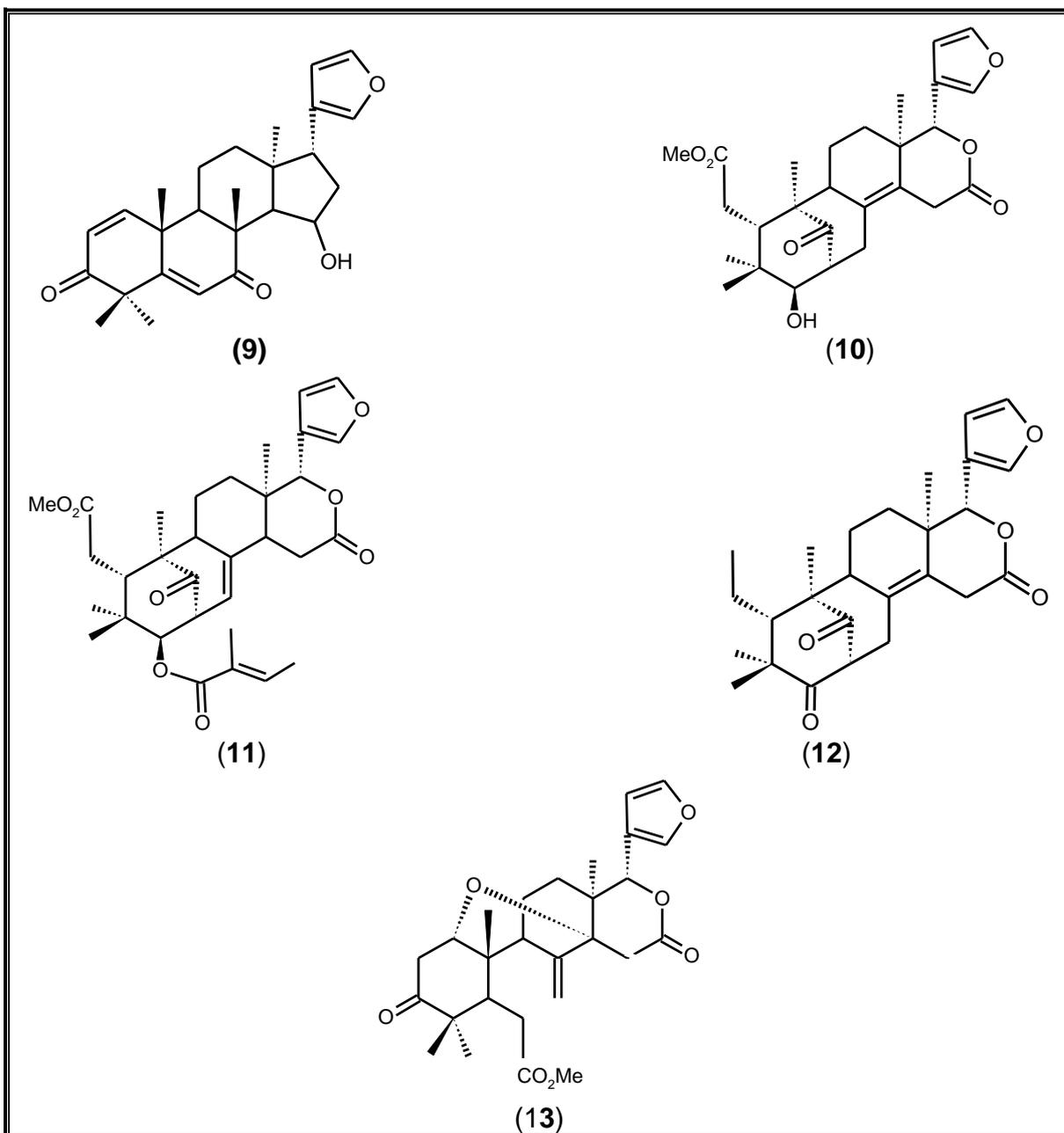
metil angolensado (13)

Chan et. al., 1967; *de Paula et. al., 1997

**Cedrela odorata* enxertada em *Toona ciliata* var. *australis*

Quadro 01. Estrutura dos Limonoides na madeira de *C. odorata*





Os triterpenos encontrados na madeira dessa espécie (tabela 2) são dos tipos oleanano, tirucalano e cicloartano sendo os dois últimos mais abundantes em Meliaceae. Nos estudos prévios com alguns triterpenos tirucalano, o odoratol, penteol e iso-odoratol demonstraram atividade tripanocida para a forma tripomastigota de *T.cruzi in vitro* (LEITE, et. al., 2008). O odoratol, também,

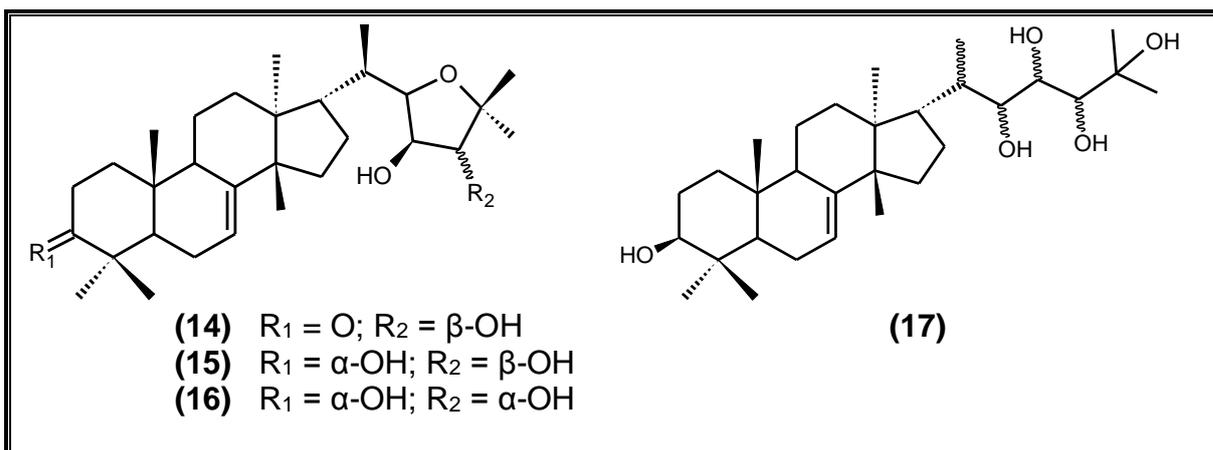
demonstrou atividade antitumoral humana de câncer de pulmão (NCI-H460) (CAZAL, et. al., 2010).

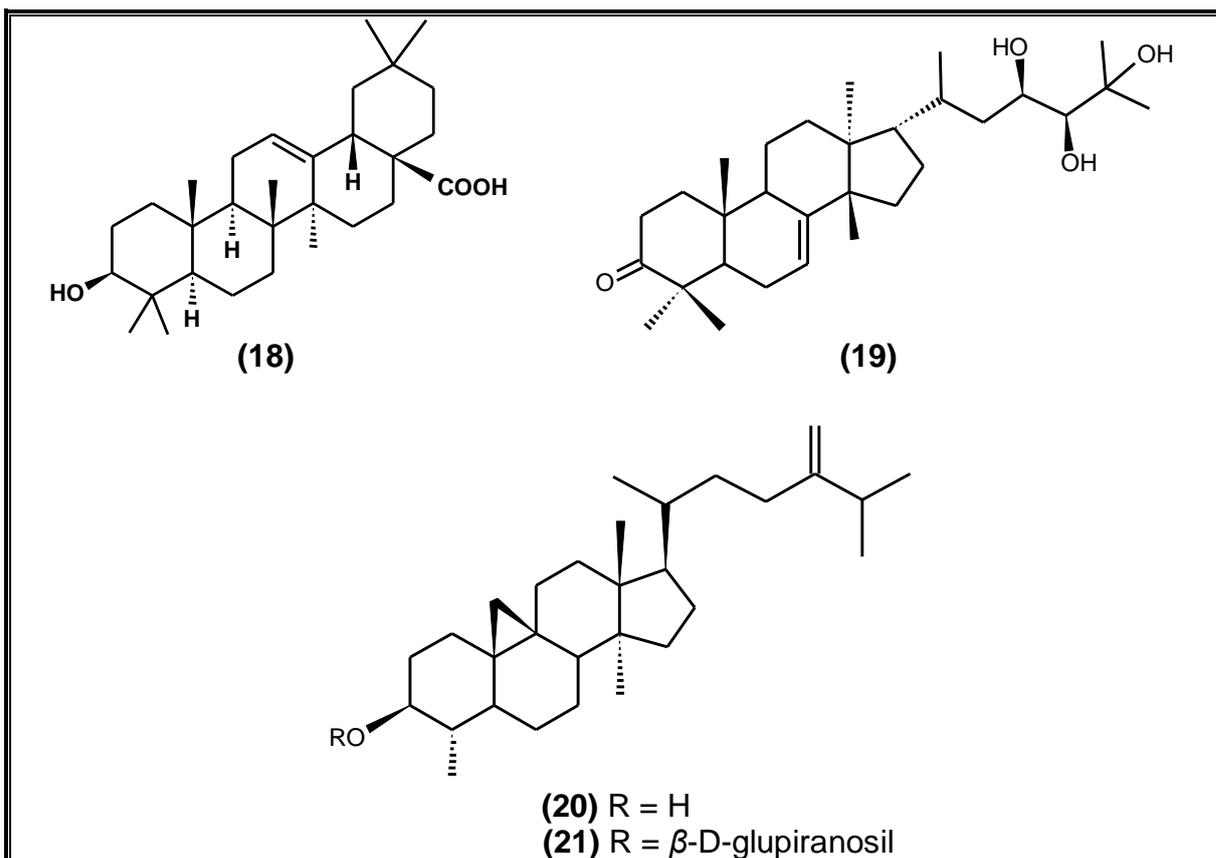
No triterpeno cicloartano cicloeucalenol observou-se, *in vitro*, atividades antibacteriana, antifúngica e citotóxica em células cancerígenas do fígado humano (HepG2) (KANDASAMY, et. al., 2015). O cicloeucalenol também mostrou atividade antioxidante multifuncional (KANDASAMY, et. al., 2014) e, ao ser misturado com o lupeol produziu atividade hipoglicêmica (RAGASA, et. al., 2015).

Tabela 2: Triterpenos na madeira de *C. odorata*

SUBSTÂNCIAS	REFERÊNCIA
odoratona (14)	Chan et. al., 1967; Campos, et. al., 1991
odoratol (15)	
iso-doratol (16)	Chan et. al., 1968; Campos, et. al., 1991
pentaol (17)	Campos, et. al., 1991
ácido oleanólico (18)	
3-oxo-treo-23,24,25-triidroxitirucall-7-ona (19)	Campos, et. al., 1991
cicloeucalenol (20)	*de Paula et. al., 1997
3 β -O- β -D-glucopiranosilcicloeucalenol (21)	

Quadro 2. Estrutura dos triterpenos na madeira de *C. odorata*



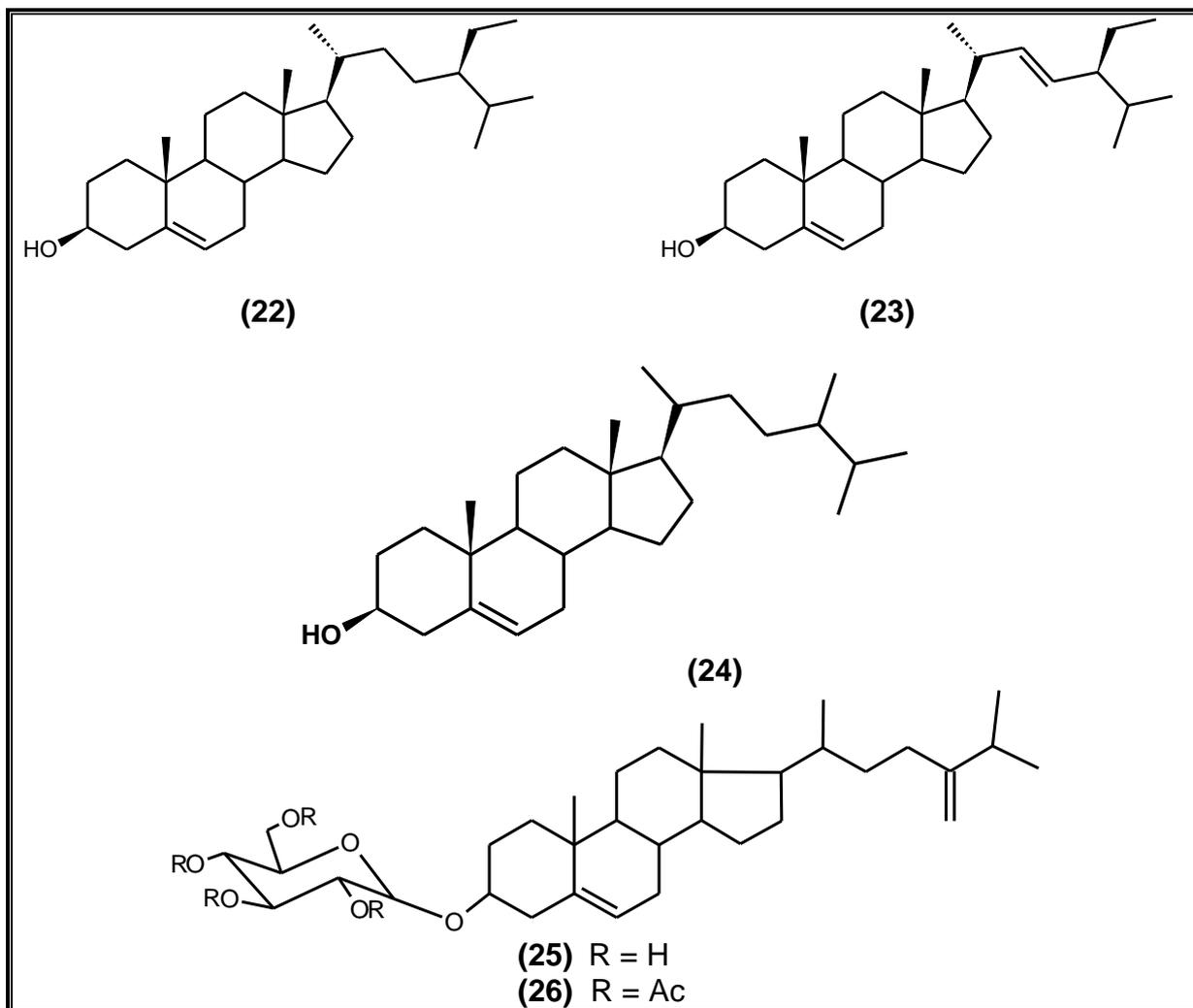


Os esteroides **22** à **24** (tabela 3) descritos para a madeira desta espécie são comumente encontrados no reino vegetal, porém os esteroides do tipo 24-metileno colesterol (**25** e **26**) são menos comuns (CAMPOS, et. al., 1991)

Tabela 3: Esteroides na madeira de *C. odorata*

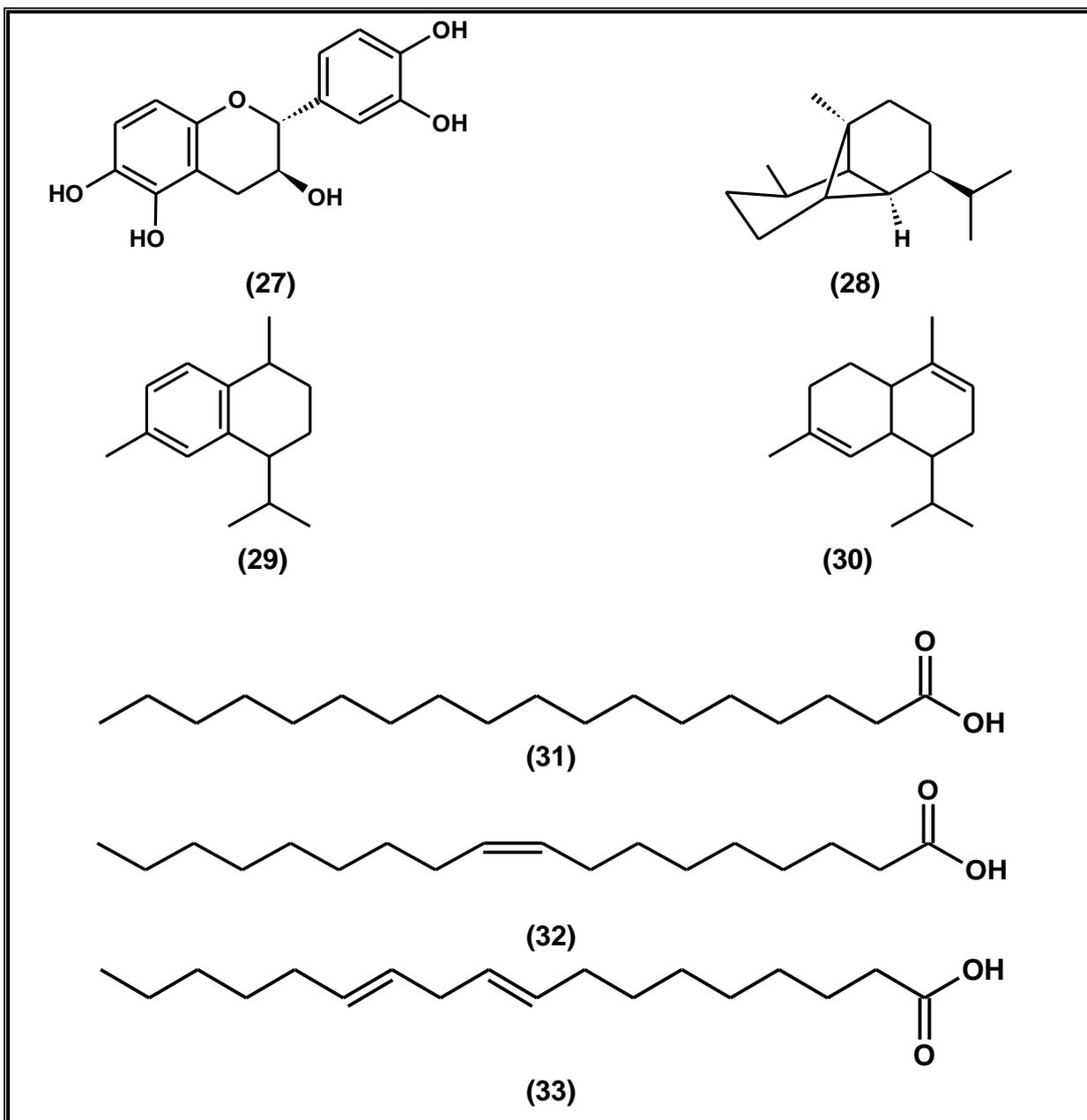
SUBSTÂNCIAS	REFERÊNCIA
β -sitosterol (22)	Campos, et. al., 1991; *de Paula et. al., 1997
stigmasterol (23)	*de Paula et. al., 1997
campesterol (24)	
3 β -O- β -D-glucopiranosil-24-metilenocolesterol (25)	Campos, et. al., 1991
3 β -O- β -D-tetra-O-acetilglucopiranosil-24-metilenocolesterol (26)	

Quadro 3. Estrutura dos Esteroides na madeira de *C. odorata*



Outra substância relatada em madeira de *C. odorata* é a flavana-3-ol conhecida como catequina (27) (*DE PAULA, et. al., 1997). Na avaliação dos constituintes voláteis do óleo essencial extraído da madeira foram identificados como os constituintes químicos predominantes os sesquiterpenos: α -copaeno (28), calameneno (29) e α -muuroleno (30). O extrato hexânico produziu a mistura de ácidos graxos no qual foram identificados os ácidos esteárico (31), oleico (32) e linoleico (33) (CAMPOS et. al., 1991).

Quadro 4. Outras substâncias identificadas a partir da madeira de *C. odorata*



Estudo realizado por González-Coloma et. al., (2012), confirma atividade leishmanicida e tripanocida nos extratos de *C. odorata* e indica que o mesmo pode vir a ser utilizado no tratamento das úlceras cutâneas causadas pelo parasito *L. Infantum*.

4. EXPERIMENTAL

Os experimentos de fitoquímica foram conduzidos nas instalações do Laboratório de Química de Produtos Naturais (LQPN) no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). A metodologia se baseou na obtenção dos resíduos madeireiros, oriundos de demolição de um prédio do INPA com cerca de quarenta e cinco anos de uso em estrutura de esquadria de janelas, estes resíduos estavam no Laboratório de Tecnologia da Madeira (LTM) do INPA para uso em estudos de propriedades tecnológicas da madeira, cujos resíduos menores foram cedidos para serem submetidos à processos de extração, purificação e identificação dos seus metabólitos secundários.

4.1 Equipamentos

Evaporador rotativo – Buchi, modelo Rotavapor R-3 acoplado a um banho ultratermostatizado Marconi, modelo MA-184

Balança Analítica – Tecnal, modelo MARK 210A

Ultrassom – Lavadora Ultrassônica ULTRONIQUE, modelo Q3-8/40

Chapa de aquecimento – Fisatom, modelo 753A.

Serra de fita – Serra de fita de bancada 1400mm 250w, modelo LYNUS-SFM-250

Moinho – Marconi, macro moinho tipo Wiley modelo MA-340

Lâmpada Ultra Violeta – SPECTROLINE®, modelo ENF-240C/FE

Destilador de solvente – Balão de Destilação Amitel 1200mL e Manta de Aquecimento Fisatom, modelo 1202.

Destilador de Água – QUIMIS®, tipo Pilsen, modelo 0341-25

Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear – Os espectros de RMN foram obtidos em espectrômetros da Bruker, modelos AVANCE III HD (500 MHz - ¹H e 125 MHz - ¹³C) do Departamento de Química da UFAM e Fourier-300 (300 MHz - ¹H e 75 MHz - ¹³C) da CA-LTQPN do INPA.

Espectrômetro de massas – Marca Bruker, modelo microTOF-Q II, analisador *time of flight*. Fonte ESI em modo positivo; Resolução de 17500 (FWHM); Utiliza o programa Compass, versão 4.1, para controle, aquisição e processamento de dados.

4.2 Materiais utilizados

Cromatografia em Camada Delgada (CCD) – Foram utilizadas cromatofolhas de alumínio com sílica gel 60, indicador de fluorescência F254 e 0,2 mm de espessura da Merck.

Reveladores para a CCD - Os reveladores empregados foram radiação ultravioleta (254 e 365 nm), vanilina sulfúrica e iodo ressublimado.

Cromatografia em Coluna (CC) – Foram utilizadas colunas de vidro de tamanhos variados, conforme a quantidade de amostra a ser fracionada.

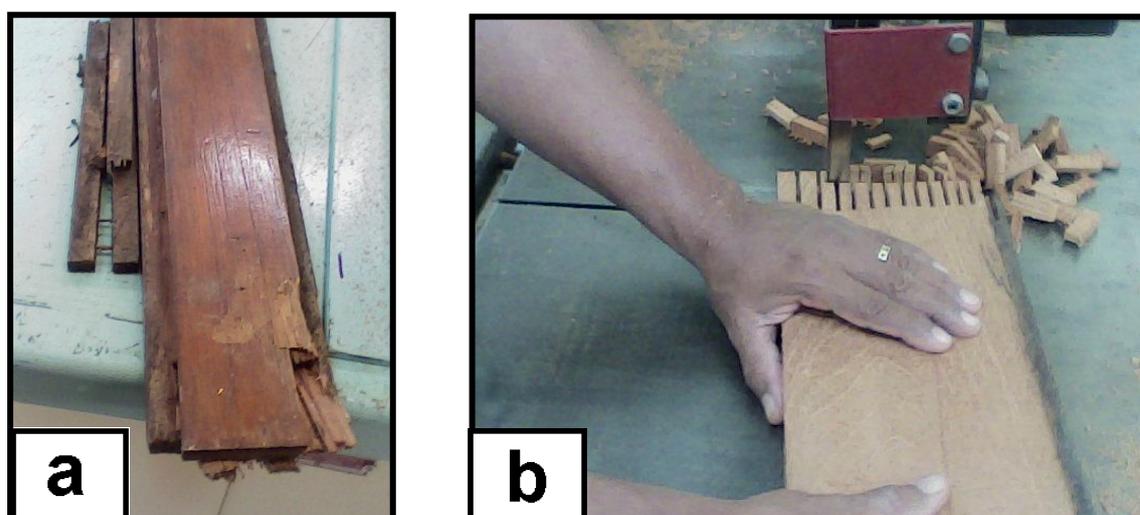
Suportes para Cromatografia em Coluna – As fases estacionárias utilizadas foram Sílica gel 60 (70-230 mesh e 230-400 mesh) - Merck; Sephadex LH-20 - Sigma-Aldrich e Celulose microcristalina - Merck.

Solventes – Nas análises cromatográficas foram utilizados solventes orgânicos comerciais (hexano, acetato de etila, diclorometano, acetona e metanol) destilados

no LQPN-INPA. Para a obtenção dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear utilizou-se solventes deuterados e para a análise de Espectrometria de Massas os solventes possuíam grau de pureza HPLC. no LQPN-INPA. Para a obtenção dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear utilizou-se solventes deuterados e para a análise de Espectrometria de Massas os solventes possuíam grau de pureza HPLC.

4.3 Identificação do material vegetal.

Os resíduos de madeira de demolição de cedro-rosa (*C. odorata*) (fig. 3.a), utilizados para obtenção dos extratos orgânicos foram previamente classificados e identificados através comparações macroscópicas com amostras padrões da espécie disponível na Xiloteca do LTM-INPA, a análise foi realizada pelo Anatomista de Madeira Jorge Alves de Freitas.

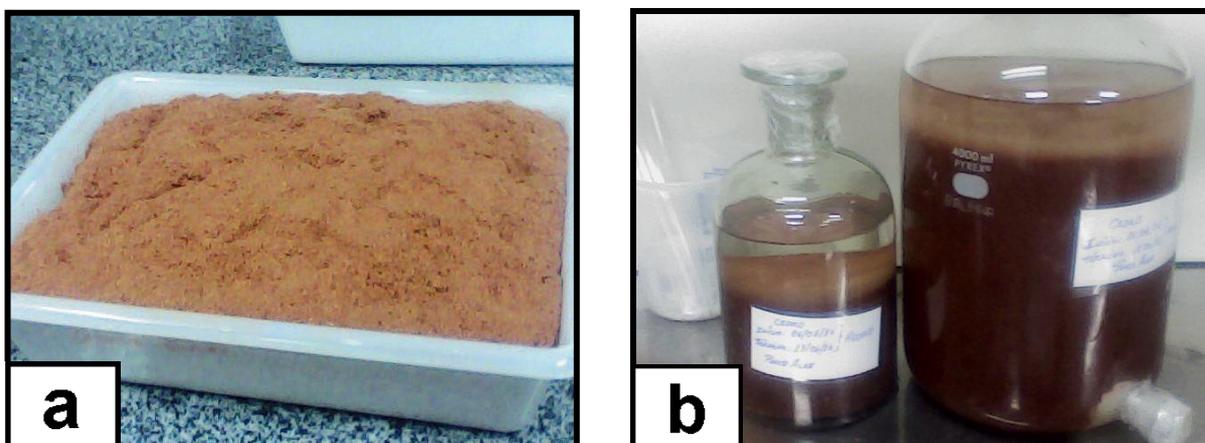


Fonte: Arquivo pessoal, 2016

Figura 3. a) madeira de demolição de *C. odorata*; b) obtenção de corpo-de-prova

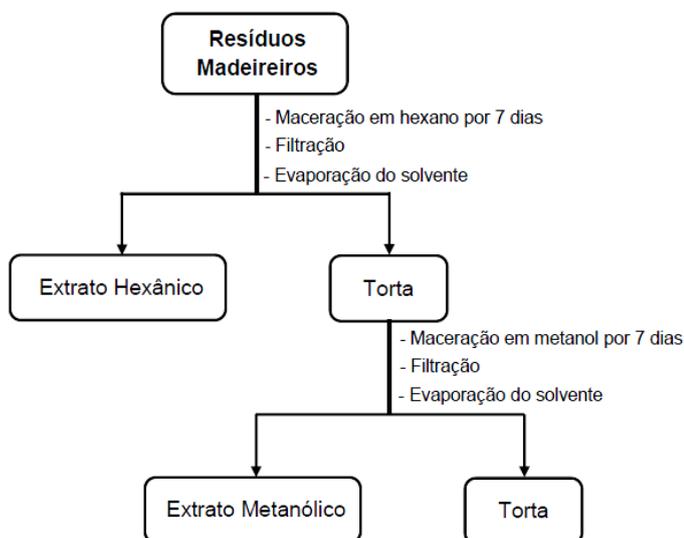
4.4 Preparação dos extratos

As amostras de resíduos madeireiros foram picotados em serra de fita (fig. 3.b) e posteriormente moídos (fig. 4.a) em moinho de facas, em seguida foi mensurada sua massa e submetido a uma extração a frio, em frasco do tipo Mariotte (fig. 4.b), primeiramente com hexano e depois com metanol, ambos por sete dias cada, dando origem aos extratos hexânico e metanólico, respectivamente, conforme o Esquema 1. Após a remoção do solvente por evaporação com pressão reduzida, foi possível calcular o teor de rendimento dos mesmos (tabela 04).



Fonte: Arquivo pessoal, 2016

Figura 4. a) resíduos de *C. odorata* moídos; b) maceração em frasco tipo Mariote.



Esquema 1. Obtenção dos extratos hexânico e metanólico

Tabela 4. Rendimentos dos extratos brutos de *C. odorata*, após maceração

Massa dos resíduos (g)	Extratos		Rendimentos (%)
	Código	Massa (g)	
680,00	COH	1,58	0,23
	COM	8,67	1,27

Legenda: **COH** (Extrato Hexânico); **COM** (Extrato Metanólico).

4.5 Avaliação por CCD do perfil químico dos extratos e frações

Realizou-se análises prévias dos constituintes dos extratos através da cromatografia de camada delgada comparativa (CCDC), após a análise, o extrato hexânico mostrou-se bastante promissor, dessa forma foi selecionado para iniciar a pesquisa.

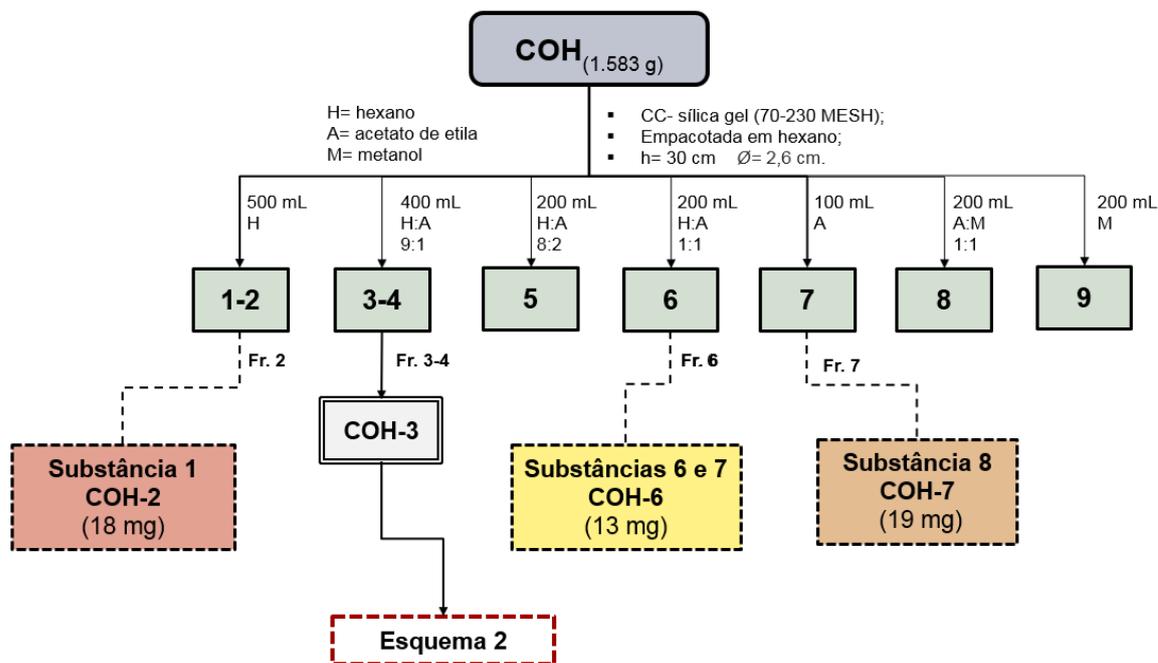
A visualização das fluorescências presentes nas frações obtidas nos fracionamentos cromatográficos foram realizadas através de luz ultravioleta (de comprimento de onda de 254 nm utilizando-se vanilina sulfúrica para revelação das manchas nos spots.

4.6 Fracionamento cromatográfico dos extratos e isolamento de substâncias

4.6.1. Fracionamento cromatográfico do extrato hexânico (COH)

O fracionamento cromatográfico inicial do extrato hexânico foi efetuado em coluna cromatográfica aberta utilizando sílica gel tipo filtrante (70-230 mesh) empacotada em hexano e empregando diferentes gradientes de polaridade dos solventes orgânicos partindo do Hexano, Hexano:AcOEt, AcOEt, AcOEt:MeOH,

MeOH, originando assim 9 frações (Esquema 02), cujas massas e códigos são apresentadas na tabela 5.



Esquema 02. Fracionamento cromatográfico de COH

Tabela 5. Reunião de frações, com respectivos códigos massas.

Frações reunidas	Códigos	Massa (mg)
1	COH-1	41,0
2	COH-2	72,0 COH-2
3-4	COH-3	438,8 Esquema 03
5	COH-5	235,0
6	COH-6	300,0 COH-6
7	COH-7	162,0 COH-7
8	COH-8	168,0
9	COH-9	22,0

As frações obtidas na coluna (esquema 02) foram analisadas por CCDC e submetidas a novos procedimentos de purificação das substâncias como descritas a seguir:

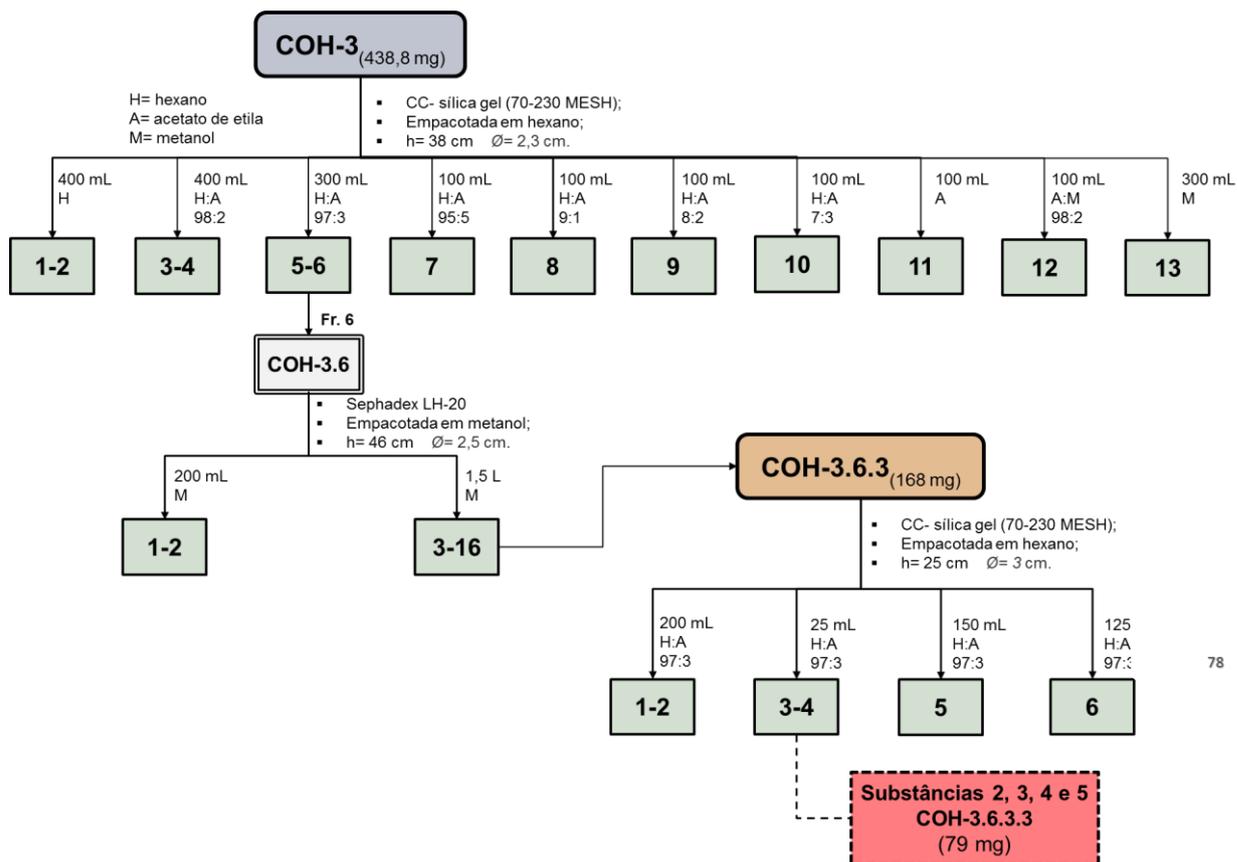
A **fração 2** foi tratada com metanol à frio, fornecendo a **Substância 1** codificada como **COH-2** (18 mg, esquema 02), possuindo aspecto de óleo com

aroma agradável. Ao ser submetida a análise de CCDC apresentou uma fluorescência azul claro na UV 365nm. Na revelação em vanilina sulfúrica, mostrou uma mancha de cor lilás. Para identificação da Substância 1 realizou-se análise de RMN ^1H , ^{13}C , DEPT 135, COSY, HSQC e HMBC.

As frações reunidas 3 e 4 denominada de **COH-3** (438 mg, esquema 02), foram submetidas a novos fracionamentos cromatográficos. Inicialmente em coluna de sílica gel (230-400 mesh), conforme esquema 3, fornecendo 13 subfrações (tabela 6). A subfração 6 (**COH-3.6**; 170 mg) foi novamente fracionada em sucessivas colunas de Sephadex LH-20 eluídas com metanol (tabelas 7 e 8, esquema 03) e forneceu as **Substâncias 2, 3, 4 e 5**, em mistura, codificadas como **COH-3.6.3.3** (sólido branco, 79 mg). Para identificação das substâncias em mistura a amostra foi analisada através dos experimentos de RMN ^1H , ^{13}C , DEPT 135, HSQC, HMBC e EM.

A **fração 6** (esquema 02), após ser tratado com MeOH à quente forneceu um sólido branco amorfo, que comparado em CCDC com uma amostra padrão de β -sitosterol, apresentou o mesmo Rf. Esse material forneceu as **Substâncias 6 e 7**, em mistura, e foi codificado como **COH-6** (18 mg) sendo analisado por meio de experimento de RMN ^1H .

A **fração 7** (esquema 02) formou um sólido branco cristalino, apresentando uma absorção em UV 365 nm, de cor azul claro. Quando revelado em vanilina sulfúrica mostrou uma mancha de cor lilás intensa, fornecendo a **Substância 8**, codificada como **COH-7** (162 mg) e analisada por RMN ^1H , ^{13}C , DEPT 135, HSQC e HMBC. Devido a elevada quantidade de massa optou-se por realizar a busca por atividade antifúngica para esta substância.



78

Esquema 03. Fracionamento cromatográfico de COH-3, COH-3.6 e COH-3.6.3

Tabela 6. Reunião de frações COH-3, com respectivos códigos massas.

Frações reunidas	Códigos	Massa (mg)
1-2	COH-3.1	2,3
3-5	COH-3.3	0,3
6	COH-3.6	170,2
7	COH-3.7	22,7
8-9	COH-3.8	41,0
10-11	COH-3.10	76,0
12-13	COH-3.12	74,5

Tabela 7. Reunião de frações COH-3.6., com respectivos códigos massas.

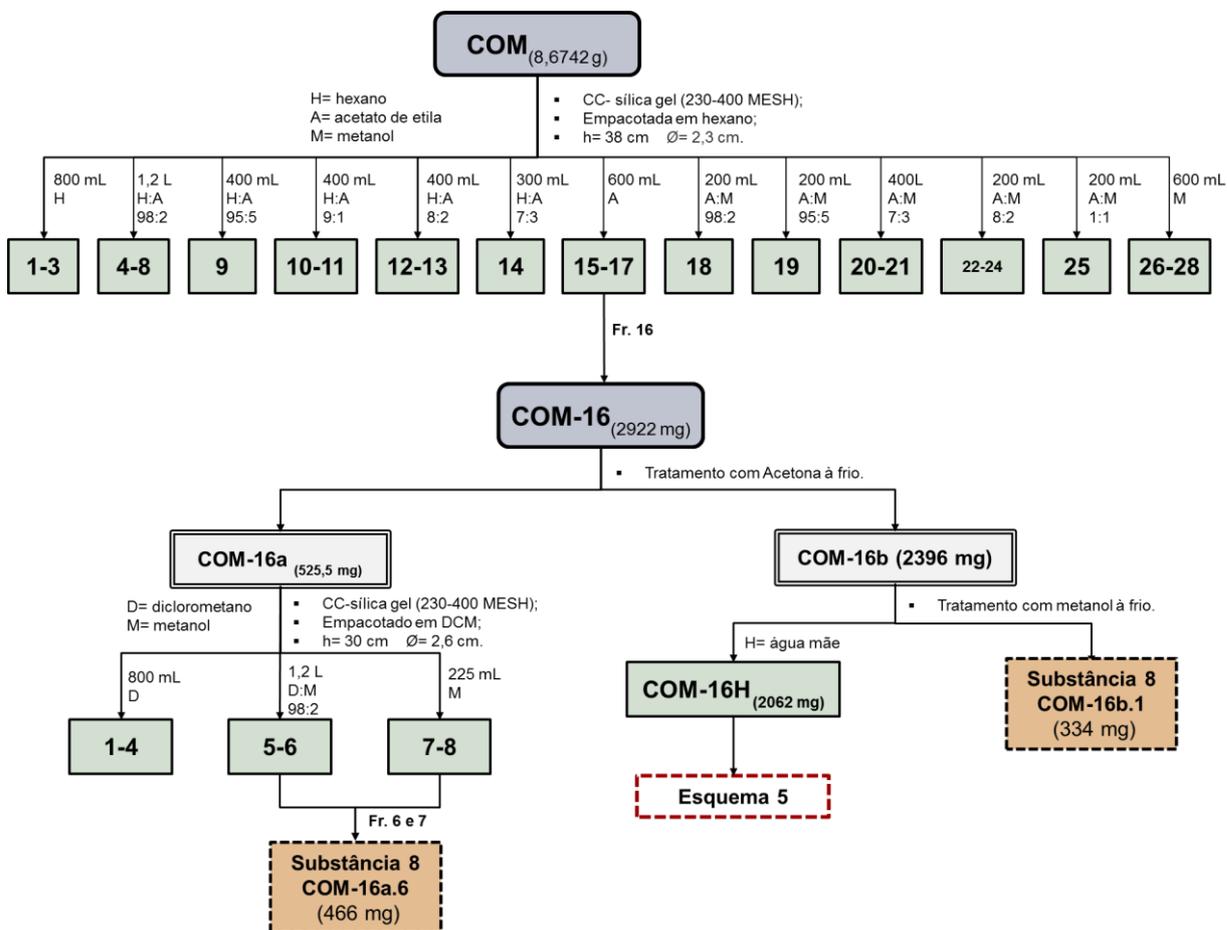
Frações reunidas	Códigos	Massa (mg)
1-2	COH-3.6.1	15,5
3-16	COH-3.6.3	153,8

Tabela 8. Reunião de frações COH-3.6.3, com respectivos códigos massas.

Frações reunidas	Códigos	Massa (mg)
1-2	COH-3.6.3.1	7,7
3-4	COH-3.6.3.3	79,0
5	COH-3.6.3.5	73,6
6	COH-3.6.3.6	31,0

4.6.2. Fracionamento cromatográfico do extrato metanólico (COM)

O fracionamento cromatográfico do extrato metanólico foi efetuado em coluna cromatográfica aberta utilizando sílica gel tipo filtrante (70-230 MESH) empacotada em hexano e empregando diferentes gradientes de polaridade dos solventes orgânicos partindo do Hexano 100%, Hexano:AcOEt, AcOEt 100%, AcOEt:MeOH, MeOH 100%, originando assim 28 frações (esquema 04).



Esquema 04. Fracionamento cromatográfico de COM, COM-16a, COM-16b.

A fração 16 (2922 mg) mostrou-se promissora, pois formou um sólido cristalino, o qual foi submetido a um tratamento com acetona a frio formando um precipitado branco codificado como **COM-16a** e um sobrenadante de aspecto caramelizado codificado como **COM-16b** (esquema 04). A fração **COM-16a** (525,5 mg) foi subfracionada em sílica gel eluída com DCM, DCM:MeOH e MeOH (esquema 04), gerando 8 subfrações. As subfrações 6 e 7 se mostraram puras em CCDC e após análise em RMN ¹H, e ambas forneceram a **Substância 8** (466 mg), que havia sido identificada previamente no extrato hexânico.

O sobrenadante (**COM-16b**), após evaporação do solvente, foi tratado em metanol formando um precipitado de cor branca o qual forneceu a mesma **Substância 8** (334 mg). Além disso formou-se um sobrenadante neste processo, que após a secagem, foi fracionada em coluna de Sephadex – LH-20 eluída em MeOH gerando 18 subfrações (esquema 05). A subfração 4 (1026 mg) foi fracionada em coluna de sílica gel eluída com DCM e DCM:MeOH e então a subfração mais promissora **COM.16H.4.6** (17.7 mg) formou um novo sólido, que tratado com MeOH à frio, forneceu a **Substância 9** (2,0 mg). Este material foi analisado através de RMN ¹H, ¹³C, DEPT 135, HSQC, HMBC e EM.

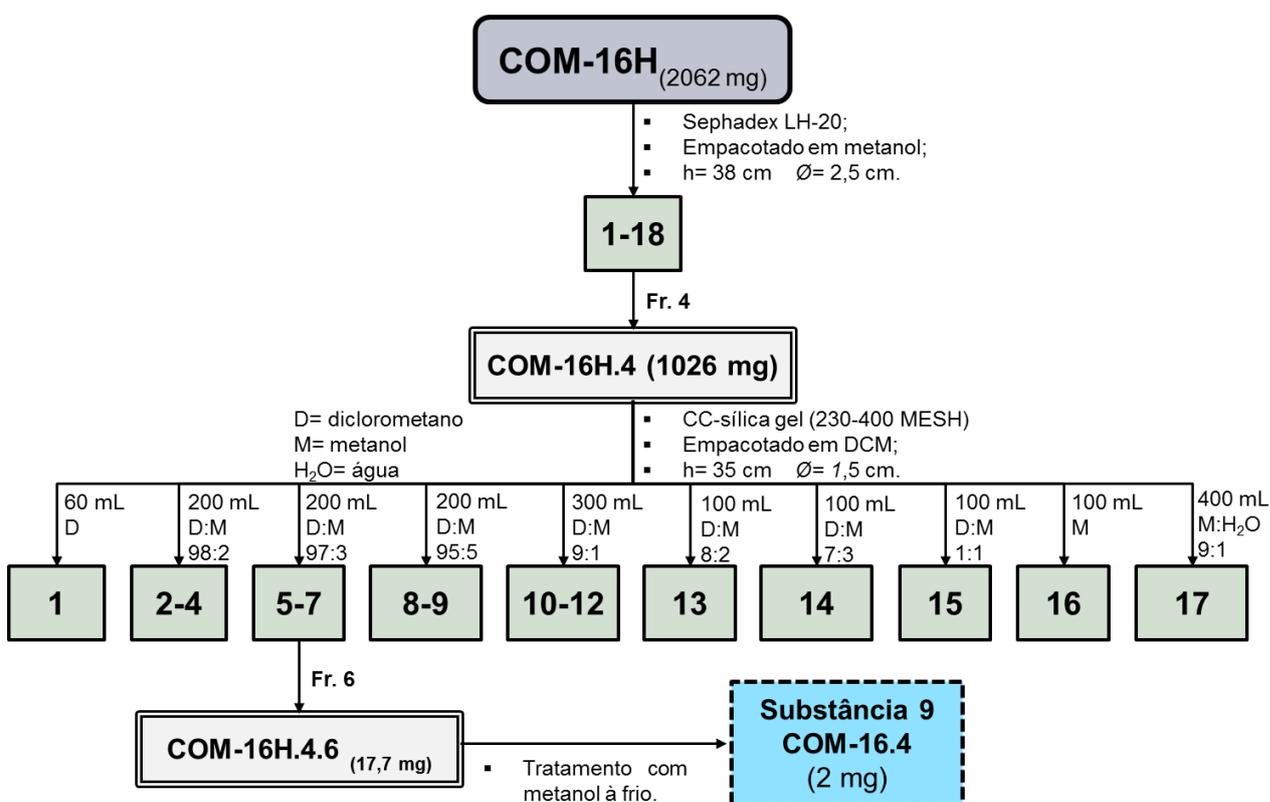
Tabela 9. Reunião de frações COM, com respectivos códigos massas.

Frações reunidas	Códigos	Massa (mg)	
1-3	COM-1	84,7	
4-8	COM-4	138	
9	COM-9	86	
10-11	COM-10	317	
12-13	COM-12	567	
14-15	COM-14	409	
16	COM-16	2922	Esquema 5
17-18	COM-17	1231	
19	COM-19	106	
20-21	COM-20	240	
22-24	COM-22	1924	

25	COM-25	142
26-28	COM-26	628

Tabela 10. Reunião de frações COM-16.H.4, com respectivos códigos massas.

Frações reunidas	Códigos	Massa (mg)
1-5	COM-16.H.4.1	6,0
6	COM-16.H.4.6	17,7
7-8	COM-16.H.4.7	341,9
9	COM-16.H.4.9	81,8
10-12	COM-16.H.4.10	166,7
13	COM-16.H.4.13	6,4
14	COM-16.H.4.14	3,1
15	COM-16.H.4.15	2,4
16	COM-16.H.4.16	21,7
17	COM-16.H.4.17	1,0



Esquema 05. Fracionamentos cromatográficos de COM-16.H, COM-16.H.4, COM-16.H.4.6

4.7 Ensaio antifúngico

O grupo de pesquisa Plantas da Amazônia: Química, Quimiosistemática e Atividade Biológica tem parceria com outros Grupos de Pesquisas para realização de ensaios biológicos incluindo atividade antifúngica. Como houve disponibilidade de massa da **Substância 8** (1009 mg), foi submetida ao bioensaio.

4.7.1 Cepas dos inóculos fúngicos

Foram utilizadas cepas padrão da *American Type Culture Collection* (ATCC), mantidas na Coleção de Microrganismos de Interesse Médico do INPA (tabela 11).

Tabela 11. Cepas utilizadas

Tipo de fungo	Espécie	Cepas
Levedura	<i>Candida albicans</i>	ATCC 13803
	<i>Cryptococcus gattii</i>	VGII WM 178/08
	<i>Cryptococcus neoformans</i>	VNI WM 148/08

4.7.2. Teste de Microdiluição

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

Os inóculos de *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*, foram preparados numa concentração final de aproximadamente $2,5 \times 10^3$ células/mL. Foi testada como agente antifúngico a **Substância 8 (COH-7)** isolada dos resíduos madeireiros de demolição de *C. odorata*, os quais passaram por diluições seriadas, partindo-se de uma concentração de 320 µg/mL em microplaca de 96 poços, com posterior incubação a 35 °C durante 24h para *C.albicans* e 72h

para *C. neofarmans* e *C. gattii*. Procedeu-se a leitura macroscópica da placa para avaliar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) da substância, ao final do tempo de incubação, e foi considerado o score de 100% de inibição. A leitura foi realizada comparando os poços do controle positivo (Inóculo fúngico + Meio de cultivo RPMI) e os poços contendo as substâncias testadas. Como droga controle de sensibilidade para os três tipos de fungos foi utilizada a **anfotericina B** e os testes foram realizados em duplicata (CLSI, 2008).

5. RESULTADO E DISCUSSÃO

5.1. Substâncias encontradas

As identificações estruturais das substâncias obtidas dos resíduos madeireiros de *C. odorata* foram realizadas com base nas técnicas de RMN unidimensionais (^1H e ^{13}C) e bidimensionais (COSY, HSQC e HMBC), aliada à Espectrometria de Massas de Alta Resolução (EMAR).

5.2. Determinação estrutural das substâncias do extrato hexânico

5.2.1. Identificação de COH-2 (substância 1)

A substância **1** (fig. 5) obtida após os fracionamentos cromatográficos apresentado no esquema 2, demonstrou possuir aspecto oleoso, cor laranja-amarelado, muito apolar, cheiro forte de citronela amadeirado. Em CCD apresentou mancha violeta quando revelada em vanilina sulfúrica e uma fluorescência visível em luz UV com comprimento de onda de 254 e 365 nm.

A substância foi caracterizada com base nos dados de RMN de ^1H e ^{13}C (Tabela 12). No espectro de RMN ^1H (Figs. 6 a 9), foram observadas a presença de 5 sinais de hidrogênios característicos de sistema aromático na região entre δ_{H} 7,92-7,21. No anel A, foram detectados três sinais na região de aromáticos em δ_{H} 7,92 (d,

$J = 8,34$ Hz; H-2), 7,91 (d, $J = 0,99$ Hz; H-5) e 7,35 (dd, $J = 8,34$ e 1,4 Hz; H-3). Para o anel B, foram verificados sinais em δ_{H} 7,28 (d, $J = 7,35$ Hz; H-8) e 7,21 (d, $J = 7,68$ Hz; H-9), ainda foi possível observar um sinal de hidrogênio de carbono metínico em δ_{H} 3,71 (hepteto, $J = 6,82$ Hz; H-12) e os metílicos do sistema aromático em δ_{H} 2,54 e 2,63, conforme mostram as figuras 8 e 9 e a tabela 12. O COSY possibilitou a confirmação da correlação do H-12 com os hidrogênios dos grupos metílicos H-13 e H-14 (fig. 10).

Os espectros de RMN de ^{13}C (fig. 11) mostraram sinais referentes a 15 carbonos, incluindo quatro grupos metílicos, dez carbonos aromáticos e um metínico, caracterizando, assim, um esqueleto de sesquiterpeno (fig 5). Com base no DEPT 135 (fig. 12) entre os carbonos aromáticos apenas cinco são hidrogenados δ 127,19 (C-3), 125,57 (C-9), 124,80 (C-2), 122,91 (C-5) e 121,40 (C-8). O mapa de contorno HSQC (fig. 13) mostrou a correlação do hidrogênio em hepteto (δ 3,71) com o sinal de carbono metínico em δ 28,21 e dos hidrogênios dos carbonos aromáticos δ 127,19 (C-3), 125,57 (C-9), 124,80 (C-2), 122,91 (C-5) e 121,40 (C-8). O mapa de contorno HMBC (figura 14) mostrou as correlações do H-12 com as metilas em δ 23,64 (C-13 e C14) e com os carbonos aromáticos em δ 142,08 (C-7), 131,07 (C-1) e 121,40 (C-8).

Esse sesquiterpeno (figura 5) é conhecido como cadaleno (1,6-dimethyl-4-isopropyl-naphthalene). Na família Meliaceae é relatada na composição dos óleos essenciais em espécies do gênero *Guarea* (Magalhães et al., 2010). Este, porém é o primeiro registro de isolamento do cadaleno em madeira de *Cedrela odorata*.

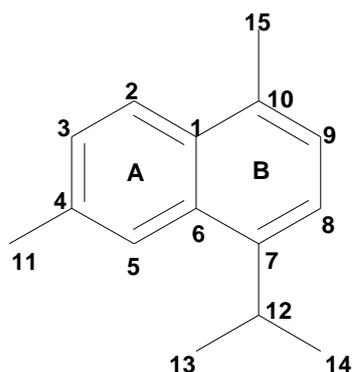


Figura 5. Estrutura do cadaleno (1,6-dimethyl-4-isopropyl-naphthalene)

Tabela 12. Dados de RMN de COH-2 (Substância 1) em CDCl₃

Posição	HSQC		HMBC
	δ ¹ H, mult, (J) Hz*	δ ¹³ C ppm**	
1	---	131,07	
2	7,92 d (8,34)	124,80	127,19 (C-3)
3	7,35 d (8,61)	127,19	122,91 (C-5), 22,05 (C-11)
4	---	131,50	
5	7,91 d (0,99)	122,91	127,19 (C-3), 28,21 (C-12)
6	---	134,71	
7	---	142,08	
8	7,28 d (7,35)	121,40	131,82 (C-10), 28,21 (C-12)
9	7,21 d (7,68)	125,57	142,08 (C-7), 121,40 (C-8), 19,44 (C-15)
10	---	131,82	
11	2,54 s	22,05	134,71 (C-6), 127,19 (C-3), 122,91 (C-5)
12	3,71 hepteto (6,82)	28,21	142,08 (C-7), 131,07 (C-1), 121,40 (C-8),
13	1,36 s	23,64	142,08 (C-7), 28,21 (C-12), 23,64 (C-14)
14	1,38 s	23,64	142,08 (C-7), 28,21 (C-12), 23,64 (C-13)
15	2,63 s	19,44	131,82 (C-10), 125,57 (C-9)

*RMN 300 MHz, CDCl₃; **dados obtidos através dos experimentos HSQC e HMBC.

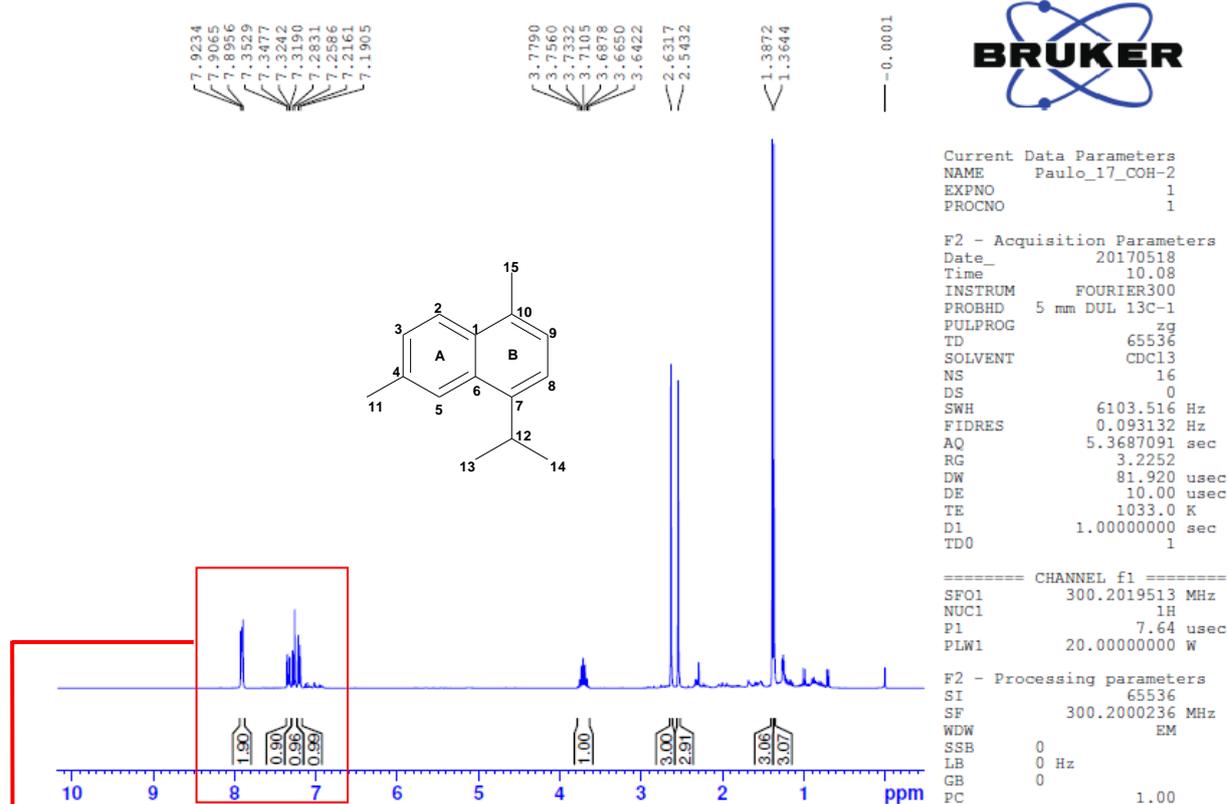


Figura 6. Espectro de RMN ¹H de COH-2 (300 MHz, CDCl₃)

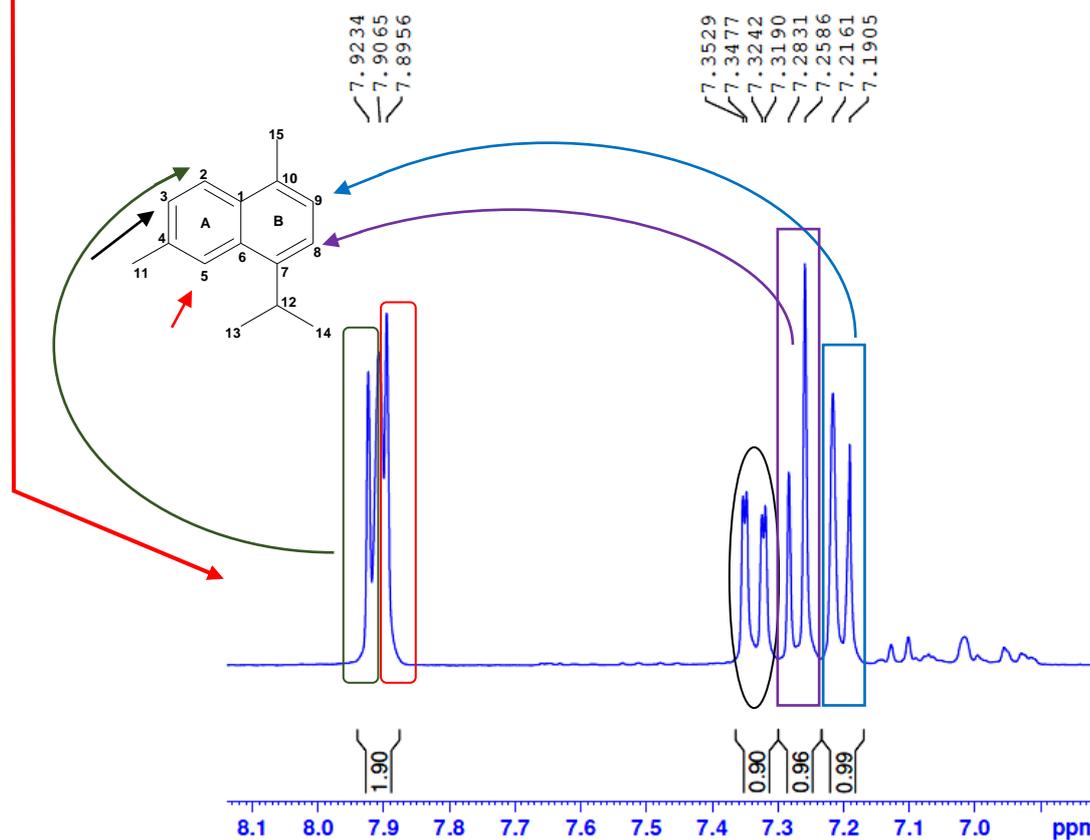


Figura 7. Expansão dos sinais de RMN de ¹H de COH-2 nas regiões de 8,1 a 6,9 ppm

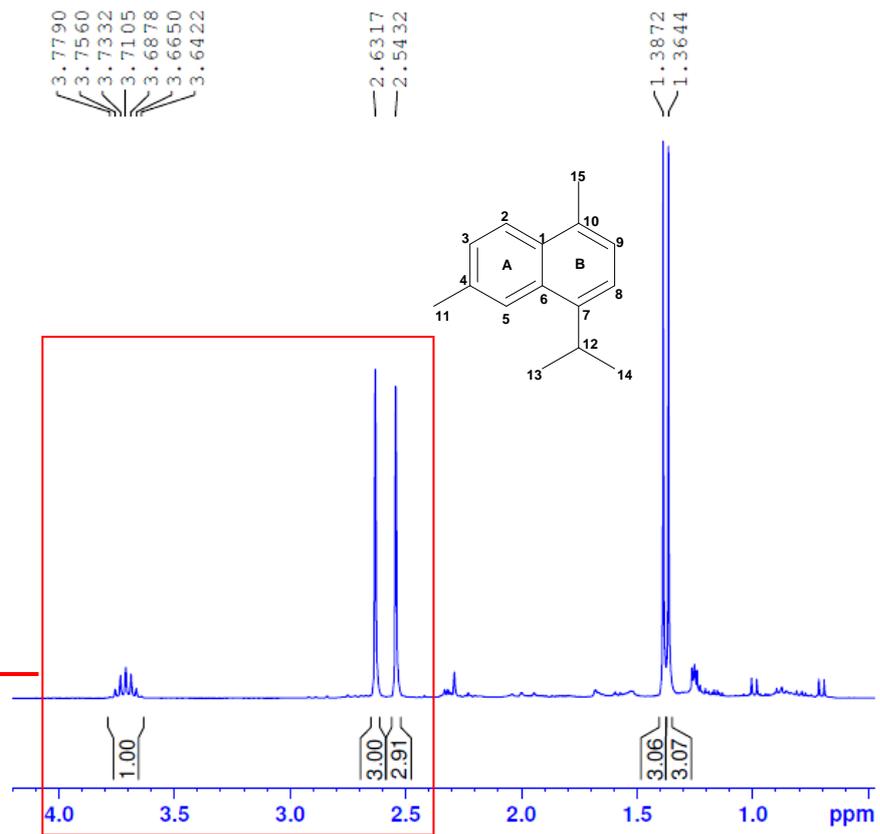


Figura 8. Expansão dos sinais de RMN de ^1H de **COH-2** nas regiões de 4,0 a 1,3 ppm

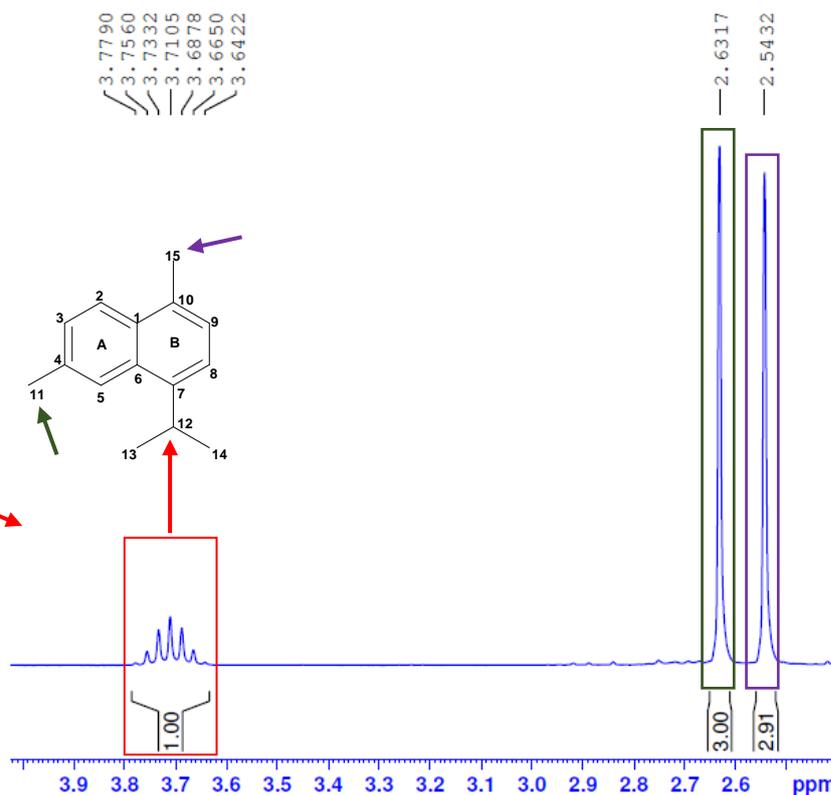


Figura 9. Expansão dos sinais de RMN de ^1H de **COH-2** nas regiões de 4,0 a 2,4 ppm

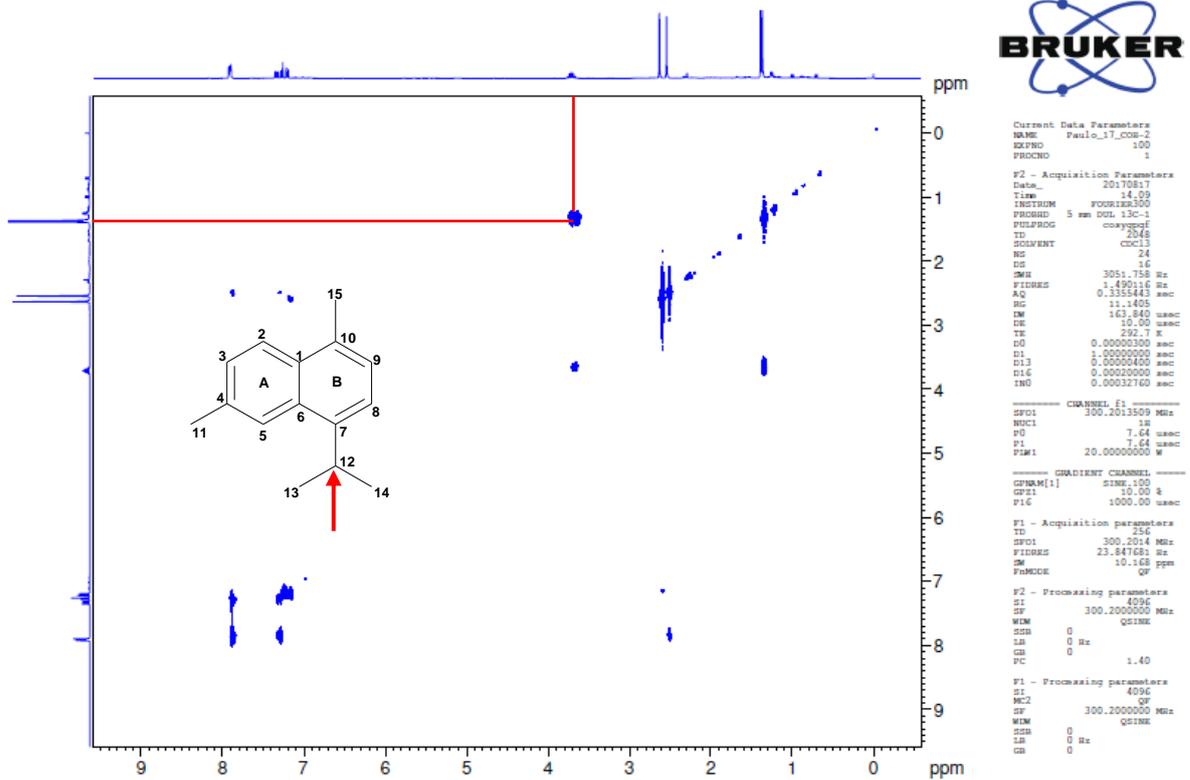


Figura 10. Mapa de contorno de COSY de COH-2 (300 MHz, CDCl₃)

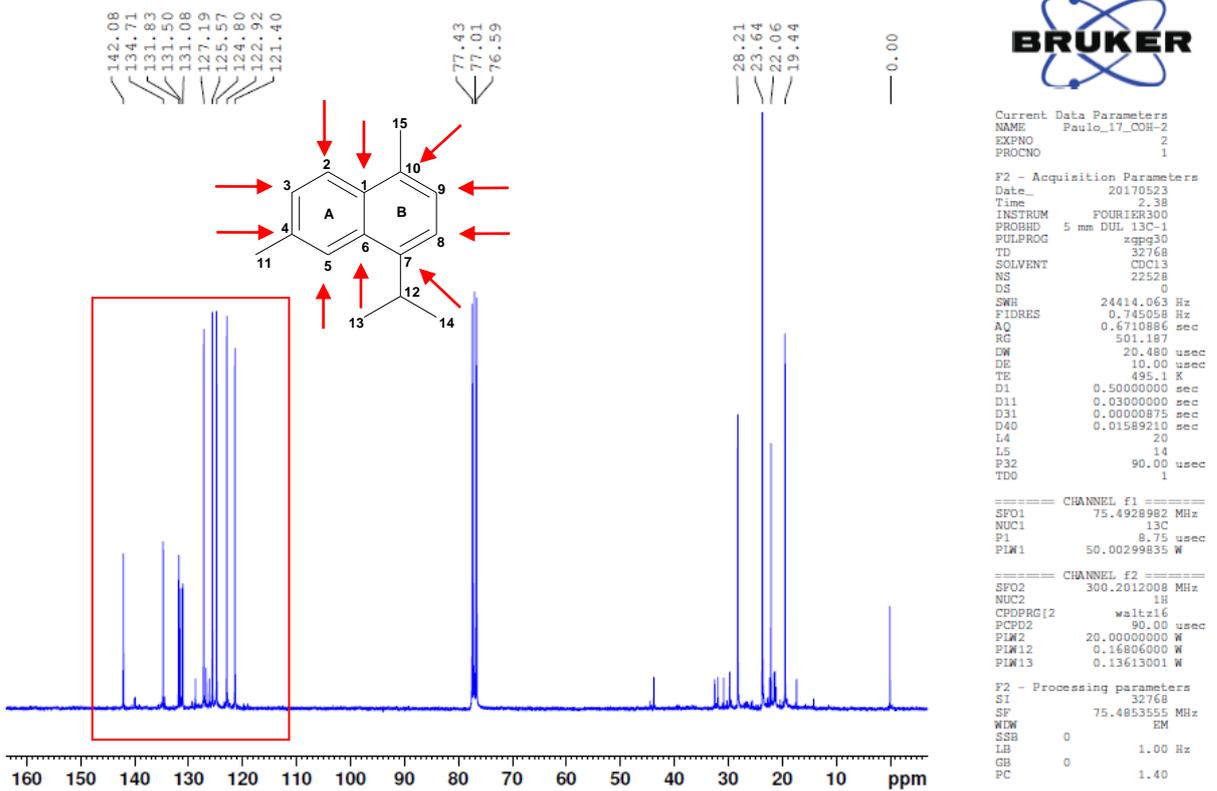


Figura 11. Espectro de RMN de ¹³C de COH-2 (75 MHz, CDCl₃)

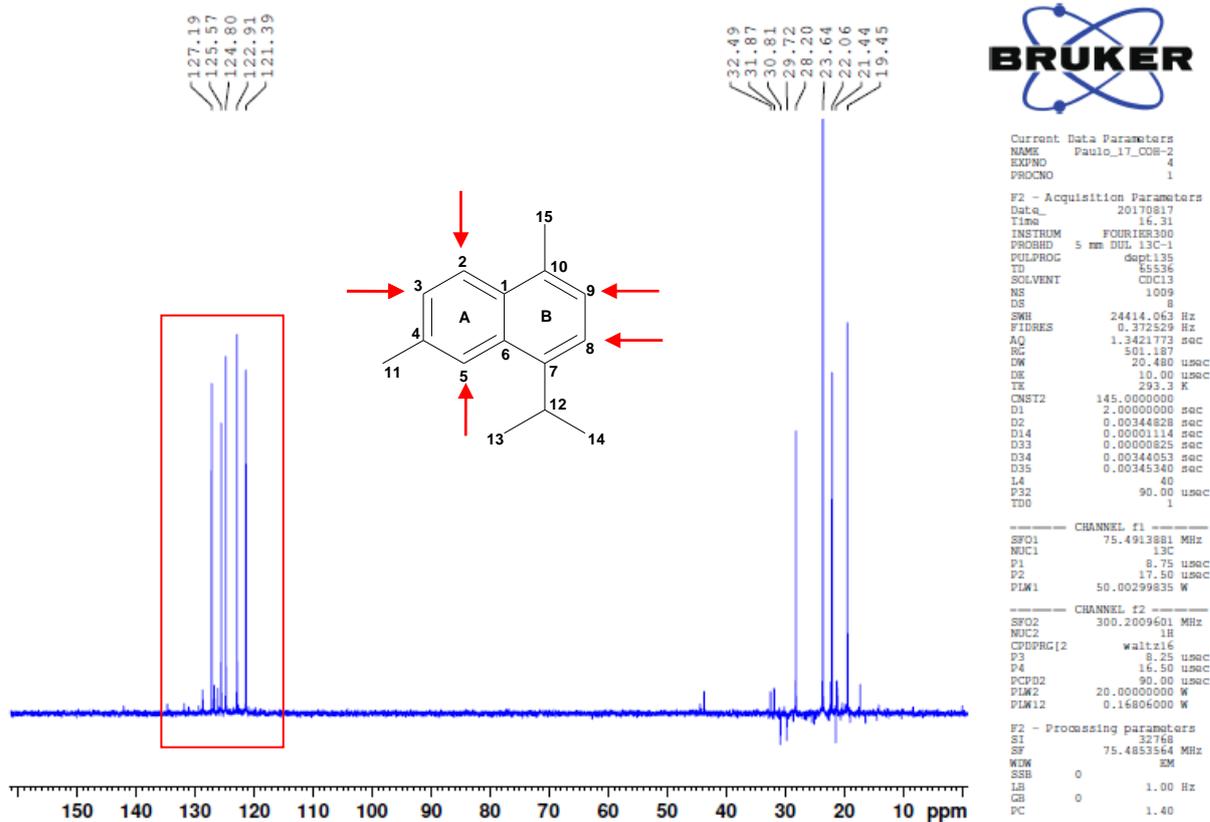


Figura 12. Espectro de dept-135 de ^{13}C de COH-2 (75 MHz, CDCl_3)

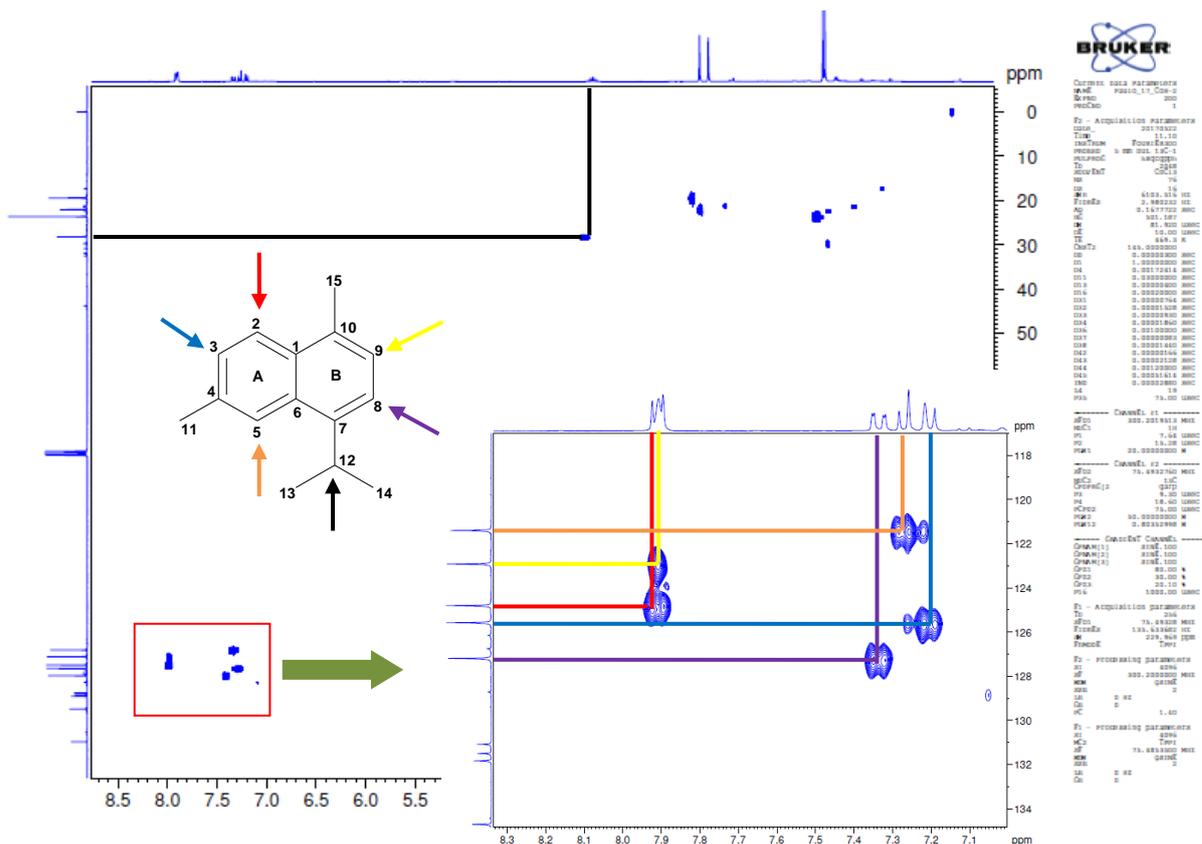


Figura 13. Mapa de contorno HSQC de COH-2 (300/75 MHz, CDCl_3)

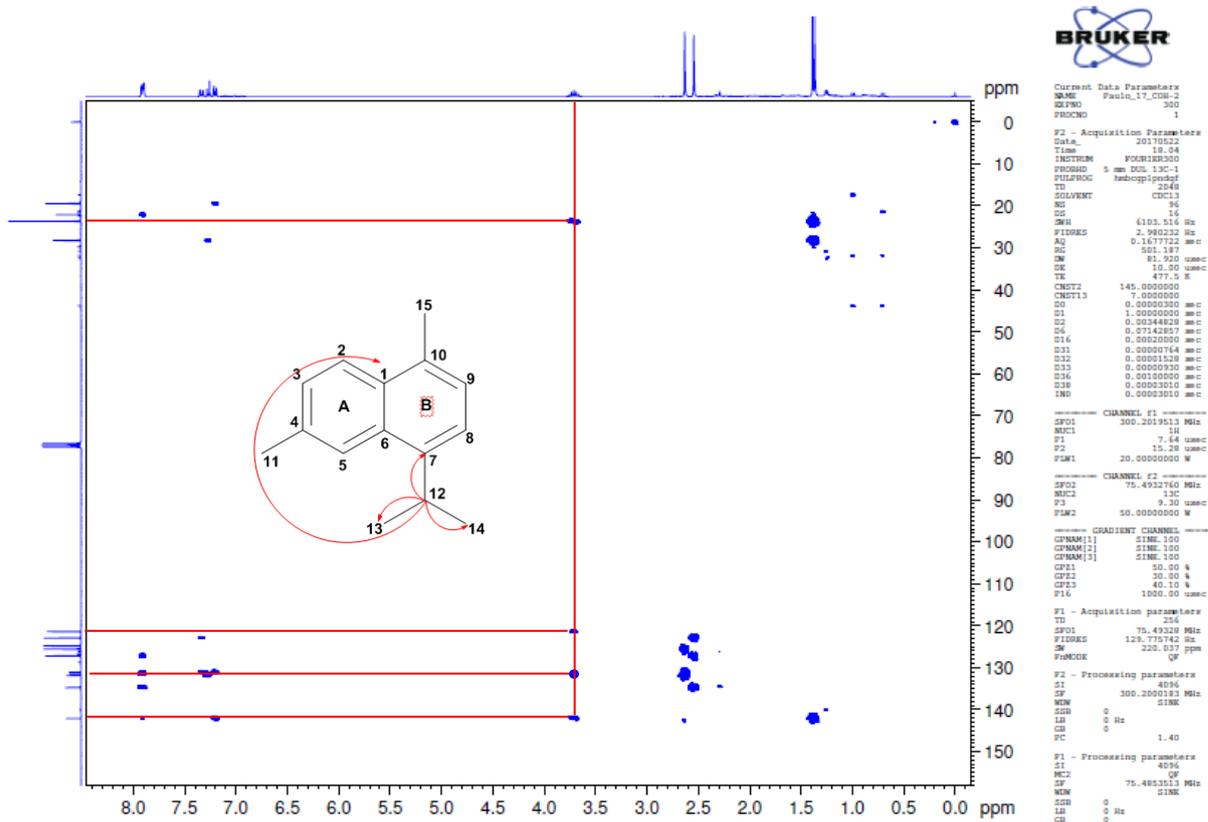


Figura 14. Mapa de contorno HMBC de COH-2 (300/75 MHz, CDCl₃)

5.2.2. Identificação de COH-3.6.3.3 (substâncias 2, 3, 4 e 5)

A fração COH-3.6.3.3 (79 mg) obtida conforme esquema 3, apresentou-se como sólido branco, quando analisada em CCD (fig. 15) mostrou-se uma mistura de substâncias com R_f próximos de difícil separação nos diversos sistemas de eluição testados. Assim, realizou-se os experimentos de LC-MS (fig. 16 e 17) e RMN uni e bidimensional para identificação das substâncias em mistura. Com base nos dados de RMN ¹H, ¹³C e DEPT 135 observou-se a predominância de quatro substâncias com deslocamentos característicos de triterpenos conforme mostram as tabelas 13 e 14. De acordo com as intensidades dos sinais de RMN ¹H e ¹³C as substâncias apresentaram a seguinte ordem de predominância: 2 > 3 > 4 > 5.

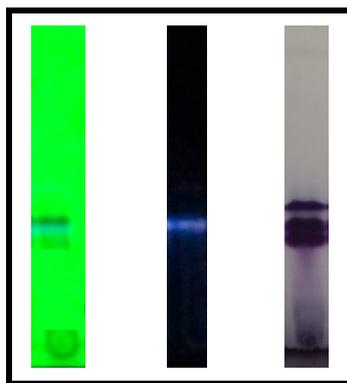


Figura 15. CCD de COH-3.6.3.3 eluída em hexano:AcOEt (7:3)

A substância **2** analisada por Espectrometria de Massas de Alta Resolução (EMAR) no modo positivo de ionização indicou o pico $[M+H]^+$ m/z 425,3784 sugerindo a fórmula molecular $C_{30}H_{48}O$ (fig. 16). Os dados de EM aliado aos sinais de RMN permitiu a identificação de **2** como cicloecalenona (quadro 5) devido os sinais de δ 4,72 (s, H-30) e 4,67 (d, $J=1,0$ Hz; H-30) característicos de hidrogênios de dupla terminal, δ 0,41 e 0,63 (d, $J=4,1$ Hz; H-19) referentes a hidrogênios metilênicos de ciclopropano, δ 2,77 (hepteto, 6,39 Hz; H-25) absorção de hidrogênio metínico (tabela 13). No espectro de RMN ^{13}C (tabela 14) o sinal da carbonila foi verificado em δ 213,39 e a dupla terminal em δ 156,81 (C-24) e 105,96 (C-31). Esses dados são compatíveis com a literatura (Kongkathip et al, 2002; Grando et al., 2008).

Em Meliaceae a cicloecalenona, um triterpeno do tipo *norcicloartano*, foi previamente descrito para as espécies *Melia azedarach* (Okogun et al., 1975) e *Cedrela odorata* enxertada com *Toona ciliata* (de Paula, et al., 1997; da Silva et al., 1999).

As substâncias **3** e **4** foram identificadas como α e β -amirenona (quadro 5), respectivamente. O espectro de RMN 1H (fig. 18 e 19) mostrou sinais de hidrogênios olefínicos em δ 5,11 característicos de esqueleto ursano e em δ 5,35 de triterpeno oleanano. Os deslocamentos dos carbonos característicos das duplas olefínicas

foram verificadas em δ 139,6 (C-13) e 125,0 (C-12) da α -amirenona (Urs-12-en-3-one), δ 146,00 (C-13) e 122,57 (C-12) da β -amirenona (Olean-12-en-3-one). O EMAR mostrou o pico $[M+H]^+$ m/z 424 sugerindo a fórmula molecular $C_{30}H_{48}O$ (fig. 16).

Na família Meliaceae a presença da α e β -amirina em madeira tem sido registrada em espécies *Trichilia* (de Souza, et al., 2009; Vieira et al., 2014).

A substância **5** apresentou no EM o pico à m/z 469,3856 correspondente a fórmula molecular $C_{32}H_{52}O_2$ (fig. 17). O espectro de RMN 1H (tabela 13) mostrou sinais de em δ 4,56 dd (10,92 e 4,83 Hz; H-3) característico de hidrogênios oximetínico, δ 5,30 m (H-7) e 5,11 m (H-24), com overlap de sinal, característicos de hidrogênios olefínico, δ 2,26 (s), característico de metila de acetato. No espectro de RMN ^{13}C (tabela 14) o sinal do carbono oximetínico foi verificado em δ 78,37 (C-3). Os deslocamentos de carbonos hidrogenados em δ 117,72 e 125,09, carbonos desidrogenados em δ 145,96 e 130,97 (fig. 21) são característicos da dupla ligação de triterpeno do tipo tirucalano. Com base nos dados a substância 5 foi identificada como acetato de butirospermol (quadro 5).

Butirospermol ocorre em *Xylocarpus granatum* (Wu, et al., 2006) o acetato de butirospermol é o primeiro registro em *Cedrela odorata*.

Os espectros de DEPT e os mapas de Correlação HSQC e HMBC (fig. 22, 23 e 24) também foram analisadas para a identificação dos quatro triterpenos da fração COH-3.6.3.3.

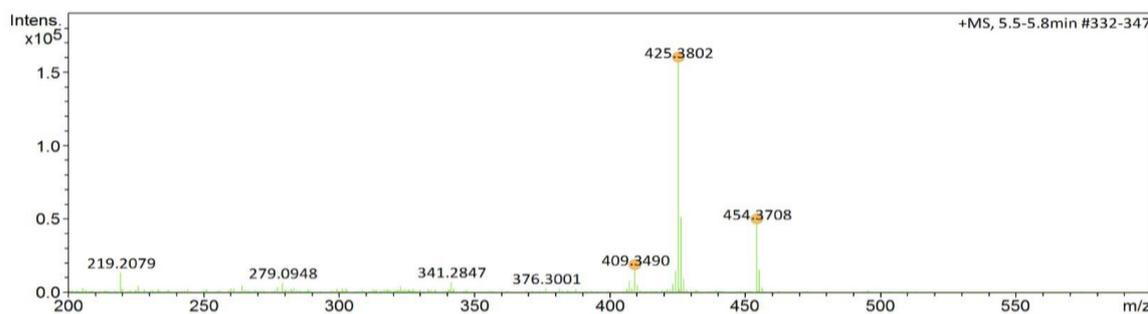


Figura 16. Espectro de Massas de Alta Resolução de COH-3.6.3.3 (ESI, modo positivo)

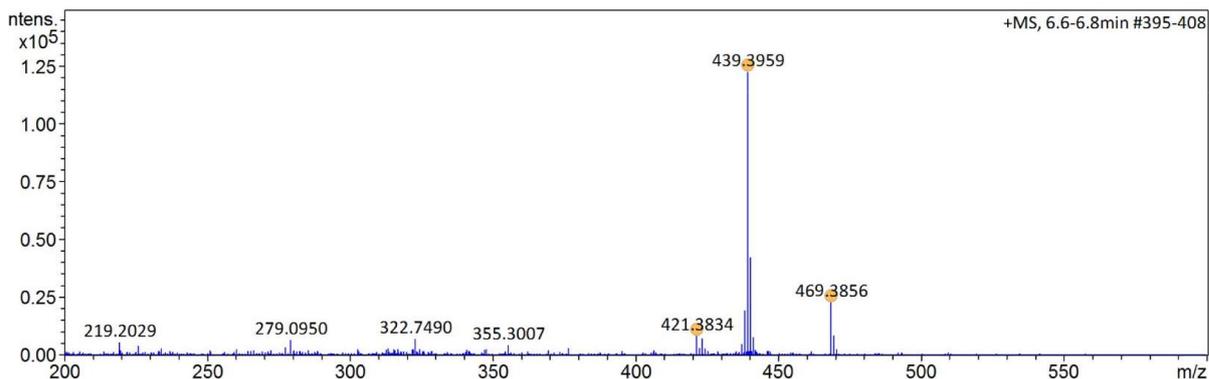


Figura 17. Espectro de Massas de Alta Resolução de COH-3.6.3.3

Tabela 13. Dados de RMN ^1H de COH-3.6.3.3 (Substâncias 2, 3, 4 e 5) em CDCl_3

Posição	δ ^1H mult (Hz)			
	2	3**	4***	5
3				4,56 dd (10,92 e 4,83)
7				5,30*
12		5,11*	5,35*	
19	0,41 d (4,1)			
	0,63 d (4,1)			
24				5,11*
25	2,77 hept (6,4)			
26	1,04 d (7,0)			
27	1,02 d (6,8)			
29	1,00 s			
31	4,72 sl			
	4,67 d (1,1)			
COCH_3				2,26 s

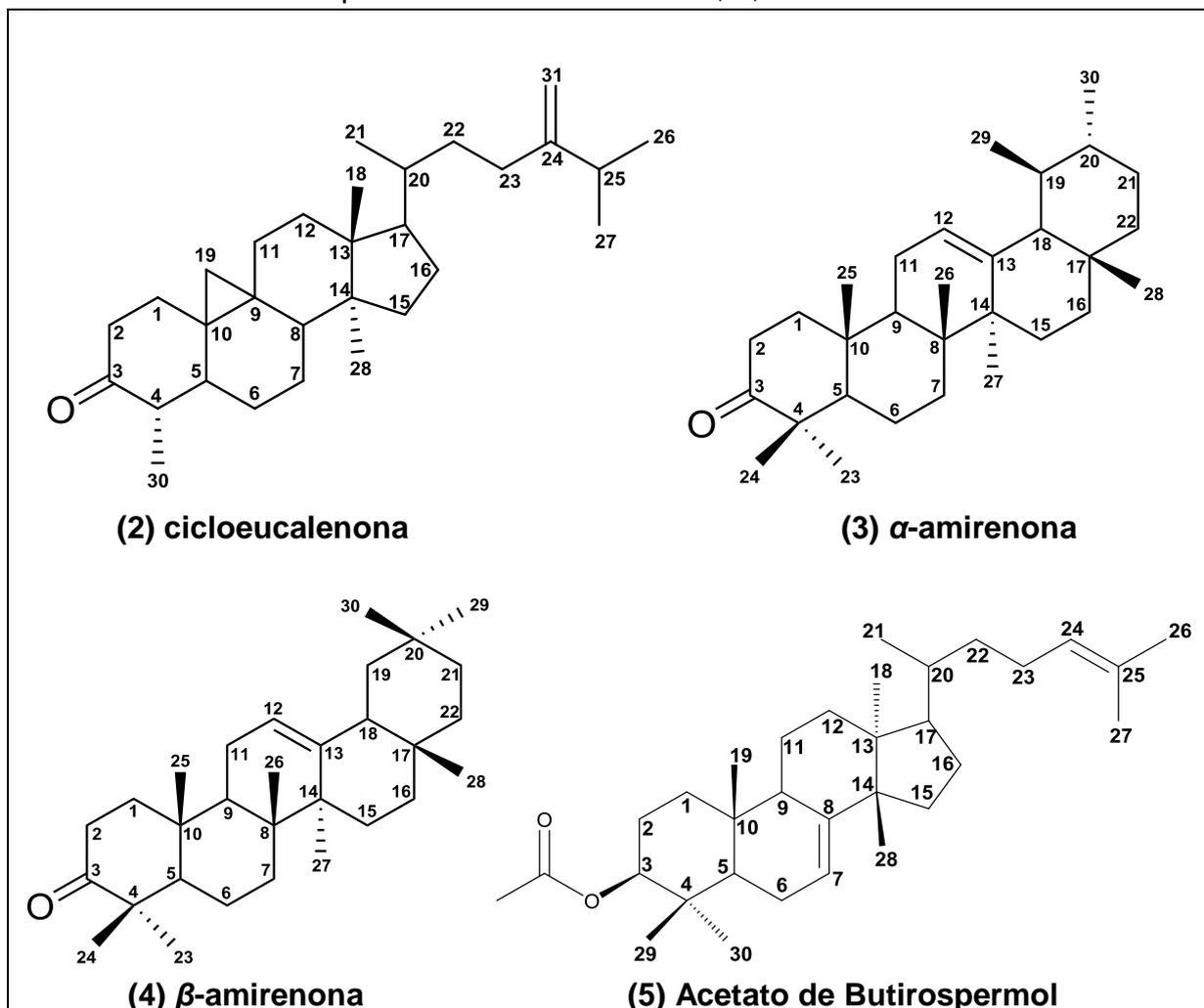
* overlap, ** α e *** β -amirenona, respectivamente.

Tabela 14. Dados de RMN ^{13}C de COH-3.6.3.3 (Substâncias 2, 3, 4 e 5) em CDCl_3

Posição	$\delta^{13}\text{C}$			
	2	3**	4***	5
3	213,39	216,63	216,63	78,37
7				117,72
8				145,96
12		125,0	122,57	
13		139,6	146,00	
19	26,59			
24	156,81			125,09
25	37,48			130,97
29	10,75			
31	105,96			
COCH₃				173,71

** α e *** β -amirenona, respectivamente

Quadro 5. Estruturas químicas das substâncias 2, 3, 4 e 5 identificadas na mistura



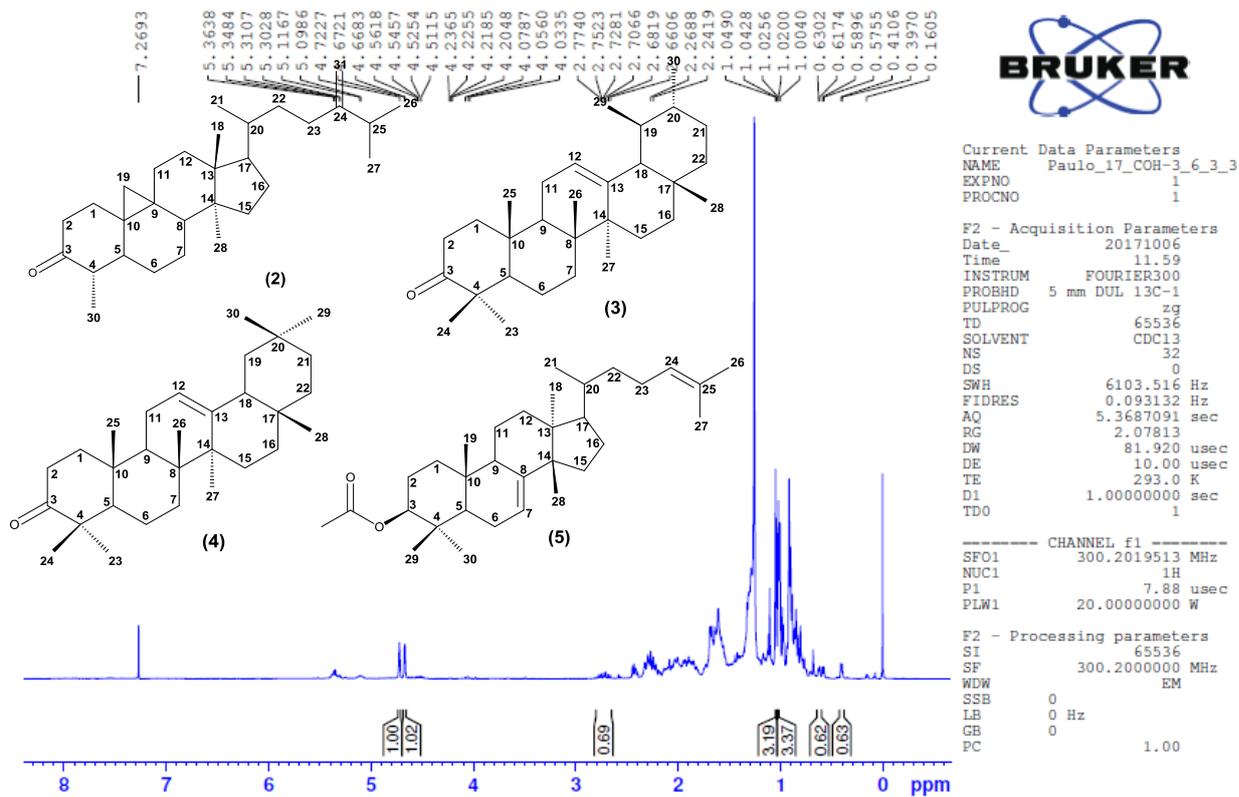


Figura 18. Espectro de RMN ^1H de COH-3.6.3.3 (300 MHz)

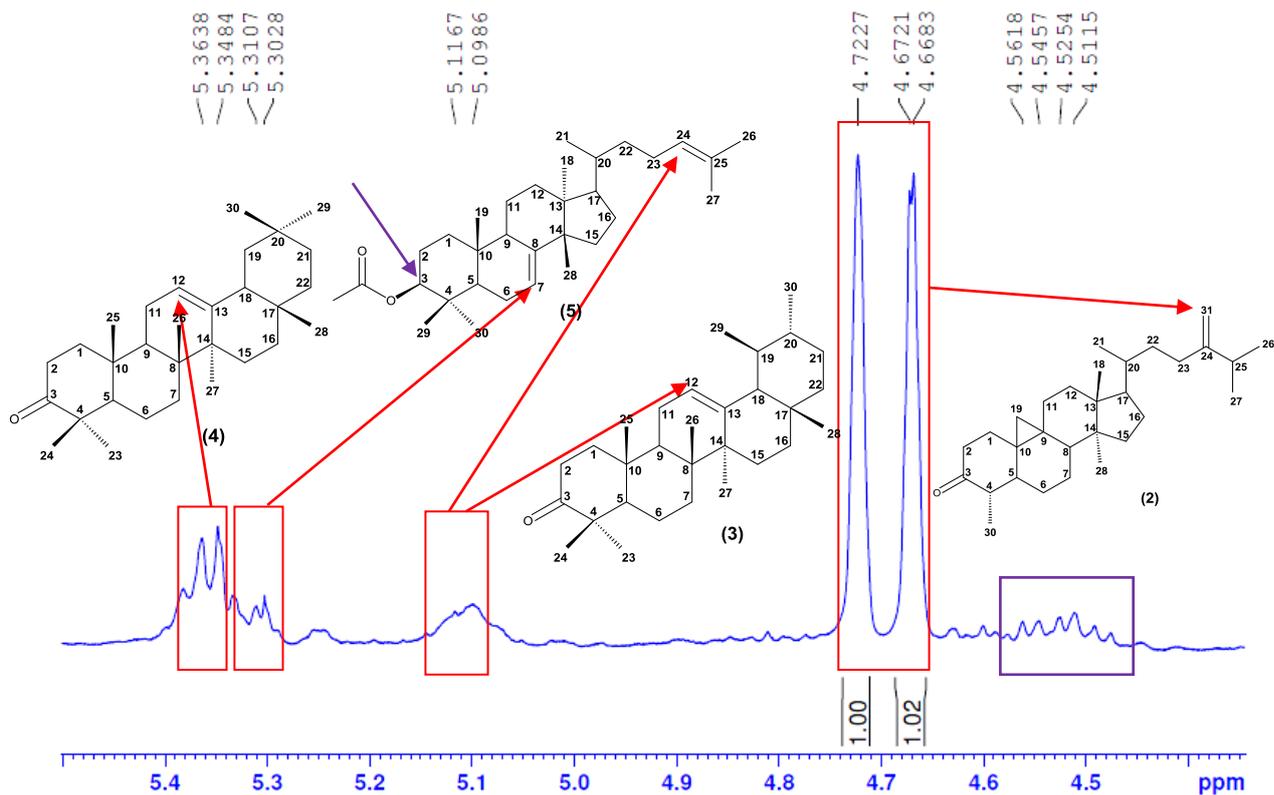


Figura 19. Expansão do RMN de ^1H de COH-3.6.3.3 nas regiões de 5,5 a 4,4 ppm

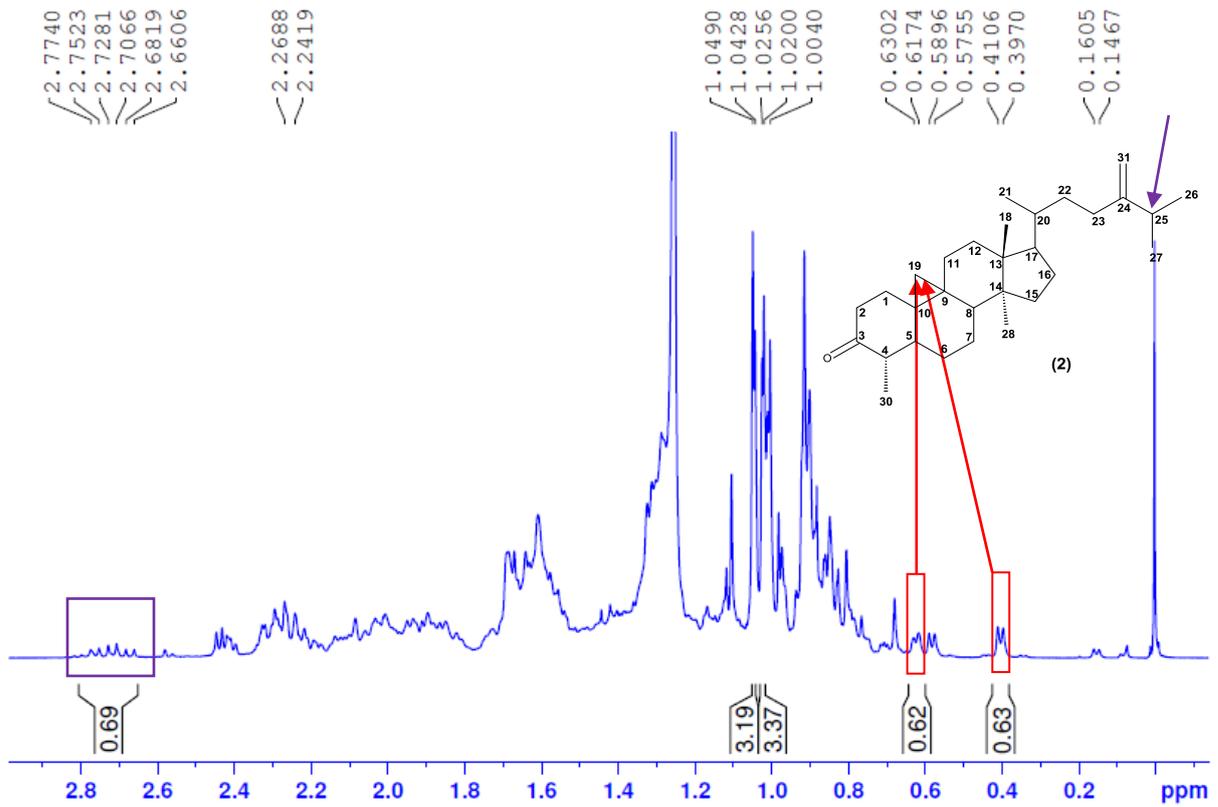


Figura 20. Expansão do RMN de ^1H de COH-3.6.3.3 nas regiões de 2,9 a 0,0 ppm

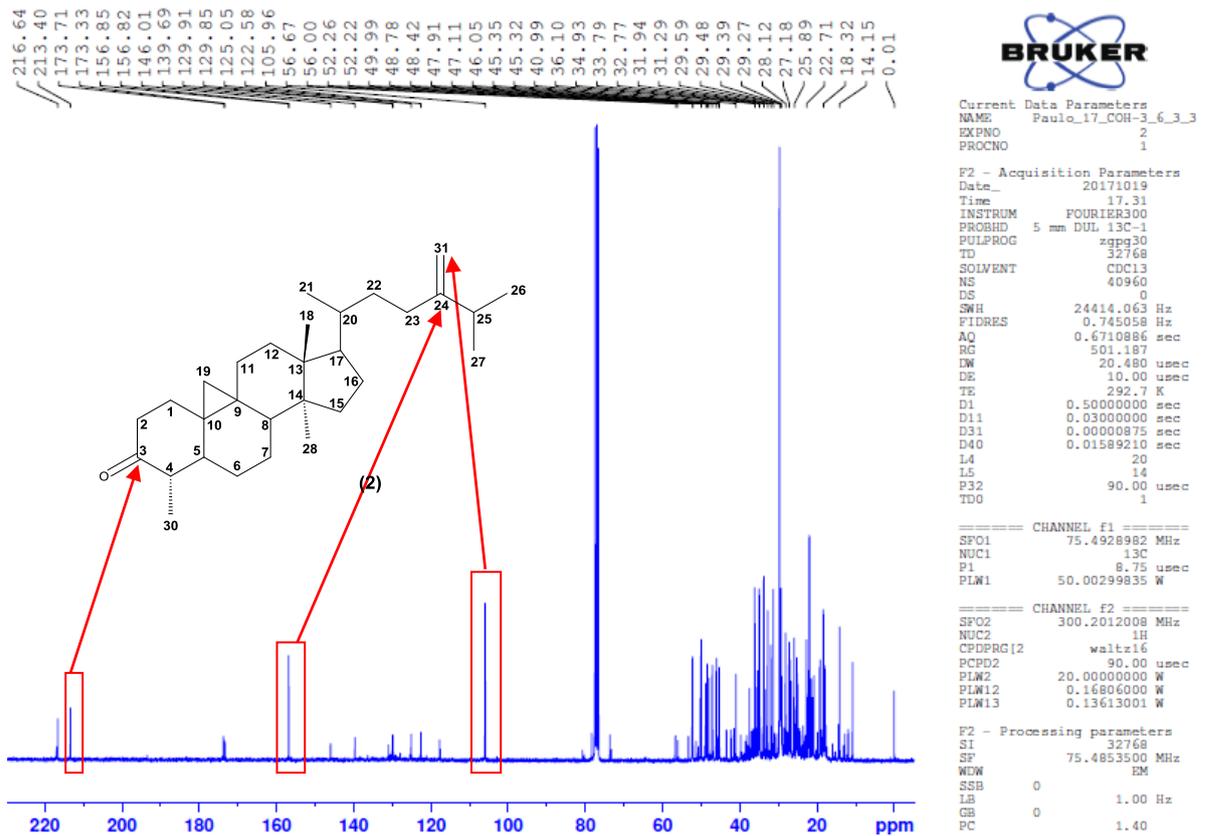


Figura 21. Espectro de RMN ^{13}C de COH-3.6.3.3 (75 MHz)

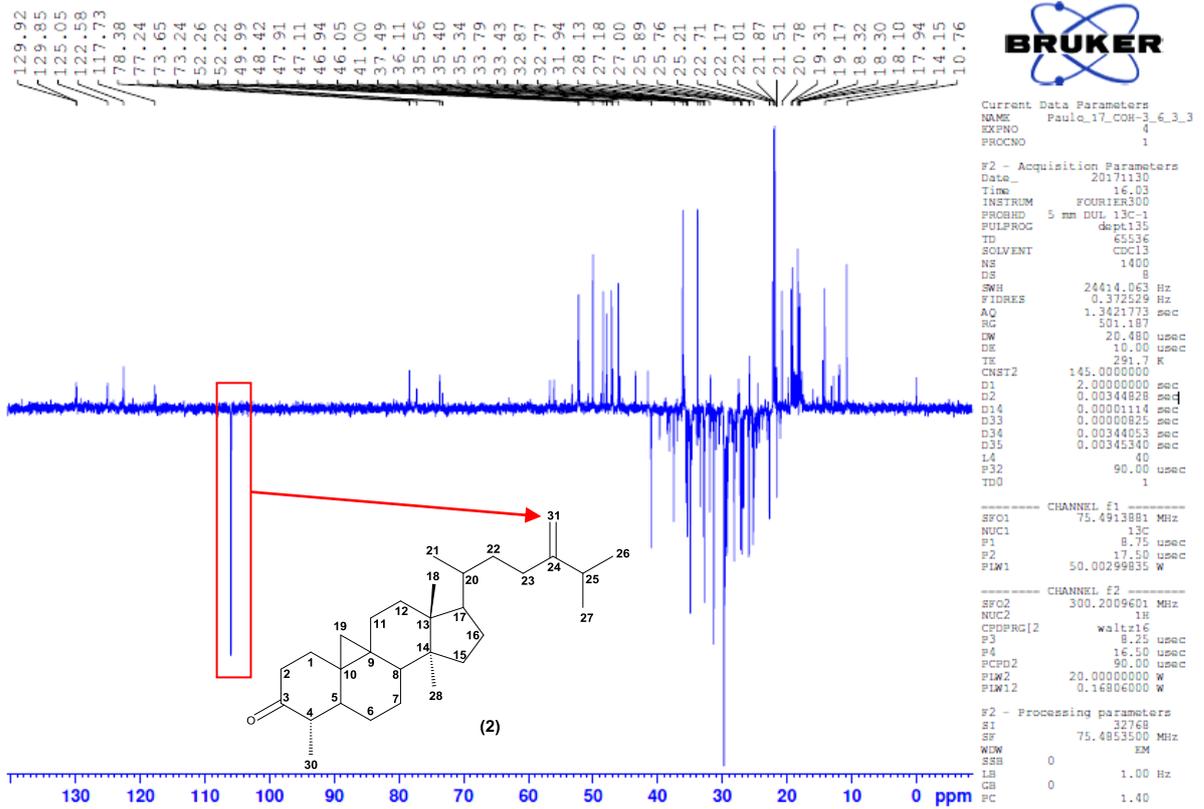


Figura 22. Espectro de DEPT-135 de COH-3.6.3.3 (75 MHz).

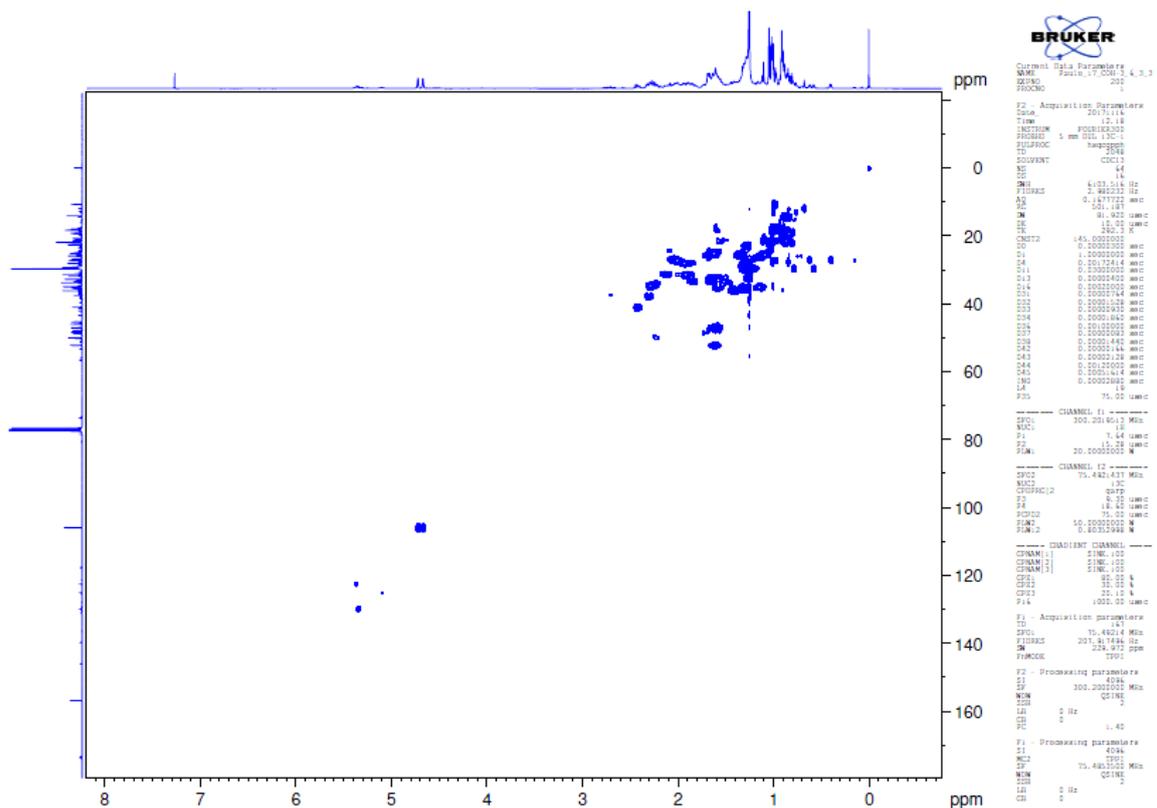


Figura 23. Mapa de contorno HSQC de COH-3.6.3.3 (300/75 MHz).

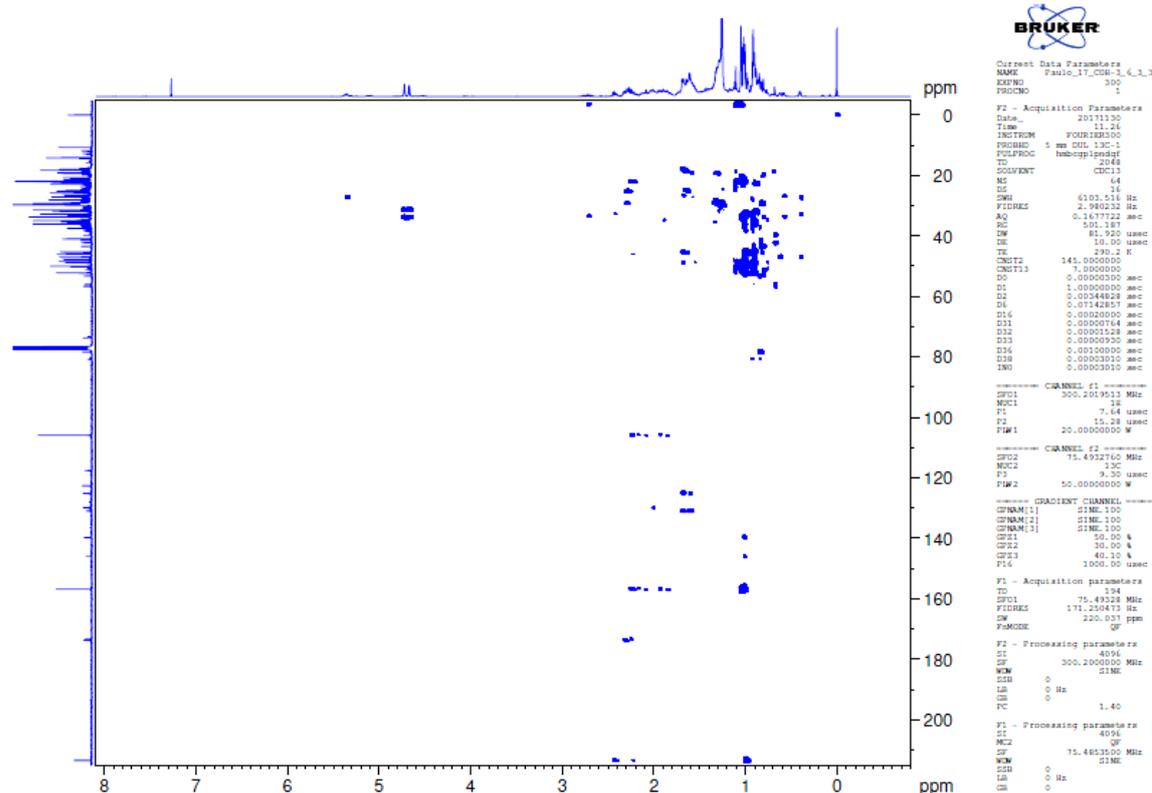


Figura 24. Mapa de contorno HMBC de COH-3.6.3.3 (300/75 MHz).

5.2.3. Identificação de COH-6 (substâncias em mistura 6 e 7)

A fração COH-6 (13 mg) apresentou-se como sólido branco, e em CCD mostrou o mesmo Rf da amostra padrão de β -sitosterol, utilizando-se Hex:AcOEt (8:2) como sistema de eluição.

A amostra foi submetida à análise por RMN ^1H , para confirmação da substância e/ou investigação da presença de outros esteroides. Os dados do espectro de RMN ^1H (Tabela 15; fig. 25 e 26) mostraram sinais característico da mistura dos esteroides β -sitosterol **6** e estigmasterol **7** (quadro 6), em δ 5,36 (H-6) referente aos hidrogênio olefínico dos dois esteroides e em δ 5,19 (H-22) e 5,05 (H-23) característicos dos olefínicos da cadeia lateral do estigmasterol que tem menor predominância. Os hidrogênios carbinólicos foram verificados em δ 3,52 (H-3).

Quadro 6. Mistura de esteroides **6** e **7** na fração **COH-6**

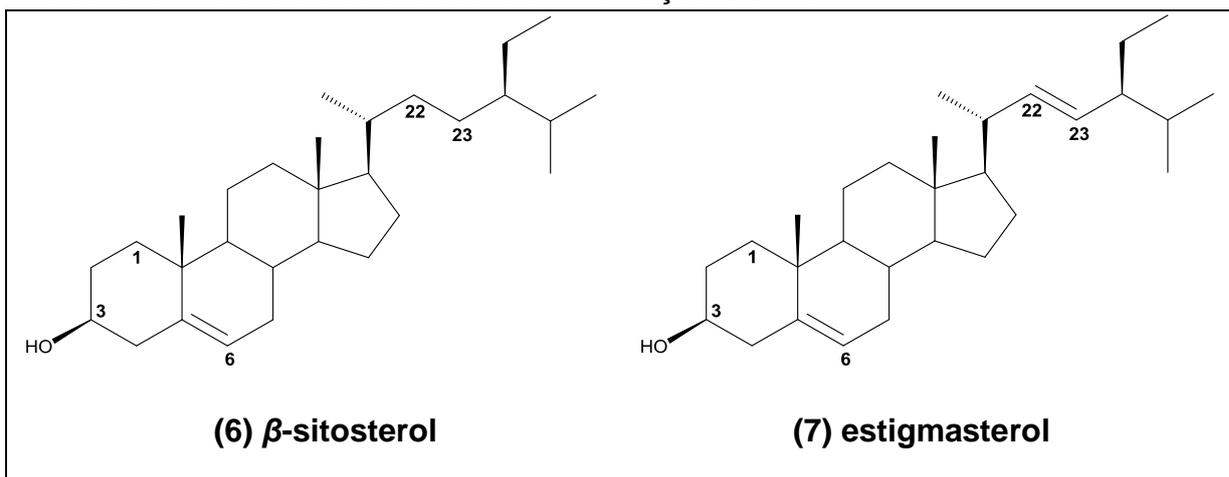


Tabela 15. Dados dos hidrogênios olefínicos e carbinólicos da fração **COH-6** em CDCl_3

Posição	β -sitosterol δ ^1H mult (J) Hz	Stigmasterol δ ^1H mult (J) Hz
3	3,52 <i>m</i>	3,52 <i>m</i>
6	5,36 <i>d</i> (5,19)	5,36 <i>d</i> (5,19)
22		5,19 <i>dd</i> (15,15 e 8,37)
23		5,05 <i>dd</i> (15,15 e 8,37)

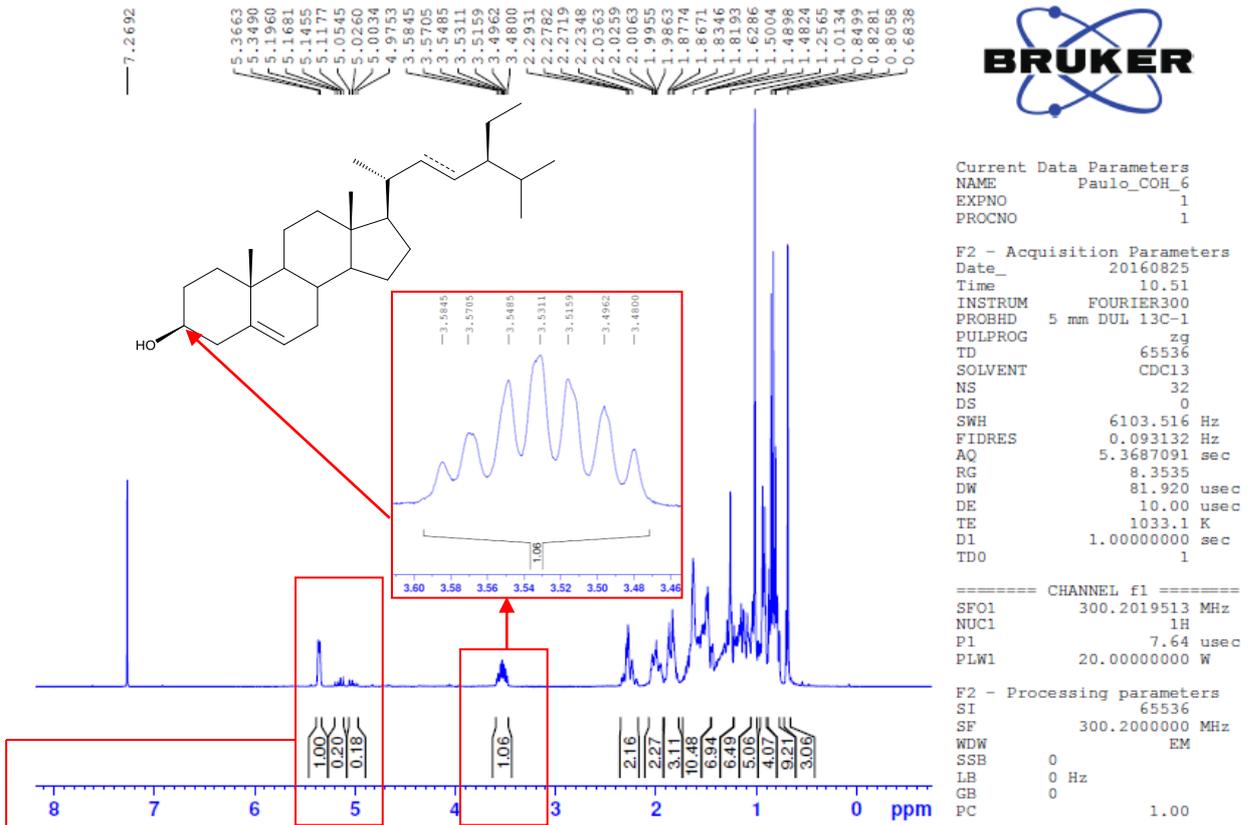


Figura 25. Espectro de RMN ^1H de COH-6 (300 MHz, CDCl_3)

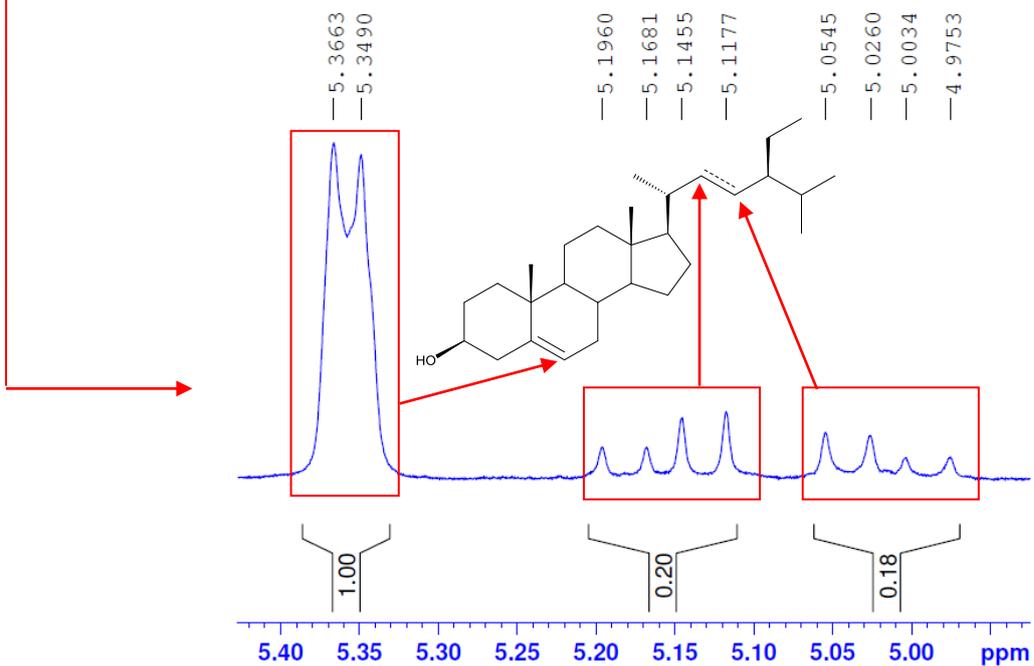


Figura 26. Expansão dos sinais de RMN de ^1H de COH-6 nas regiões de 5,40 a 4,90 ppm

5.2.4. Identificação COH-7, COM-16a.6 e COM-16b.1 (Substância 8)

A **substância 8** (1009 mg, sólido branco), forneceu um espectro de massas ESI (+) que apresentou um pico em m/z 469,2230 $[M+H]^+$ (fig. 28), correspondente ao íon pseudo-molecular, condizente com a fórmula molecular $C_{27}H_{32}O_7$.

O espectro de RMN 1H (fig. 29) apresentou quatro sinais referentes a hidrogênios de grupos metilas em δ 1,24 (s, H-19), 0,99 (s, H-18) 0,98 (s, H-29) e 0,89 (s, H-28); um singleto integrando para três hidrogênios em δ 3,68, atribuído a metoxila, sinais referentes aos hidrogênios do anel furano β -substituído em δ 7,57-7,56 (m, H-21), 7,39 (t, $J = 1,6$ Hz, H-23) e 6,48 (dd, $J = 1,7$ e 0,6 Hz, H-22), em δ 5,23 característico de oximetínico atribuído a H-17.

O espectro de RMN ^{13}C (fig. 32) mostrou a presença de duas carbonilas de cetona em δ 211,06 (C-3) e 213,04 (C-1), uma carbonila de lactona em δ 169,94 (C-16), uma dupla ligação tetrasubstituída em δ 133,82 (C-14) e 125,33 (C-8), observados através do DEPT 135 (fig. 33). Os dados de RMN de 1H e ^{13}C foram similares aos reportados para o limonóide mexicanólida (fig. 27) (LEITE et al., 2006 e GOVINDACHARI, et al., 1998).

No mapa de correlações HSQC (fig. 34) verificou-se que o sinal de hidrogênio em δ 5,23 correlacionou-se com o sinal em δ 80,76 (C-17).

Pela análise do HMBC (fig. 35) pode-se visualizar as correlações do sinal em δ 5,23 com os sinais em δ 141,60 (C-21), 133,82 (C-14), 120,32 (C-20), 109,96 (C-22), 37,98 (C-13) e 17,36 (Me-18). Verificou-se ainda outras correlações importantes para o sistema bicíclico do esqueleto mexicanólideo, os dois hidrogênios diastereotópicos: em δ 3,25 (H-30a) com os deslocamentos em δ 133,82 (C-14); 125,33 (C-8) e 50,49 (C-9); e em δ 2,35 (H-30b) com os sinais de carbonos δ 211,06 (C-3), 133,82 (C-14); 125,33 (C-8) e 58,00 (C-2). Correlações do sinal em δ 3,22 (H-

2) com os carbonos em δ 213,04 (C-1); 211,06 (C-3); 133,82 (C-14); 125,33 (C-8) e 50,49 (C-9) confirmando o fechamento do bicíclico e a proposta biossintética (fig. 36).

Os dados espectrais proporcionaram a identificação de **8** como mexicanólida de ocorrência comum em diversos gêneros de Meliaceae (NAIDOO *et al*, 2003; Bray, *et al.*, 1990; SANNI *et al*, 1987 e BANERJI E NIGAM, 1984) também identificada em madeira de *Cedrela odorata* (BEVAN *et. al.*, 1965).

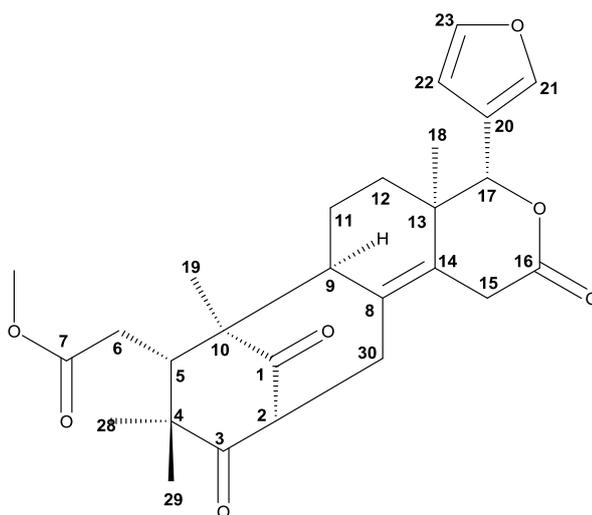


Figura 27. Estrutura Química da fração **COH-7** (mexicanólida)

Tabela 16. Dados dos RMN de ^1H e ^{13}C da fração COH-7 em CDCl_3

Nº	δ ^1H , <i>mult</i> , (J) Hz	δ ^{13}C	HMBC
1	---	213,04	
2	3,22 s largo	58,00	213,04 (C-1); 211,06 (C-3); 133,82 (C-14); 173,61 (C-8); 50,49 (C-9)
3	---	211,06	
4	---	49,40	
5	2,76 <i>dd</i> (7,9 e 4,9)	40,13	173,61 (C-7); 54,28 (C-10); 50,49 (C-9); 32,28 (C-6); 17,96 (C-28)
6a	2,50 <i>d</i> (4,9) 2,49 <i>d</i> (7,9)	32,28	173,61 (C-7); 54,28 (C-10); 49,40 (C-4); 40,13 (C-5)
6b			
7	---	173,61	
8	---	125,33	
9	2,10 <i>d largo</i>	50,49	

10	---	54,28	
11	1,88-1,77 <i>m</i>	18,65	80,76 (C-17); 54,28 (C-10); 28,76 (C-12)
12a	1,88-1,77 <i>m</i>	28,76	80,76 (C-17); 54,28 (C-10); 37,98 (C-13)
12b	1,14-1,06 <i>m</i>		
13	---	37,98	
14	---	133,82	
15a	3,50 <i>t</i> (2,79)	32,95	173,61 (C-8); 169,94 (C-16); 133,82 (C-14)
15b	3,47 <i>t</i> (2,34)	32,95	173,61 (C-8); 169,94 (C-16); 133,82 (C-14)
16	---	169,94	
17	5,23 <i>s</i> largo	80,76	141,60 (C-21); 133,82 (C-14); 120,33 (C-20); 109,96 (C-22); 37,98 (C-13); 17,36 (C-18)
18	0,99 <i>s</i>	17,36	133,82 (C-14); 80,76 (C-17); 37,98 (C-13); 28,76 (C-12)
19	1,24 <i>s</i>	17,89	213,04 (C-1); 54,28 (C-10); 50,49 (C-9); 40,13 (C-5)
20	---	120,33	
21	7,57- 7,56 <i>m</i>	141,60	142,78 (C-23); 120,33 (C-20); 109,96 (C-22)
22	6,48 <i>dd</i> (1,7 e 0,6)	109,96	142,78 (C-23); 141,60 (C-21); 120,33 (C-20)
23	7,39 <i>t</i> (1,6)	142,78	141,60 (C-21); 120,33 (C-20); 109,96 (C-22)
28	0,86 <i>s</i>	17,96	211,06 (C-3); 49,40 (C-4); 40,13 (C-5); 21,92 (C-29)
29	0,98 <i>s</i>	21,92	211,06 (C-3); 49,40 (C-4); 40,13 (C-5); 17,96 (C-28)
30a	3,25 <i>dd</i> (21,87 e 3,0)	36,45	133,82 (C-14); 125,33 (C-8) e 50,49 (C-9)
30b	2,35 <i>m</i>	36,45	211,06 (C-3), 133,82 (C-14); 125,33 (C-8) e 58,00 (C-2)
OMe	3,68 <i>s</i> largo	52,25	173,61 (C-7)

* As correlações à J-1 foram verificadas pelo mapa de correlações HSQC.

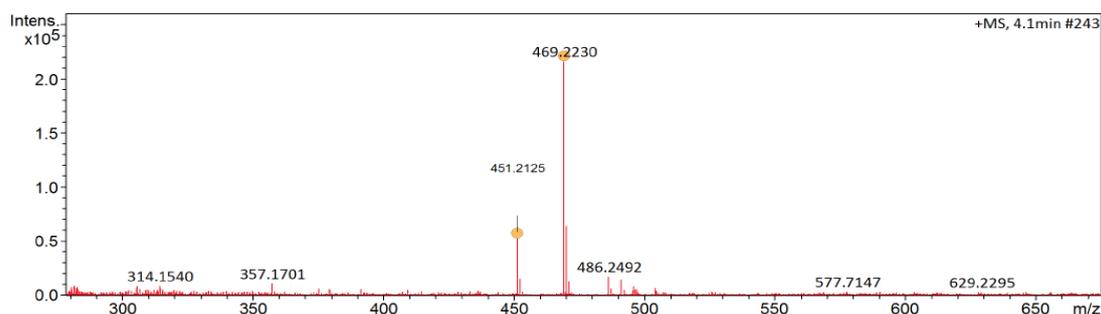


Figura 28. Espectrometria de Massas de Alta Resolução de **COH-7** (mexicanólida)

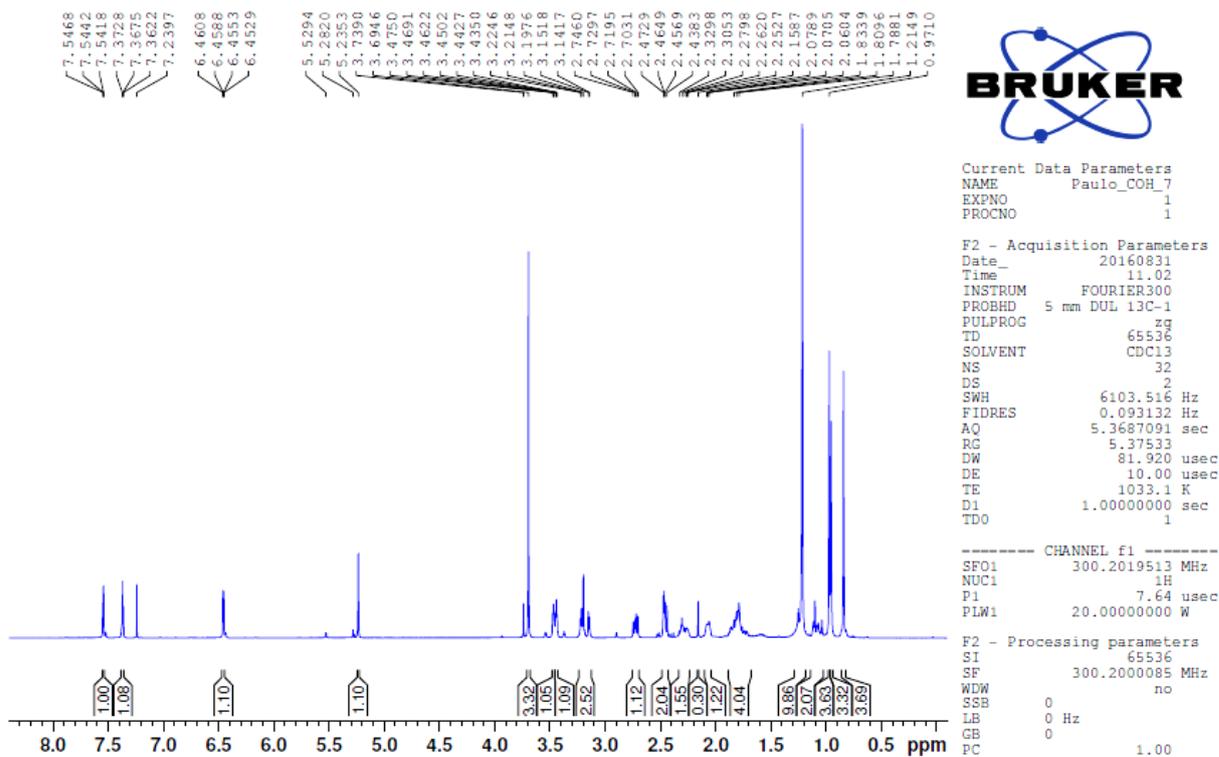


Figura 29. Espectro de RMN ^1H de COH-7 (300 MHz, CDCl_3)

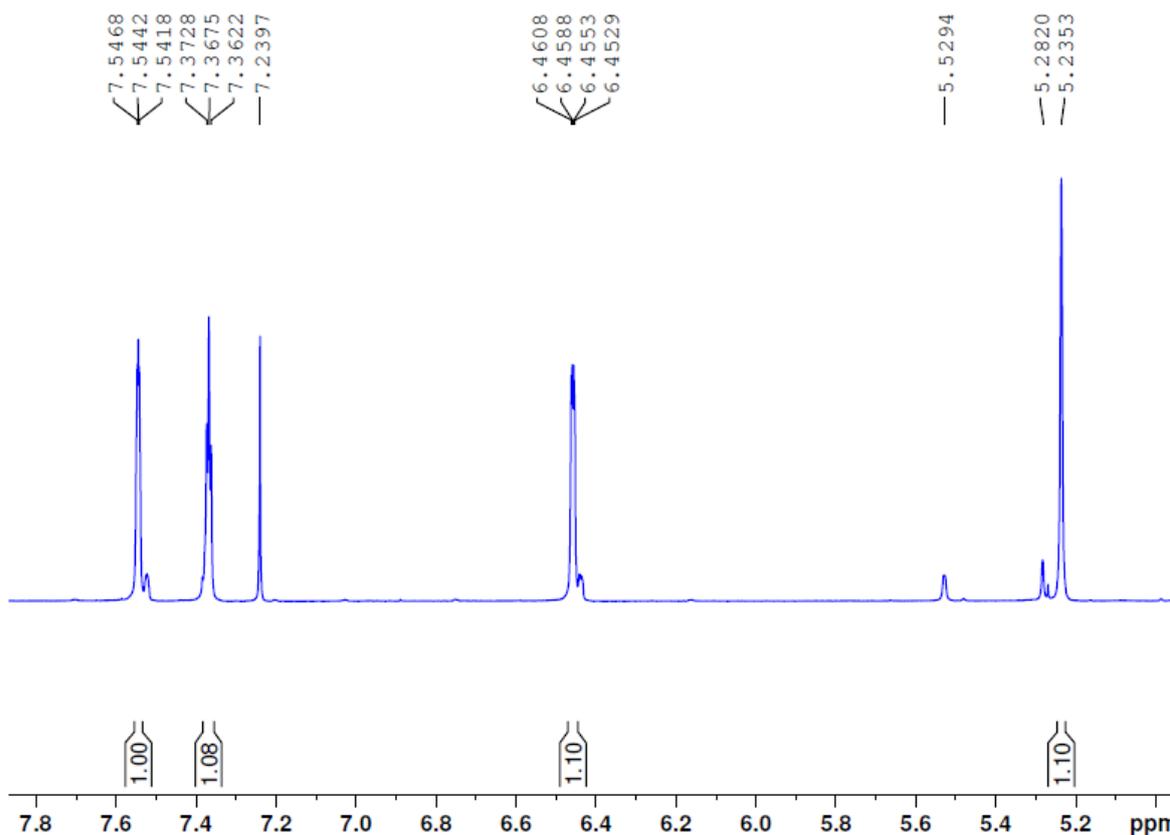


Figura 30. Expansão dos sinais de RMN de ^1H de COH-7 nas regiões de 7,80 a 5,10 ppm

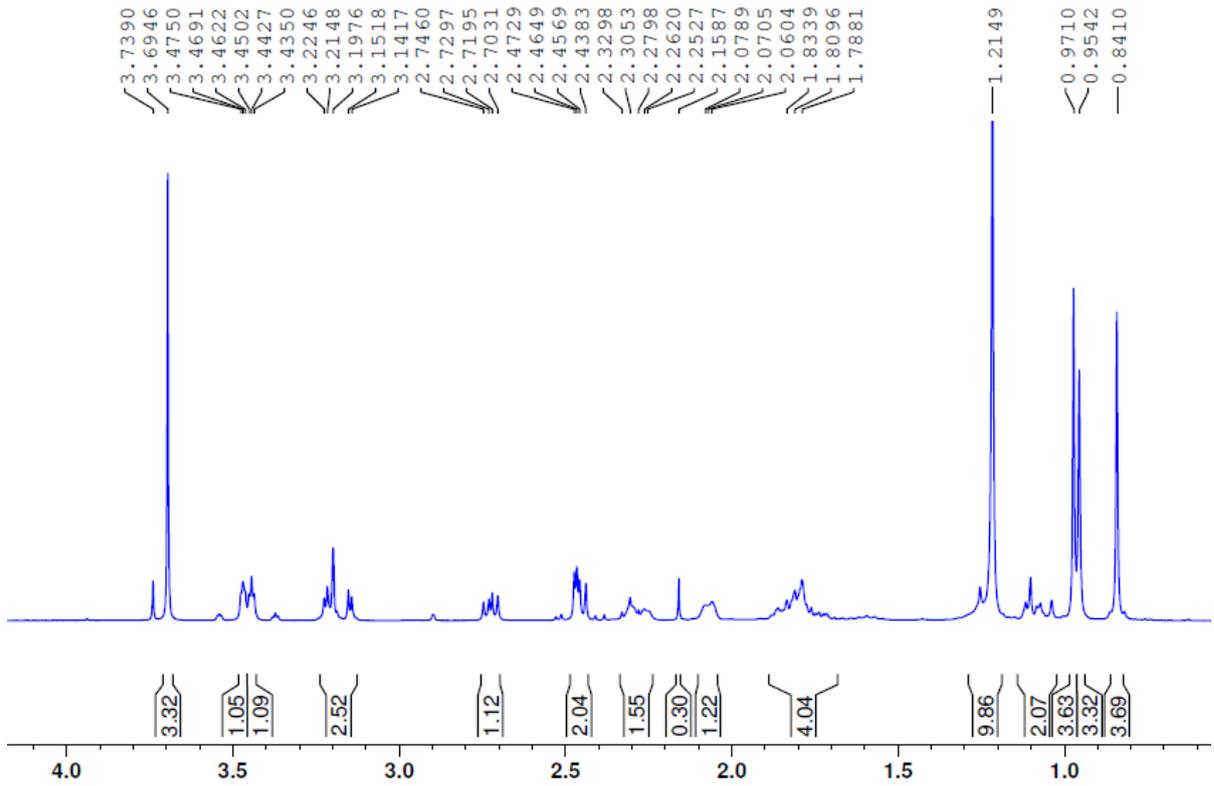


Figura 31. Expansão dos sinais de RMN de ^1H de COH-7 nas regiões de 4,00 a 0,10 ppm

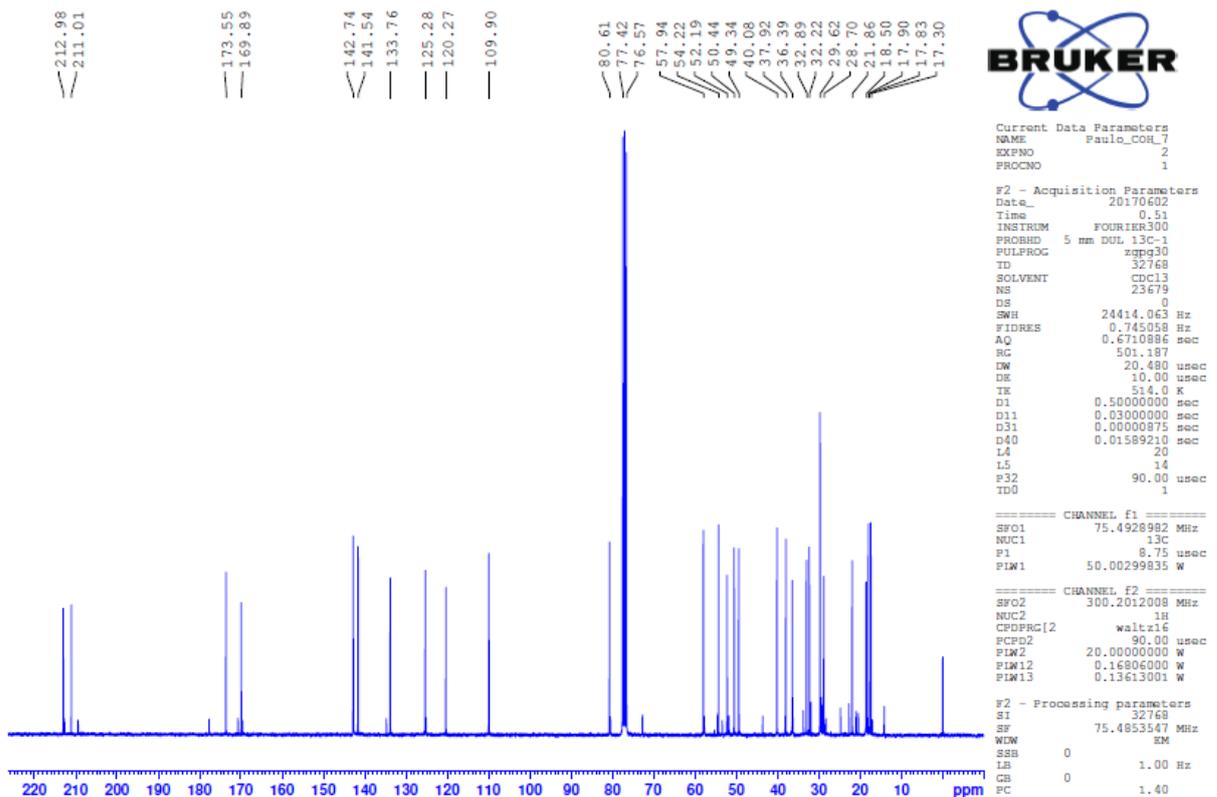


Figura 32. Espectro de RMN ^{13}C de COH-7 (75 MHz, CDCl_3)

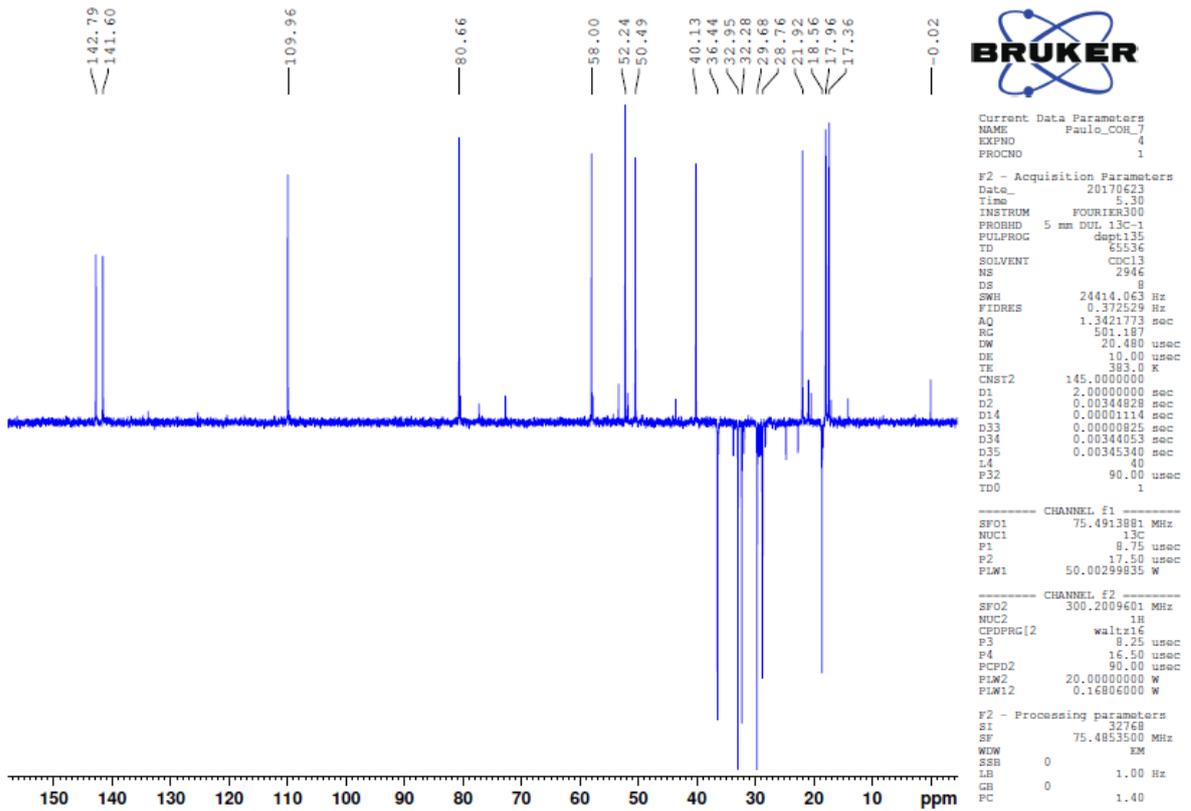


Figura 33. Expansão dos sinais de RMN de ^1H de COH-7 nas regiões de 7,80 a 5,10 ppm

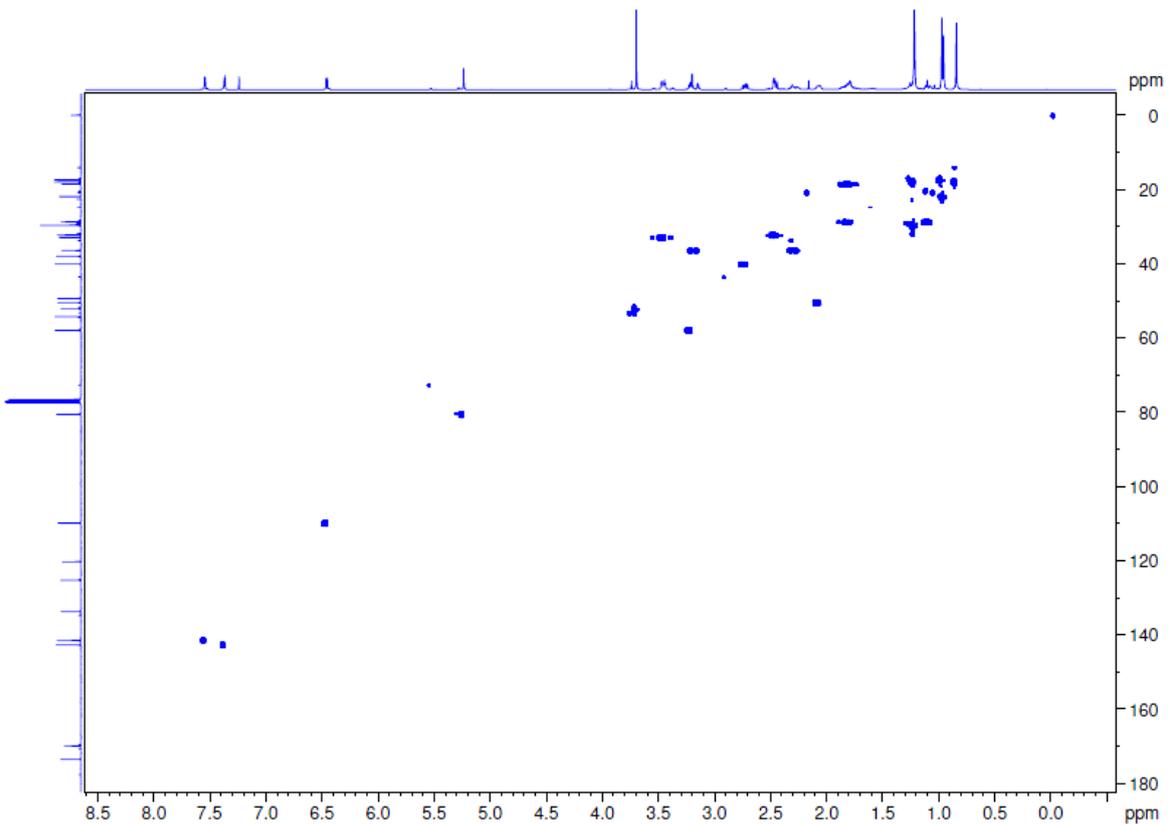


Figura 34. Mapa de contorno HSQC de COH-7 (300/75 MHz, CDCl_3)

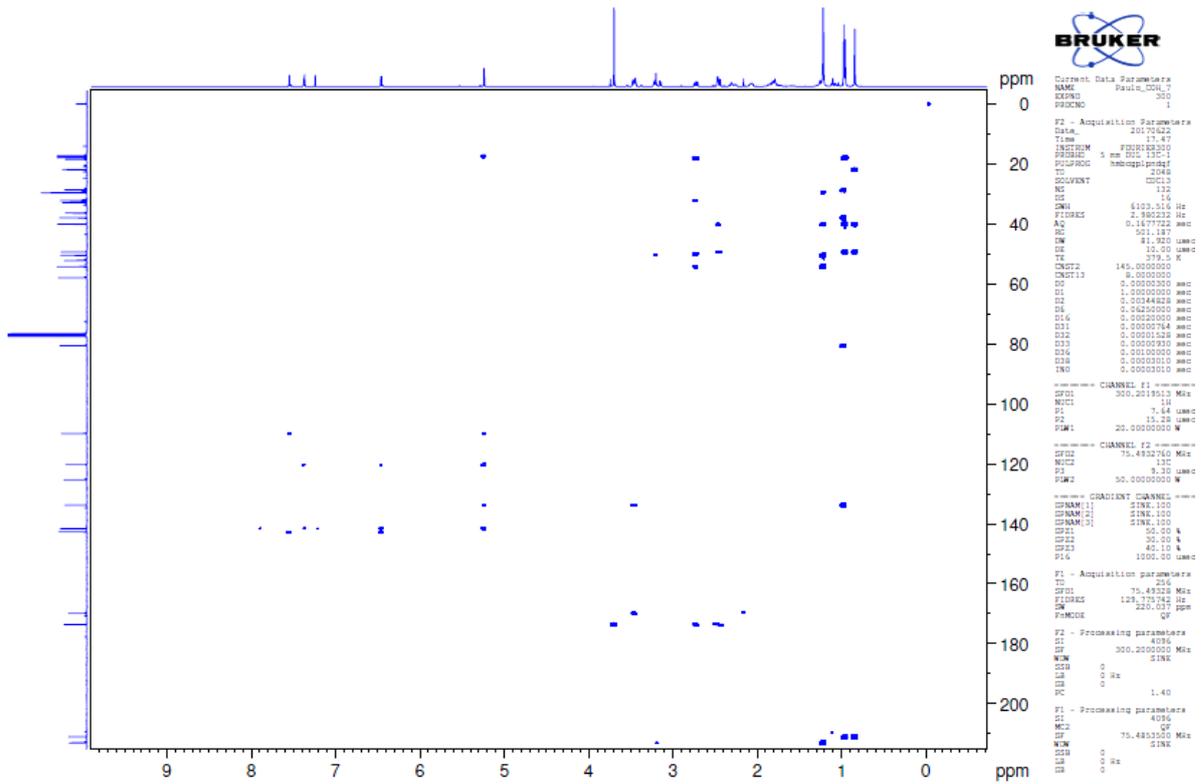


Figura 35. Mapa de contorno HMBC de COH-7 (300/75 MHz, CDCl₃)

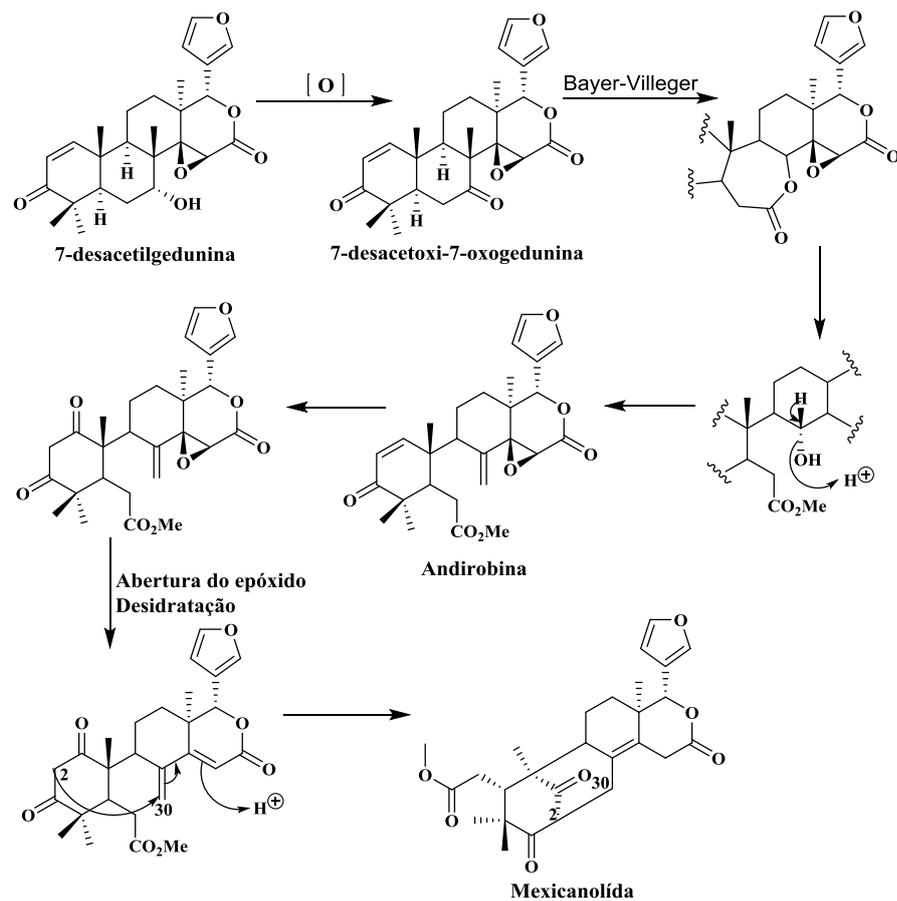


Figura 36 – Proposta da biossíntese do mexicanolída

5.2.5. Identificação COM-16.H.4.6 (substâncias 9)

A substância **9** (fig. 38) sólido branco, apresentou EMAR no modo positivo de ionização o pico $[M+H]^+$ m/z 483,2396 (fig. 39) sugerindo a fórmula molecular $C_{28}H_{34}O_7$.

O espectro de RMN 1H (fig. 40) mostrou os sinais característicos do anel furano em δ 7,41 *d* ($J = 1,4$ Hz; H-21 H-23) e 6,34 *t* ($J = 1,4$ Hz; H-22), além dos sinais de singletos em δ 3,70 *s* (H-15) e 5,56 *s* (H-17) característicos de anel D δ -lactônico. Notou-se ainda a presença de dois dubletos em δ 7,07 e 5,90 *d* ($J = 10,1$ Hz), característicos de uma ligação dupla conjugada a uma carbonila no anel A, os quais foram atribuídos aos hidrogênios olefínicos H-1 e H-2, um duplo dubleto em δ 5,04 *dd* ($J = 10,83$ e $4,56$ Hz; H-7), característico de um hidrogênio acetoximetínico, um singlete em δ 2,14 *s* (OMe) característico de metoxila em grupo acetato confirmados no COSY (fig. 44).

O RMN ^{13}C (fig. 45) mostrou sinais em δ 141,09 (C-21), 143,13 (C-23), 120,21 (C-20) e 109,81 (C-22) característicos do anel furano. Além de sinais em δ 70,50 e 54,08 compatível com um epóxido entre C-14 e C-15 respectivamente. Em δ 156,61 e 126,40 estes sinais foram atribuídos aos C-1 e C-2 respectivamente, que são característicos de carbonos hidrogenados da dupla ligação próxima à carbonila em δ 204,00 (C-3), o que também foi observado através do DEPT 135 (fig. 46). Os dados de RMN 1H e ^{13}C foram similares aos reportados para a gedunina em madeira de *C. odorata* enchetada em *Toona ciliata* var. *australis* (de Paula, et al., 1997)

No HSQC (fig. 47) foi possível observar as correlações entre os sinais em δ 7,41 (H-21 H-23) e 6,34 (H-22) com os sinais em δ 143,13 (C-23), 141,09 (C-21), e 109,81 (C-22), confirmando a presença do anel furano. Também foi mostrado a

correlação entre os sinais δ 5,56 (H-17) e 3,70 (H-15) com os sinais em δ 78,10 (C-17) e 54,08 (15) característicos do anel D δ -lactônico.

No HMBC (fig. 48) pode-se notar a correlação do sinal em δ 5,60 (H-17) com o sinal em δ 69,8 permitiu atribuir este sinal ao C-14, sendo a única posição a 3J possível de ser atribuída. As atribuições dos sinais de H-15 e H-17 e a presença do anel D δ -lactônico com um epóxido entre C-14 e C-15 foram confirmadas através das correlações observadas no HMBC conforme ilustrada na figura 37.

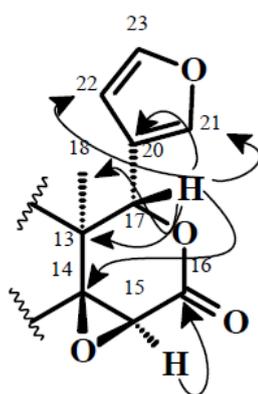


Figura 37 – Proposta de correlações do HMBC do H-15 e H-17

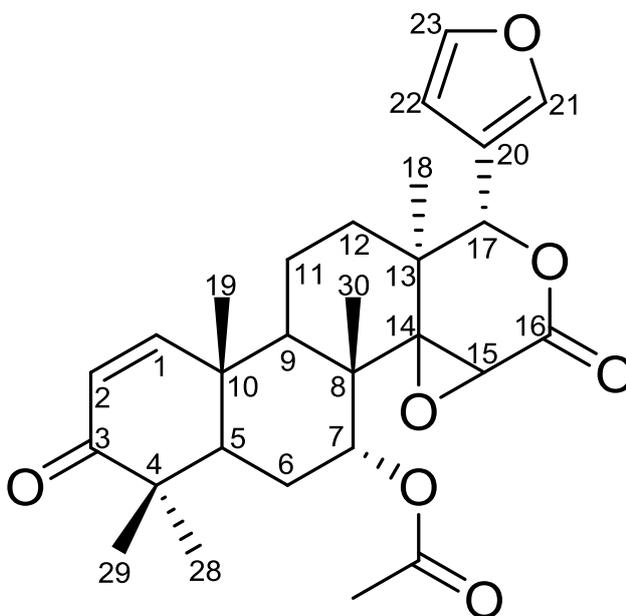


Figura 38 – Estrutura Química da fração COM-16.H.4.6 (gedunina)

Tabela 17. Dados dos RMN de ^1H e ^{13}C da fração COM-16.H.4.6 em CDCl_3

Nº	δ ^1H , <i>mult</i> , (J) Hz	δ ^{13}C	HMBC
1	7,07 d (10,1)	156,61	204,00 (C-3); 45,15 (C-5); 39,64 (C-10)
2	5,90 d (10,1)	126,40	44,63 (C-4); 39,64 (C-10)
3	---	204,00	
4	---	44,63	
5	2,02 s	45,15	
6	1,97 m	25,57	39,64 (C-10)
7	5,04 dd (10,83 e 4,56)	77,90	14,08 (C-30)
8	---	43,95	
9	1,25 s	29,70	78,10 (C-17); 70,50 (C-14); 39,02 (C-13); 29,25 (C-12)
10	---	39,64	
11	1,95 m	16,70	78,10 (C-17); 20,00 (C-18)
12	185 m	29,25	78,10 (C-17); 70,50 (C-14)
13	---	39,02	
14	---	70,50	
15	3,70 s	54,08	167,25 (C-16); 70,50 (C-14)
16	---	167,25	
17	5,56 s	78,10	141,09 (C-21); 120,21 (C-20); 109,81 (C-22); 70,50 (C-14); 39,02 (C-13); 20,00 (C-18)
18	1,25 s	20,00	78,10 (C-17); 70,50 (C-14); 39,02 (C-13); 29,25 (C-12)
19	1,20 s	20,00	156,61 (C-1); 45,15 (C-5); 39,64 (C-10)
20	---	120,21	
21	7,41 d (1,4)	141,09	143,13 (C-23); 141,09 (C-21); 120,21 (C-20); 109,81 (C-22)
22	6,34 t (1,4)	109,81	143,13 (C-23); 141,09 (C-21); 120,21 (C-20)
23	7,41 d (1,4)	143,13	143,13 (C-23); 141,09 (C-21); 120,21 (C-20); 109,81 (C-22)
28	1,16	27,55	21,10 (C29); 44,63 (C4); 45,15 (C5); 204,00 (C3)
29	1,09	21,10	27,55 (C28); 44,63 (C4); 45,15 (C5); 204,00 (C3)
30	1,14	14,08	70,50 (C14); 77,90 (C7)
<u>OC</u> OMe	---	170,35	
OC <u>Me</u>	2,14 s	21, 44	170,35 (<u>OC</u> OMe)

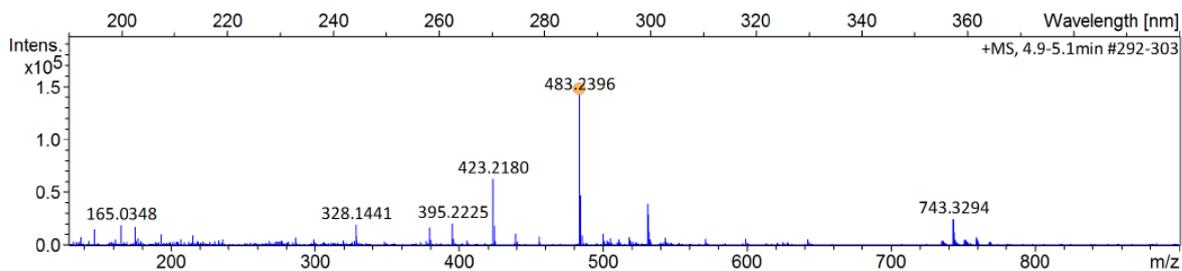


Figura 39 – Espectrometria de Massas de Alta Resolução de COM-16.H.4.6

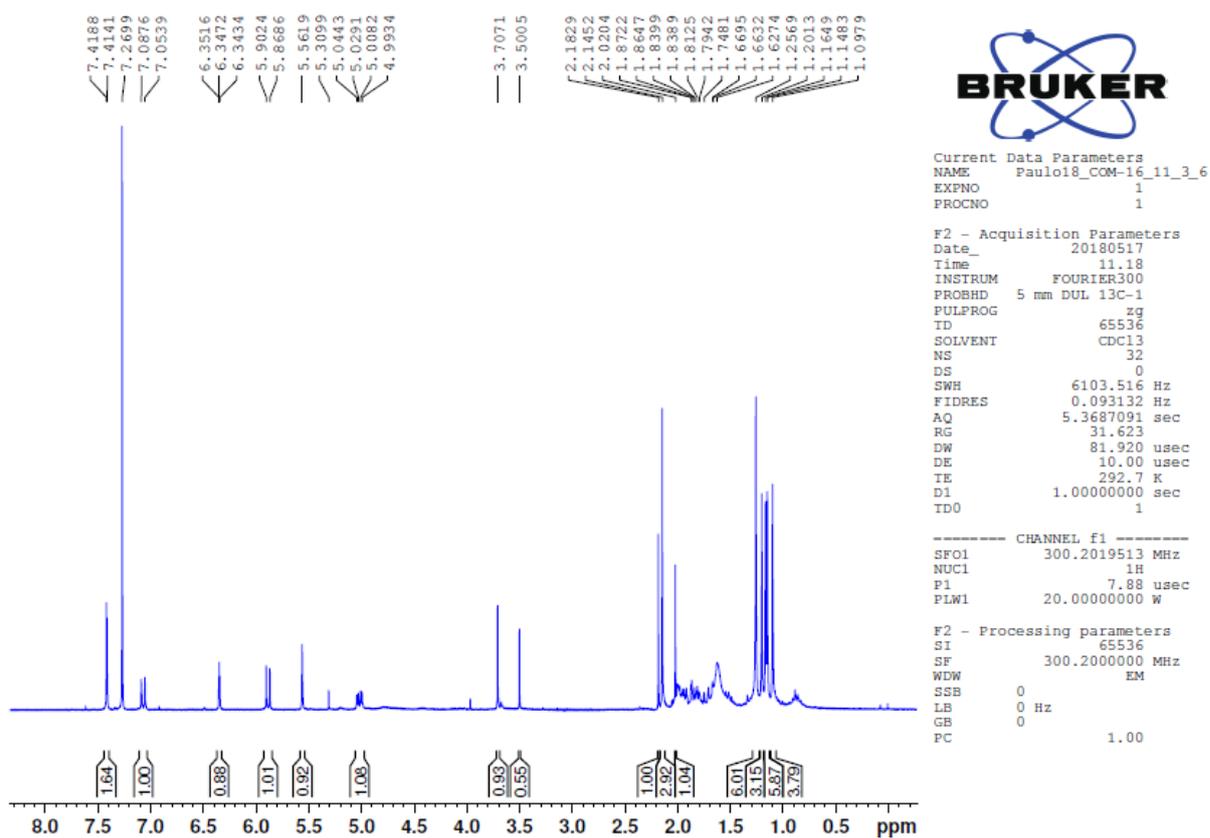


Figura 40. Espectro de RMN ¹H de COM-16.H.4.6 (300 MHz, CDCl₃)

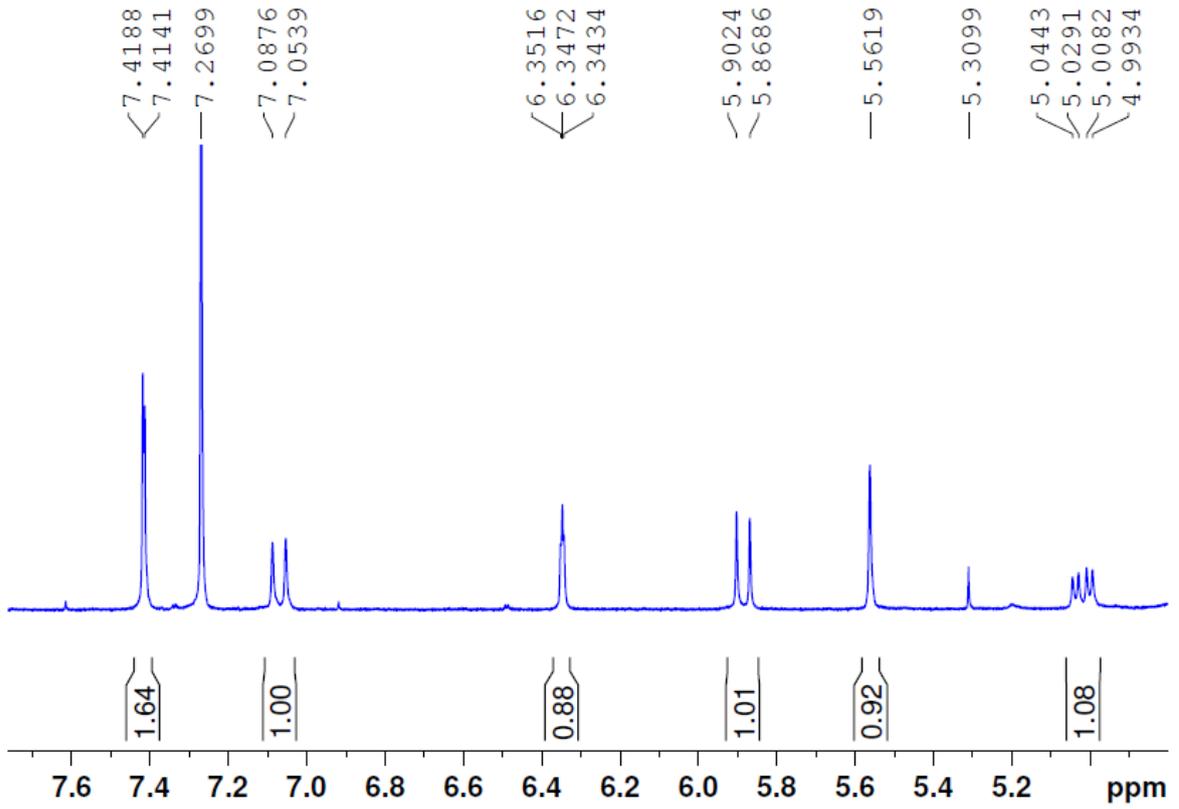


Figura 41. Expansão dos sinais de ^1H de COM-16.H.4.6, regiões de 7,70 a 5,10 ppm

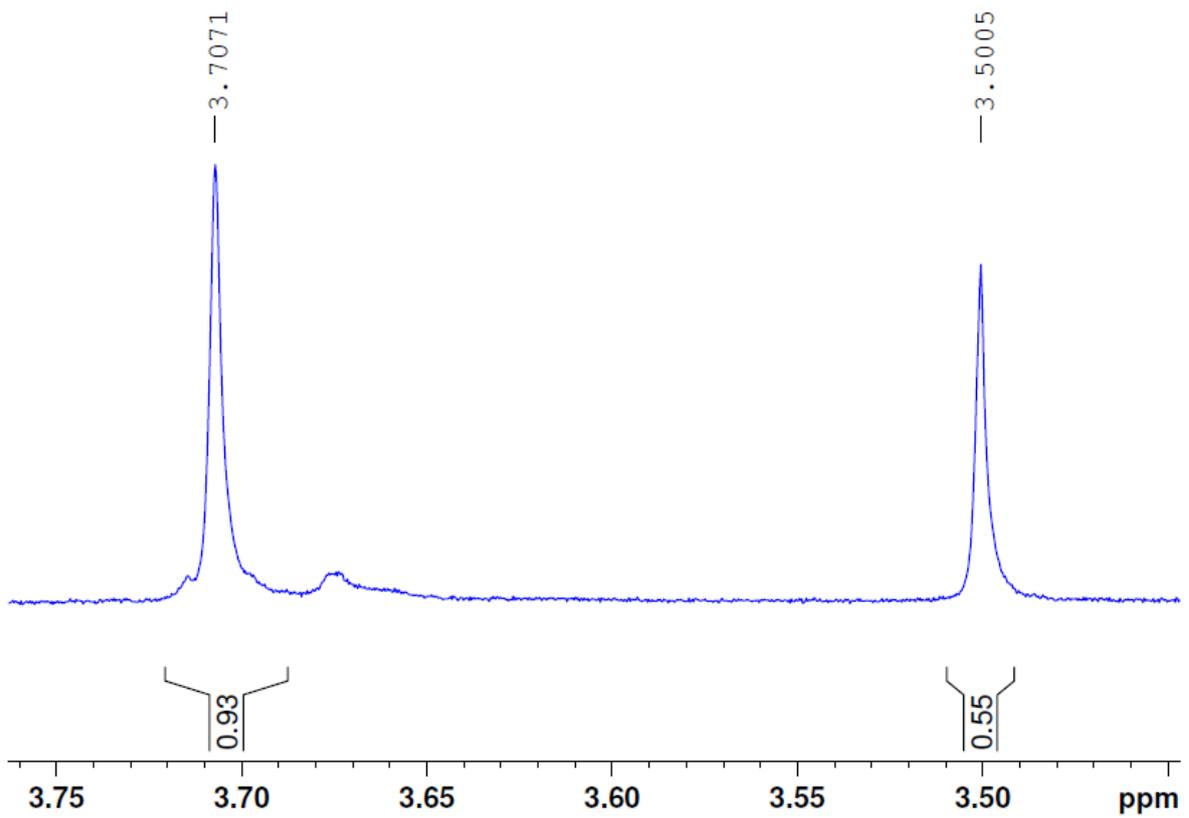


Figura 42. Expansão dos sinais de RMN ^1H de COM-16.H.4.6, regiões de 3,75 a 3,45 ppm

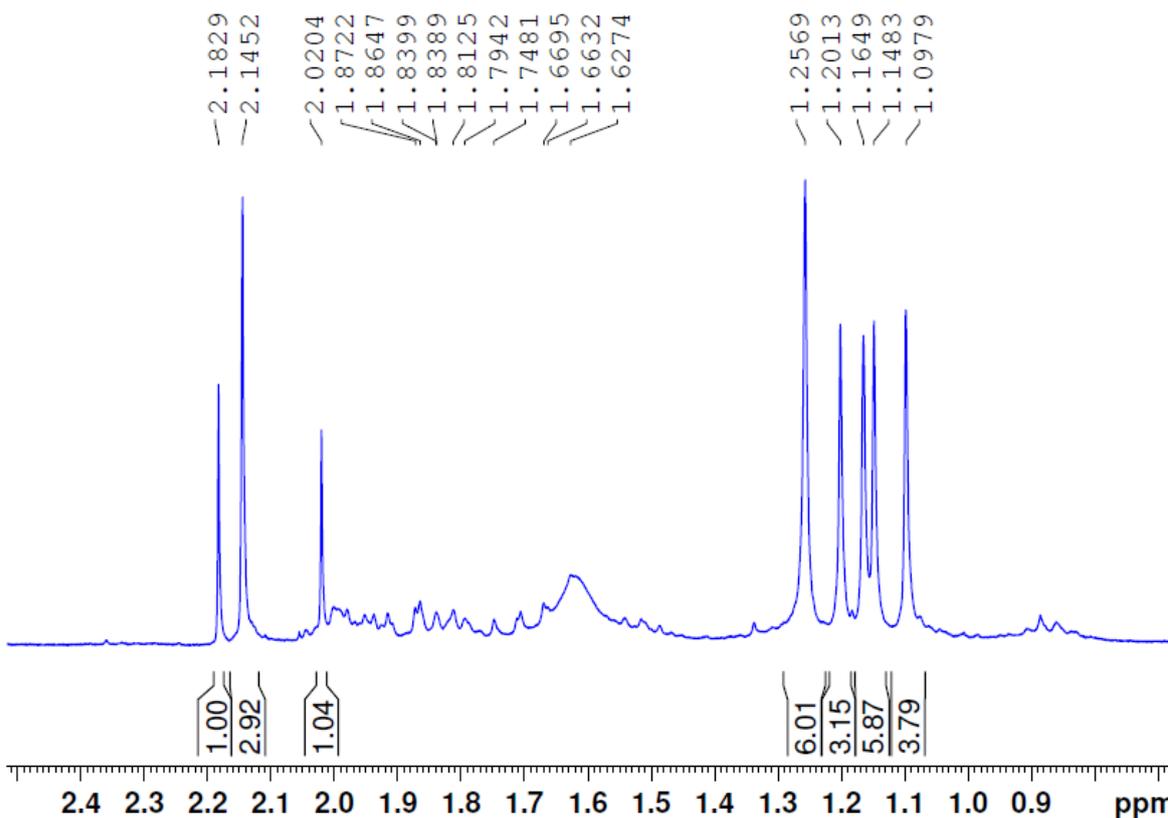


Figura 43. Expansão dos sinais de RMN ^1H de COM-16.H.4.6, regiões de 2,50 a 0,80 ppm

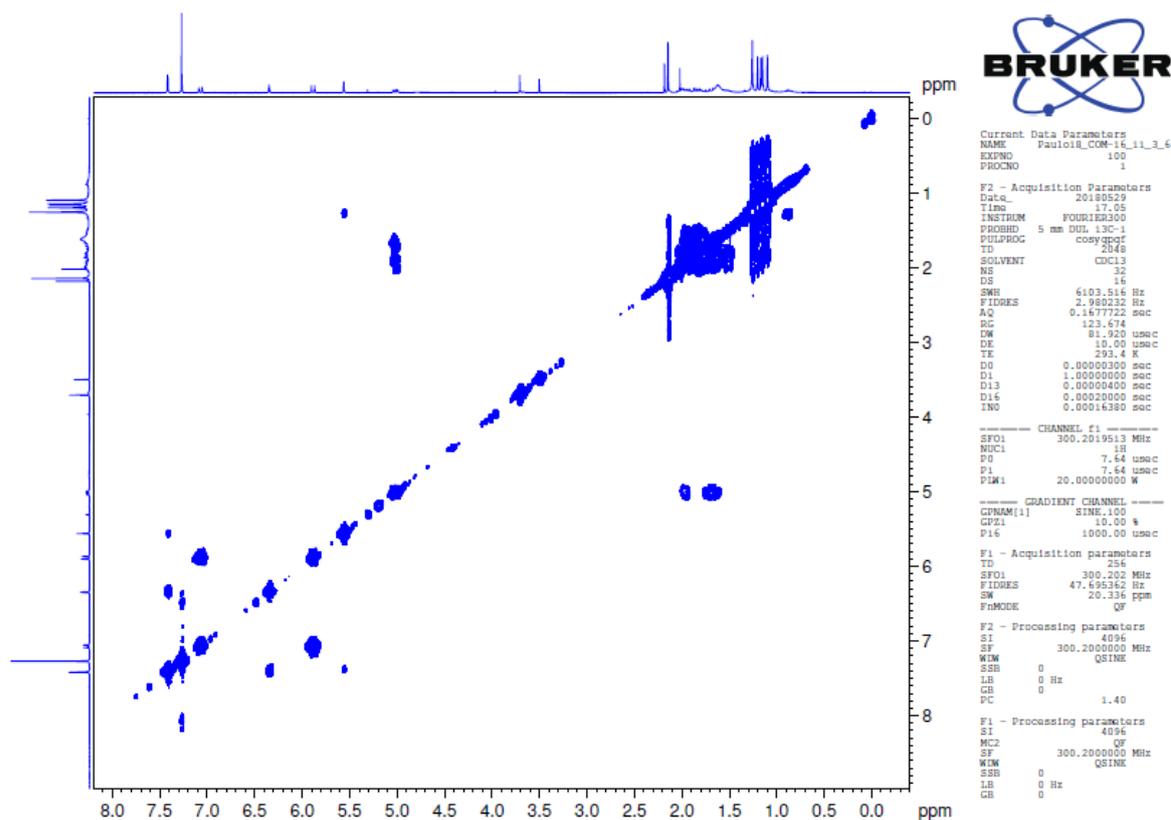


Figura 44 – COSY de COM-16.H.4.6 (75 MHz, CDCl_3)

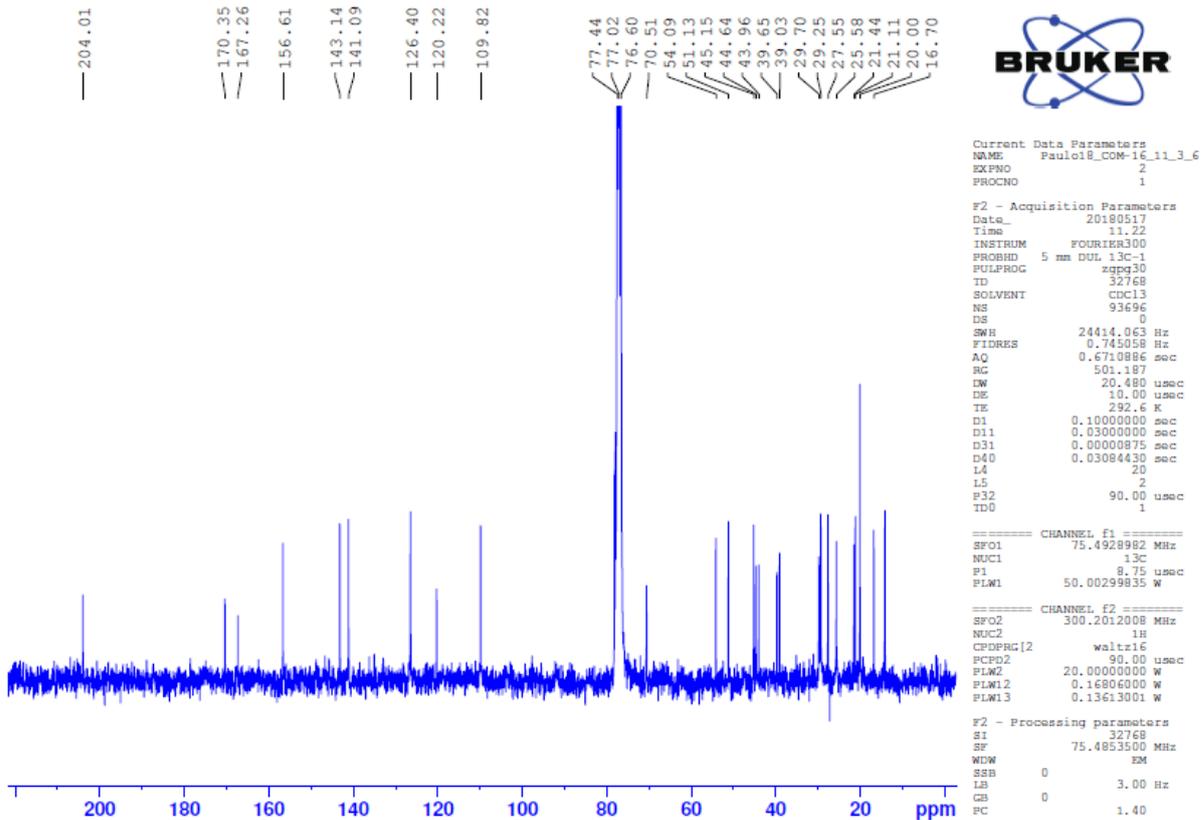


Figura 45. Espectro de RMN ^{13}C de COM-16.H.4.6 (75 MHz, CDCl_3)

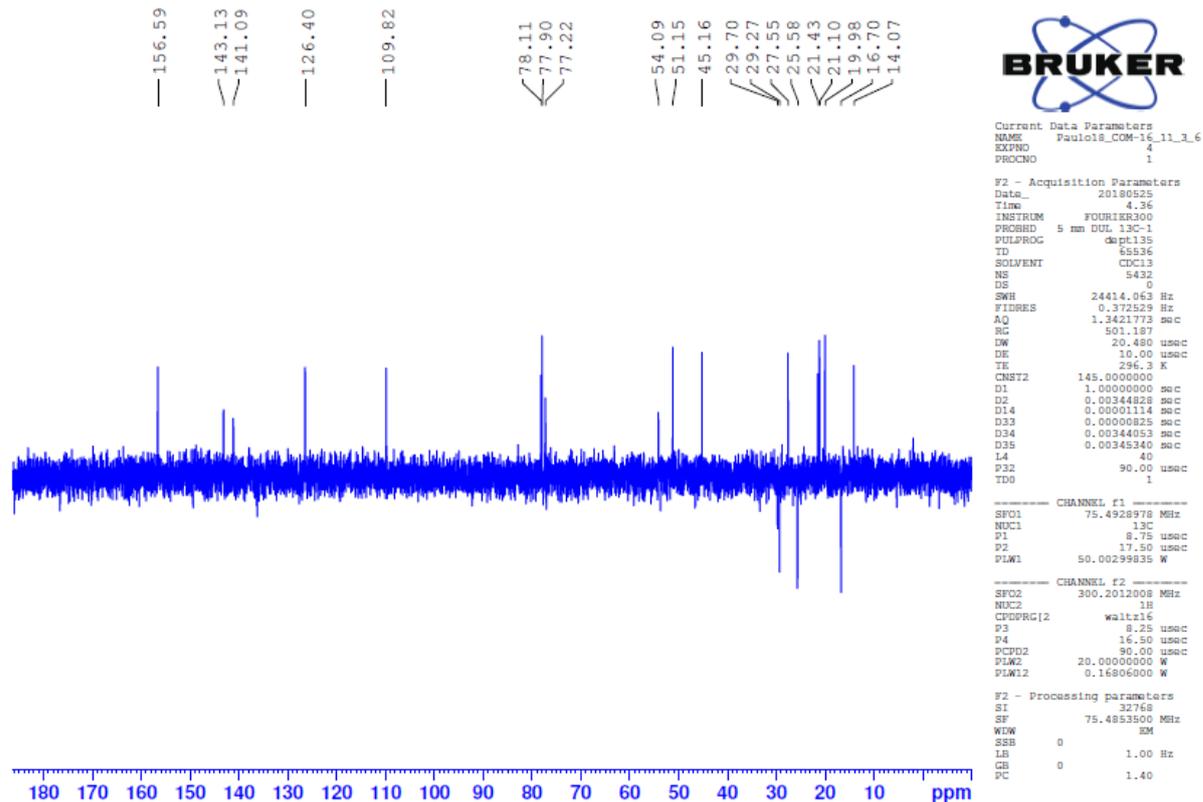


Figura 46. DEPT 135 de COM-16.H.4.6 (75 MHz, CDCl_3)

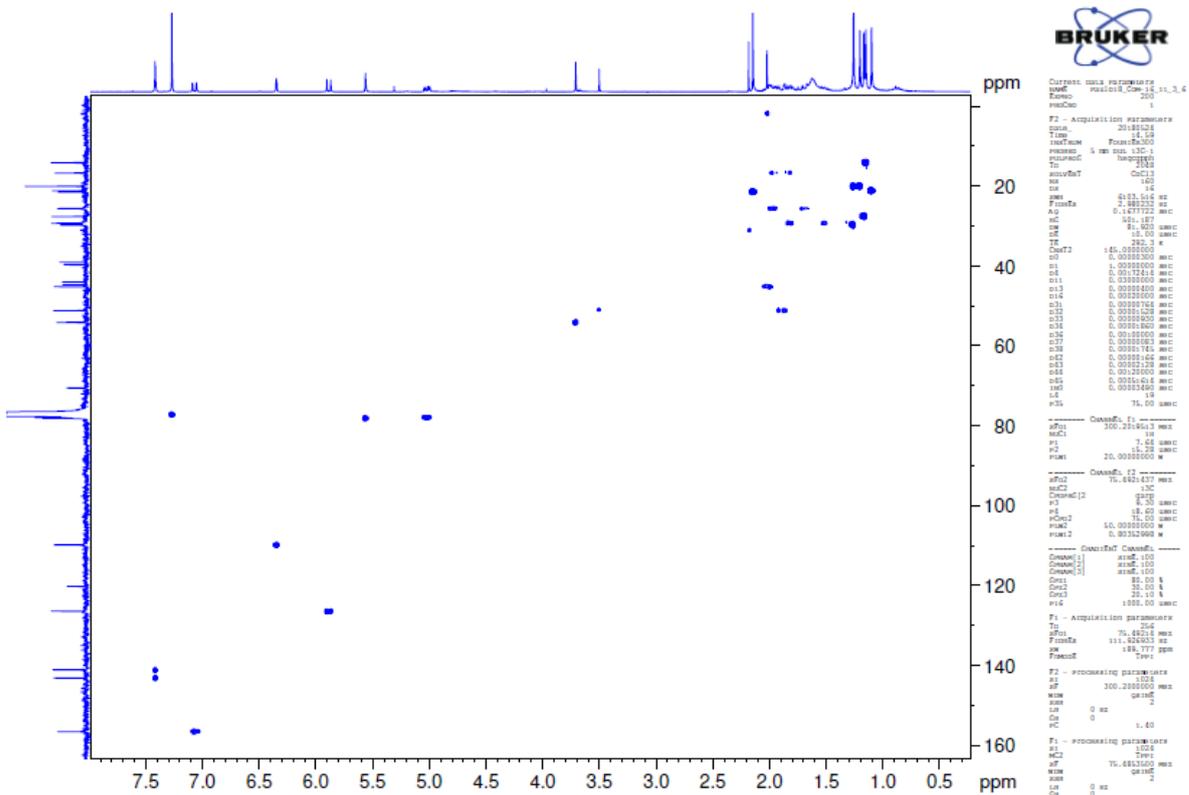


Figura 47. Mapa de contorno HSQC de COM-16.H.4.6 (300/75 MHz, CDCl₃)

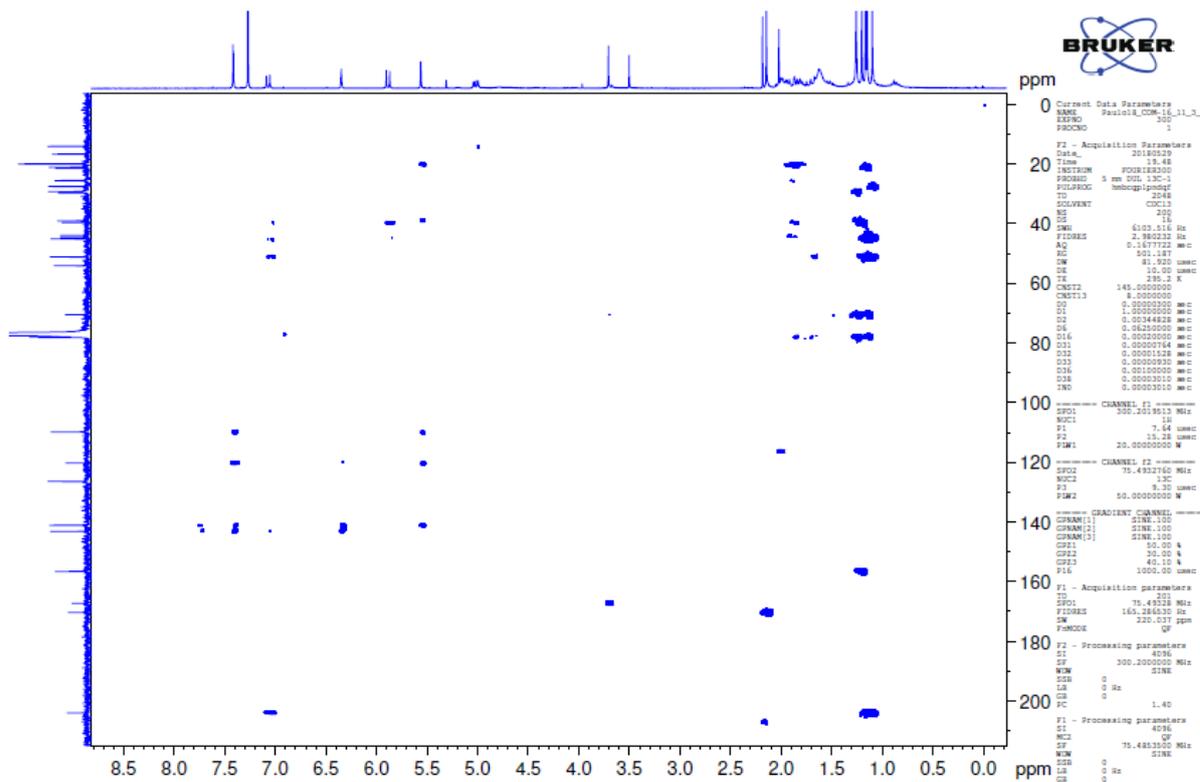


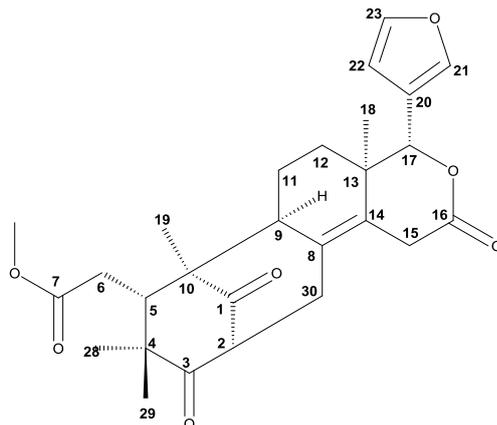
Figura 48. Mapa de contorno HMBC de COM-16.H.4.6 (300/75 MHz, CDCl₃)

5. 3. Atividade antifúngica da substancia 8 (mexicanolída)

Tabela 18. Resultados da CIM das substâncias sobre as cepas de fungos

Substância	CIM (µg/ml)		
	<i>Candida albicans</i>	<i>Cryptococcus gattii</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
mexicanolída	>320	320	160
Anfotericina B	<160	<160	<160

Nesta etapa realizou-se o teste de sensibilidade antifúngica pela técnica de microdiluição em caldo, para avaliar a atividade antifúngica da substância 8 (tabela 18), e encontrar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) da substância frente às linhagens de *Candida albicans* (ATCC 13803), *Cryptococcus gattii* (VGII WM 178/08) *Cryptococcus neoformans* (VNI WM 148/08). Em hospitais terciários, o gênero *Candida* responde por cerca de 80% das infecções fúngicas documentadas, representando um grande desafio aos clínicos de diferentes especialidades devido às dificuldades diagnósticas e terapêuticas das infecções causadas por tais agentes (BANERJEE et al., 1991) O fungo *C. neoformans*, um dos principais agentes etiológicos da criptococose, tem distribuição mundial e seu habitat natural são as excretas de aves, especialmente de *Columba livia* (pombos domésticos) (FARIA et al., 2010; LIMA et al., 2015). Por outro lado, *C. gattii* ocorre em regiões tropicais e subtropicais, e tem como habitat natural os eucaliptos e material vegetal em decomposição (ELLIS e PFEIFFER, 1990; BALTAZAR et al., 2008).



(8)
mexicanolída

Os resultados encontrados para os testes *in vitro* do limonóide mexicanolída provenientes dos resíduos de madeiros de *C. odorata* provenientes de demolição frente às diferentes linhagens de fungos. Os resultados demonstram que o mexicanolída na concentração de 320 µg/ml não apresentou nenhuma redução no crescimento das cepas de *C. albicans* e *C. gattii*. Porém para os testes com as cepas de *C. neoformans*, o limonóide mexicanolída apresentou 100% de atividade inibitória, tendo sua CIM observada em 160 µg/ml, esse tipo atividade foi observada em outros limonoides de tipo mexicanolídeo, tendo sido relatadas pelo potencial antifúngico (GOVINDACHARI et al., 1999). No entanto esse é o primeiro relato de atividade antifúngica, contra *C. neoformans*, observado para mexicanolída.

6. CONCLUSÕES

Na investigação fitoquímica em resíduos madeireiros de *Cedrela odorata* L. de demolição foi possível purificar e identificar: o sesquiterpeno cadaleno (1) e os limonoides mexicanolída (8) e gedunina (9). Outras substâncias foram identificadas

em misturas: os triperenos cicloeucalenona (2), α e β -amirenona (3 e 4) e o acetato de butirospermol (5), além dos esteroides β -sitosterol (6) e estigmasterol (7).

Ao comparar as substâncias identificadas neste trabalho, em *Cedrela odorata* L., foi possível observar que boa parte delas já haviam sido relatadas em estudos anteriores realizados com a mesma espécie, observou-se ainda que essas substâncias foram preservadas ao longo do tempo de exposição aos intemperes, tempo esse em que a madeira serviu de matéria-prima para a construção civil onde esteve empregada por mais de 40 anos. Além disso, puderam ser identificadas substâncias que ainda não haviam sido relatadas anteriormente para essa espécie.

Ao realizar testes antifúngicos com o limonóide mexicanolída, cepas de *C. albicans*, *C. neoformans* e *C. gattii*, observou-se que o mesmo apresentou resultado significativo na redução do crescimento das cepas de *C. neoformans*. Vale ressaltar que os testes foram realizados apenas com a substância 8 devido ao seu rendimento ter sido elevado, isso quando comparado com as demais substâncias identificadas neste trabalho.

Essa investigação pôde de ampliar o conhecimento fitoquímico dos resíduos madeireiros de espécies amazônicas, pois além de demonstrar que os metabolitos secundários são preservados ao longo do tempo, pôde-se notar que esses resíduos provenientes de demolição são fonte seguras para o aprofundamento dos estudos fitoquímicos de espécies da flora amazônica, uma vez que não necessita de novas extrações *in vivo*, tornando-se uma alternativa para futuras pesquisas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELGALEIL, S.; OKAMURA, H.; IWAGAWA, T., SATO, A.; MIYAHARA, I.; DOE, M.; NAKATINI, M. 2001. Khayanolides, rearranged phragmalin limonoid antifeedants from *Khaya senegalensis*. Tetrahedron, Oxford, v. 57, p. 119-126.

ABREU, L. B.; MENDES, L. M.; SILVA, J. R. M. 2009. Aproveitamento de resíduos de painéis de madeira gerados pela indústria moveleira na produção de pequenos objetos. Revista Árvore, 33: 171-177.

ANAYA, A. L.; RUBALCAVA, M.M.; ORTEGA, R.C.; SANTANA, C.G.; MONTEERRUBIO, P.N.S.; BAUTISTA, B.E.H.; RACHEL, M.R. 2005. Allelochemicals from *Stauranthus perforatus*, a Rutaceous tree of the Yucatan Peninsula, Mexico. Phytochemistry, 66: 487-494.

APG (Angiosperm Phylogeny Group). Disponível em: <<http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>>. Acesso em 18 jul 2018.

ARNASON, J.T.; MACKINNON, S.; DURST, A.; PHILOGENE, B.J.R.; HASBUN, C.; SANCHEZ, P.; POVEDA, L.; SAN ROMAN, L.; ISMAN, M.B.; SATASOOK, C.; TOWERS, G.H.N.; WIRIYACHITRA, P. AND MCLAUGHLIN, J.L. 1993. Insecticides in tropical plants with non-neurotoxic modes of action. In: K. R. Downum et al. (eds.), Phytochemical Potential of Tropical Plants. ©Springer Science Business. Media, New York.

BALTAZAR, L.M.; RIBEIRO, M.A. Primeiro isolamento ambiental de *Cryptococcus gattii* no Estado do Espírito Santo. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v.41, n.5, p.449- 453, 2008.

BANERJEE, S.N; EMORI, T.G; CULVER, D.H; GAYNES, R.P; JARVIS, W.R; HORAN, T; EDWARDS, J.R; TOLSON, J; HENDERSON, T; MARTONE, W.J. 1991. Secular trends in nosocomial primary bloodstream infections in the United States, 1980-1989. National Nosocomial Infections Surveillance System. American Journal of Medicine 91: 86-89.

BARBOSA, A. P.; VIANEZ, B. F.; VAREJÃO, M. J.; ABREU, R. L. S. 2001. Considerações sobre o perfil tecnológico do setor madeireiro na Amazônia Central. Parcerias estratégicas, 12: 42-61.

BEVAN, C.W.L.; REES, A.H.; TAYLOR, D.A.H. 1963. West African timbers part VI. Petroleum extracts from species of the genera *Khaya*, *Guarea*, *Carapa* and *Cedrela*. Journal of the Chemical Society. 6: 980-984.

BEVAN, C.W.L.; POWELL, J.W. AND TAYLOR, D.A.H. 1965. West African Timbers. Part X The Structure of *Cedrela odorata* Substance B. Journal of the Chemical Society. 6: 980-984.

BOGORNI, P.C. & VENDRAMIM, J.D. 2005. Efeito subletal de extratos aquosos de *Trichilia* spp. sobre o desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em milho. Neotrop. Entomol. 34: 311-317.

BRAY, D. H., WARHURST, D. C., CONNOLLY, J. D., O'NEILL, M. J., & PHILLIPSON, J. D. 1990. Plants as sources of antimalarial drugs. Part 7. Activity of some species of meliaceae plants and their constituent limonoids. Phytotherapy Research, 4(1): 29–35.

BRAZ-FILHO, R. 2010. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. Química Nova, 33: 229-239.

BURKE, B.A.; CHAN, W.R.; MAGNUS, K.E.; TAYLOR, D.R. 1969. Extractives of *Cedrela odorata* L. III. The structure of photogedunin. Tetrahedron. 25: 5007-5011.

CAMPOS, A.M.; OLIVEIRA, F.S.; IRACEMA, M.; MACHADO, L.; BRAZ-FILHO, R.; MATOS, F.J.A. 1991. Triterpenes from *Cedrela odorata*. Phytochemistry, Vol. 30, No. 4. pp 1225-1229.

CARDOSO, C. C.; MOUTINHO, V. H. P.; MELO, L. O.; SOUSA, L. K. V. S.; SOUZA, M. R. 2012. Caracterização físico-mecânica de madeiras amazônicas com aptidão tecnológica para comercialização. *Revista de Ciências Agrárias*, 55 (3): 176-183.

CARVALHO, P. E. R. 2003. Espécies arbóreas brasileiras. EMBRAPA, v.1, p. 877-881.

CAZAL, C.M.; CHOOSANG, K.; SEVERINO, V.G.P.; SOARES, M.S.; SARRIA, A.L.F.; FERNANDES, J.B.; SILVA, M.F.G.F.; VIEIRA, P.C.; PAKKONG, P.; ALMEIDA, G.M.; VASCONCELOS, M.H.; NASCIMENTO, M.S.J. E PINTO, M.M.M. 2010. Evaluation of Effect of Triterpenes and Limonoids on Cell Growth, Cell Cycle and Apoptosis in Human Tumor Cell Lines. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 10, 769-776.

CERQUEIRA, P.H.A., VIEIRA, G.C., BARBARENA, L.C.M., FREITAS, L.C. 2012. Análise dos resíduos madeireiros gerados pelas serrarias do município de Eunápolis-BA. *Floresta e Ambiente*, 19: 506-510.

CÉSPEDES, C.L.; CALDERÓN, J.S.; LINA, L. AND ARANDA, E. 2000. Growth Inhibitory Effects on Fall Armyworm *Spodoptera frugiperda* of Some Limonoids Isolated from *Cedrela* spp. (Meliaceae). *J. Agric. Food Chem.*, 48 (5):

CHAMPAGNE, D.; KOOL, O.; ISMAN, M.B.; SCUDDER, G.G.E.; TOWERS, G.H.N. 1992. Biological activity of limonoids from the Rutales. *Phytochemistry*. 31 (20): 377-394.

CHAN, W.R.; MAGNUS, K. E. AND MOOTOO B. S. 1967. Extractives from *Cedrela odorata* L. The Structure of Methyl Angolensate. *J. Chem. Soc. (C)*.

CHAN, W.R.; HOLDER, N. L. AND TAYLOR, D. R. 1968. Extractives of *Cedrela odorata* L. Part II The Structures of the *Cedrela* Tetracyclic Triterpenes, Odoranol, Iso-odoranol, and Odoratonen. J. Chem. SOC. (C).

CRONQUIST, A. 1988. The evolution and classification of flowering plants. Lawrence, Printed by Allen Press, Inc., 555p.

DE-PAULA, J.; VIEIRA, I.; DA-SILVA, M.; RODRIGUES, F.; FERNANDES, J.; VIEIRA, P.; PINHEIRO, A.; VILELA, E. 1997. Sesquiterpenes, triterpenoids, limonoids and flavonoids of *Cedrela odorata* graft and speculations on the induced resistance against *Hypsipyla grandella*. *Phytochemistry*. 44 (8):1449-1454.

DE-SOUZA, P. R. T.; DE-PAULA, V. F.; CORREIA, S. DE J.; DO-NASCIMENTO, J. C. Terpenos das folhas de *Trichilia silvatica* (Meliaceae). Resumo, 32a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. 2009.

ELLIS, D.H.; PFEIFFER, T.J. 1990. Natural Habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. *Journal of Clinical Microbiology*, 28 (7): 1642-1644.

ENGELMEIER, D.; HADACEK, F.; PACHER, T.; VAJRODAYA, S.; GREGER, H. 2000. Cyclopenta [b] benzofurans from *Aglaia* species with pronounced antifungal activity against rice blast fungus (*Pyricularia grisea*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Easton, 48: 1400-1404.

FARIA, R.O.; NASCENTE, P.S.; MEINERZ, A.R.M.; CLEFF, M.B.; ANTUNES, T.A.; SILVEIRA, É.S.; NOBRE, M.O.; MEIRELES, M.C.A.; MELLO, J.R.B. 2010. Ocorrência de *Cryptococcus neoformans* em excretas de pombos na Cidade de Pelotas, Estado do Rio Grande do Sul. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 43 (2): 198-200.

FEIST W.C. E HON D.N.S. 1984. Chemistry of weathering and protection. In: Rowell R, editor. *The chemistry of solid wood*. Washington, DC: American Chemical Society. 402p.

GONZÁLEZ-COLOMA, A.; REINA, M.; SÁENZ, C.; LACRET, R.; RUIZ-MESIA, L.; ARÁN, V.J.; SANZ, J; MARTÍNEZ-DÍAZET, R.A. 2012. Antileishmanial, antitrypanosomal, and cytotoxic screening of ethnopharmacologically selected Peruvian plants. *Parasitology Research*, 110: 1381.

GOVINDACHARI, T. R. & KUMARI, G. N. K. "Tetranortriterpenoids from *Khaya senegalensis*". *Phytochemistry* 47 (7), 1423-1425, 1998.

GOVINDACHARI, T. T.; SURESH, G.; BANUMATHY, B.; MASILALAMI, S.; GOPALAKRISHNAM, G.; KRISHNA, K.G.N. 1999. Antifungal activity of some B,D-seco limonoids from two meliaceous plants. *Journal of Chemical Ecology*, New York, v. 25, p. 923-933.

GRANATO, D.; NUNES, D.S.; MATTOS, P.P.; RIOS, E.M.; GLINSKI, A.; RODRIGUES, L.C.; JÚNIOR, G.Z. 2005. Chemical and biological evaluation of rejects from the wood industry. *Brazilian archives of biology and technology*, 48: 237-241.

GREGGER, H.; PACHER, T.; BREM, B.; BACHER, M.; HOFER, O. 2001. Insecticidal flavaglines and other compounds from Fijian *Aglaia* species. *Phytochemistry*, Oxford, v. 57, p. 57-64.

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

HORTA, M.K.S., LIMA, M.P., NASCIMENTO, C.C., FERREIRA, A.G. 2010. Investigação dos constituintes químicos de serragens descartadas pelo setor madeireiro. In: XIX Jornada de Iniciação Científica do INPA. Manaus, AM. 2010 v, CDROOM p, 4p.

KAMATH, S.G.; CHEN, N; XIONG, Y; WENHAM, R; APTE, S; HUMPHREY, M; CRAGUN, J; LANCASTER, J.M. 2009. Gedunin, a Novel Natural Substance, Inhibits Ovarian Cancer Cell Proliferation. *International Journal of Gynecological Cancer*, 19: 1564-1569.

KANDASAMY, S.; BAGGU, C.; JAVAGAL, M.R.; LINGAMALLU, J.R.; YENAMANDRA, V.; ARADHYA, S.M. 2014. Antioxidant Properties of Isolated Compounds from Banana Rhizome. *Journal of Food Science* Vol. 79, Nr. 5.

KANDASAMY, S.; RAMU, S.; ARADHYA, S.M. 2015. In vitro functional properties of crude extracts and isolated compounds from banana pseudostem and rhizome. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 96, 4, 1347-1355.

KEAY, R. W. J. 1996. The future of the genus *Swietenia* in its native forest. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 122: 3–7.

KLEIN, R. M., 1984, Meliaceae. In: R. Reitz (ed.), *Flora Ilustrada Catarinense – I Parte*. R. Reitz ed. Itajaí, 138p, 1984.

KLOCK, U.; MUÑIZ, G.I.B.; HERNANDEZ, J.A.; ANDRADE. A.S. 2005. Química da madeira. Curitiba, PR: Universidade Federal do Paraná. 22p.

KONGKATHIP, N.; DHUMMA-UPAKORN, P.; KONGKATHIP, B.; CHAWANANORASET, K.; SANGCHOMKAEAO, P.; HATTHAKITPANICHAKUL, S. Study on cardiac contractility of cycloeucalenol and cycloeucalenone isolated from *Tinospora crispa*. *Journal of Ethnopharmacology* 83 (2002) 95-99

KUMAR, S.; GOPAL, K. S. 1999. Screening of plant species for inhibition of bacterial population of raw water. *Journal of Environmental Science and Health*, New York, v. 34, p. 975-987.

LAKSHMI, V.; SRIVASTAVA, S.; MISHRA, S.K.; DHARMANI, P.; MISHRA, V.; PALIT, G. 2010. Gedunin and Photogedunin of *Xylocarpus granatum* show significant anti-secretory effects and protect the gastric mucosa of peptic ulcer in rats. *Phytomedicine*, 17: 569–574.

LAKSHMI, V.; SRIVASTAVA, S.; MISHRA, S.K.; SRIVASTAVA, M.N.; SRIVASTAVA, K. E PURI, S.K. 2012. Antimalarial activity in *Xylocarpus granatum* (Koen), Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters, 26:11, 1012-1015.

LAURANCE, W. F. 1999. Reflections on the tropical deforestation crisis. Biological Conservation 91: 109–117.

LEITE, A.C.; AMBROZIN, A.R.P.; FERNANDES, J.B.; VIEIRA, P.C.; OLIVA, G.; DA-SILVA, M.F.G.F.; ALBUQUERQUE, S. 2008. Trypanocidal Activity of Limonoids and Triterpenes from *Cedrela fissilis*. Planta Med. 74: 1795–1799.

LEITE, A.C.; AMBROZIN, A.R.P.; CASTILHO, M.S.; VIEIRA, P.C.; FERNANDES, J.B.; OLIVA, G.; DA-SILVA, M.F.G.F.; THIEMANN, O.H.; LIMA, M.I.S.; PIRANI, J.R. Screening of *T. cruzi* glycosomal glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase enzyme inhibitors. Brazilian Journal of Pharmacognosy. 19(1A): 1-6, Jan./Mar. 2009.

LEITE, A.C.; PLACERES-NETO, A; AMBROZIN, A.R.P. 2010. Trypanocidal activity of flavonoids and limonoids isolated from Myrsinaceae and Meliaceae active plant extracts. Brazilian Journal of Pharmacognosy. 20(1): 1-6.

LIMA, C.T.; KLAFKE, G.B.; XAVIER M.O. 2015. *Cryptococcus* spp. in excreta of *Columba livia* (domestic pigeons) from a university hospital in southern Brazil. Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo. 82: 1-4.

MABBERLEY, D. J.; PANNELL, C. M.; SING, A. M. Meliaceae. Flora Malesiana Series I, Leiden, n. 12, p. 1-407, 1995.

MACKINNON, S.; DURST, T.; ARNASON, J.T.; ANGERHOFER, C.; PEZZUTO, J.M.; SÁNCHEZ-VIDAS, P.E.; POVEDA L.J.; GBEASSOR, F.M. 1997. Antimalarial activity of tropical Meliaceae extracts and gedunin derivatives. Journal of Natural Products. 1997; 60: 336-341.

MAGALHÃES, L.A.M. 2010. Avaliação dos constituintes químicos de *Guarea convergens*, *G. scabra*, *G. silvatica* (voláteis) e *G. humaitensis* (fixos e voláteis) e atividade sobre *Aedes aegypti*. Dissertação (Mestrado em Química). Manaus, AM: UFAM, 2010.

MATOS, A.P.; NEBO, L.; VIEIRA, P.C.; FERNANDES, J.B.; DA-SILVA, M.F.G.F. E RODRIGUES, R.R. 2009. Constituintes químicos e atividade inseticida dos extratos de frutos de *Trichilia elegans* e *T. catigua* (MELIACEAE). Quim. Nova, Vol. 32, No. 6, 1553-1556.

MELO, L.E.S. 2016. Estudo químico de resíduos madeireiros de *Tabebuia serratifolia* (Vahl) G. Nicholson, *Acacia mangium* Willd. E *Dipteryx polyphylla* Huber. Tese (Doutorado em Química). Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, 2016.

MISRA, S.; VERMA, M.; MISHRA, S.K.; SRIVASTAVA, S.; LAKSHMI, V.; MISRA-BHATTACHARYA, S. 2011. Gedunin and photogedunin of *Xylocarpus granatum*

possess antifilarial activity against human lymphatic filarial parasite *Brugia malayi* in experimental rodent host. Parasitol Res, 109:1351–1360

MMA (Ministério do Meio Ambiente). 2018. Biodiversidade Brasileira. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-brasileira>> Acesso em 06 ago. 2018.

MOBOT (Missouri Botanical Garden) 2018. Disponível em: <<http://www.tropicos.org>> 20 jun. 2018.

NASCIMENTO, C. C.; LIMA, M. P.; BRASIL, M. M.; ARAÚJO, R. D.; PAULA, E. V. C. M. 2012. Desenvolvimento de (Bio) Tecnologias para Aproveitamento de Recursos Naturais no Alto Rio Negro. In: Eloy Castelo, Luís Augusto de Souza (Org.). Desvendando as Fronteiras do Conhecimento na Região Amazônica do Alto rio negro. Manaus, Amazonas. 354p.

OIMT (Organização Internacional de Madeiras Tropicais). 2016. Reseña anual y evaluación de la situación mundial de las maderas. 2015-2016. Organización Internacional de las Maderas Tropicales. Yokohama, Japón. OIMT. 210p.

OKOGUN, J. I., FAKUNLE, C. O., EKONG, D. E. U., & CONNOLLY, J. D. (1975). Chemistry of the meliacins (limonoids). The structure of melianin A, a new protomeliacin from *Melia azedarach*. Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1, (14), 1352.

OLIVEIRA, K.P.; SOFIAT, F.T.; MOURÃO, K.S.M.; MARQUES, L.C. 2011. Análise farmacognóstica comparativa de dois lotes de cascas de *Trichilia catigua* adr. juss. (Meliaceae), a catuaba da Bahia. Rev. Pesq. Inov. Farm. 3(1), p. 2-8.

OMAR, S.; MARCOTTE, M.; FIELDS, P.; SÁNCHEZ, P.E.; POVEDA, L.; MATA, R.; JIMÉNEZ, A.; DURST, T.; ZHANG, J.; MACKINNON, S.; LEAMAN, D.; ARNASON, J.T.; PHILOGÈNE, B.J.R. 2007. Antifeedant activities of terpenoids isolated from tropical Rutales. Journal of Stored Products Research. 43: 92-96.

O'NEILL, G. A.; DAWSON, I.; SOTELO-MONTES, C.; GUARINO, L.; GUARIGUATA, M.; CURRENT, D.; AND J. C. WEBER. 2001. Strategies for genetic conservation of trees in the Peruvian Amazon. Biodiversity and Conservation 10: 837–850.

PENNINGTON, T.D.; STYLES, B.D.; E TAYLOR D.A.H. 1981. Meliaceae. Flora Neotropica Monograph. 28: 235-244.

RAGASA, C.Y.; LIM, K.F.; SHEN, C.C.; RAGA, D.D. 2015. Hypoglycemic Potential of Triterpenes from *Alstonia scholaris*. Pharmaceutical Chemistry Journal, Vol. 49, No. 1.

ROWEDER, C. 2012. Germinação de sementes e desenvolvimento de plântulas de Cedro (*Cedrela odorata* L. - Meliaceae) e Mogno (*Swietenia macrophylla* King - Meliaceae) em diferentes condições de luminosidade, substratos e recipientes. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Universidade Federal do Acre, Rio Branco, Acre, 2012.

SANTOS, D.; PEREIRA, D.; VERÍSSIMO, A. 2013. O estado da Amazônia: uso da terra. Belém: IMAZON. 70p.

SOARES, A.O.; FERREIRA, A.G.L.; RAMOS-SOARES, L.; CORSINO, J.; GARCEZ, F.R. E SILVA-GARCEZ, W.S. 2014. Estudo químico das folhas de *Trichilia selvatica* (Meliaceae) Quim. Nova, Vol. 37, No. 9, 1487-1490.

SCHNEIDER, C.; BOHNENSTENGEL, F. I.; NUGROHO, B. W.; WRAY, V.; WITTE, L.; HUNG, P. D.; KIET, L. C.; PROKSCH, P. 2000. Insecticidal rocaglamide derivatives from *Aglaia spectabilis* (Meliaceae). Phytochemistry, Oxford, v. 54, p. 731-736.

SEVERO, E.T.D.; CALONEGO, F. W.; SANSÍGOLO, C. A. 2006. Composição química da madeira de *Eucalyptus citriodora* em função das direções estruturais. Silva Lusitana, 14: 113-126.

SILVA, J. C. 2002. Caracterização da madeira de *Eucalyptus grandis* Hill ex. Maiden, de diferentes idades, visando a sua utilização na indústria moveleira. Tese (Doutorado em Ciências Florestais), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, 2002.

SIMMONDS, M. S. J.; STEVENSON. P. C.; PORTER, E. A.; VEITCH, N. C. 2001. Insect antifeedant activity of three new tetranortriterpenoids from *Trichilia pallida*. Journal of Natural Products, Pittsburg, v. 64, p. 1117-1120.

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

VALLADARES, G. R.; FERREYRA D.; DEFACO, M. T.; CARPINELLA, M. C.; PALACIOS, S. 1999. Effects of *Melia azedarach* on *Triatoma infestans*. Fitoterapia, Milano, v. 70, p. 421-424.

VERÍSSIMO, A.; SOUZA-JUNIOR, C.; STONE, S. AND UHL, C. 1998. Zoning of timber extraction in the Brazilian Amazon. Conservation Biology 12: 128–136.

VERÍSSIMO, A. 2006. Estratégia e mecanismos financeiros para florestas nativas no Brasil. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO).

VERÍSSIMO, A.; PEREIRA, D. 2014. Produção na Amazônia Florestal: características, desafios e oportunidades. Parc. Estrat. Brasília-DF. v. 19, n. 38, p. 13-44.