



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Análise Fitoquímica da espécie *Peltogyne lecointei*

LUÍS FELIPE BORIN

ORIENTADOR: PROF. DR. MAURO VICENTINI CORREIA

BRASÍLIA - DF, BRASIL

10/2021



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Análise Fitoquímica da espécie *Peltogyne lecointei*

Trabalho de Conclusão de Curso 2, apresentado como requisito para formação no curso de bacharelado em química.

Orientador: Prof. Dr. Mauro Vicentini Correia

LUÍS FELIPE BORIN

BRASÍLIA - DF, BRASIL

10/2021

RESUMO

A presente pesquisa se refere a uma análise fitoquímica para a confirmação e descoberta do perfil metabólico da espécie arbórea *Peltogyne lecointei*. O estudo da bioatividade de metabólitos secundários com origem vegetal está demonstrando resultados promissores na biomedicina contemporânea, permitindo auxiliar no tratamento e prevenção de doenças, suplementação dietética, eliminação de organismos patogênicos, uso como corante de alimentos, entre outras diversas aplicabilidades. A espécie *Peltogyne lecointei* é uma árvore de grande porte encontrada no norte do Brasil, e, assim como para as outras espécies do gênero, sua madeira é bastante valorizada devido à tonalidade violeta que apresenta o corte exposto do cerne, porção interna da madeira, resultando em trabalhos com madeira visualmente atrativos. A exploração da madeira dessas árvores produz uma quantidade considerável de rejeitos, material vegetal que possui ainda um perfil metabólico contido, havendo a possibilidade para se encontrar novos usos para esse material. Pesquisas realizadas com o extrato de madeiras de árvores pertencentes ao gênero *Peltogyne* mostraram predominantemente a existência de leucoantocianidinas (flavan-3,4-diols). Ensaio de atividade biológica, feitos com extratos de madeiras do gênero, mostraram eficácia no combate contra fungos, inibição no crescimento de colônias de bactérias patogênicas, controle biológico de termites, moderada atividade contra larvas de *Aedes aegypti*, e possibilidade de uso industrial como corante de alimentos. No presente trabalho foram feitas análises de identificação dos componentes contidos em extratos de hexano, acetato de etila, e etanol, do cerne de *Peltogyne lecointei*. Por meio de ressonância magnética nuclear, cromatografia em camada delgada, cromatografia gasosa, e espectrometria de massas, foi possível notar a presença de uma diversidade de componentes orgânicos contidos no extrato. Testes fitoquímicos qualitativos para os extratos sugeriram a presença de terpenoides e compostos fenólicos, incluindo flavonoides, antocianinas, e leucoantocianinas.

Palavras-Chave: *Peltogyne lecointei*. Roxinho. Peltoginoides. Durabilidade natural de madeiras.

ABSTRACT

The present research refers to a phytochemical analysis for the confirmation and discovery of the metabolic profile of the tree species *Peltogyne lecointei*. The study of the bioactivity of secondary metabolites with plant origin is showing promising results in contemporary biomedicine, allowing it to help in the treatment and prevention of diseases, dietary supplementation, elimination of pathogenic organisms, use as a food coloring, among other diverse applications. The species *Peltogyne lecointei* is a large tree found in northern Brazil, and, as for other species of the genus, its wood is highly valued due to the violet hue that presents the exposed cut of the heartwood, internal portion of the wood, resulting in visually attractive woodwork. The exploitation of wood from these trees produces a considerable amount of tailings, plant material that still has a contained metabolic profile, with the possibility of finding new uses for this material. Research carried with the wood extract from trees belonging to the *Peltogyne* genus showed predominantly the existence of leucoanthocyanidins (flavan-3,4-diols). Biological activity tests, carried out with extracts from woods of the genus, showed efficacy in combating fungi, inhibiting the growth of colonies of pathogenic bacteria, biological control of termites, moderate activity against *Aedes aegypti* larvae, and the possibility of industrial use as a dye for foods. In the present work, identification analyzes of the components contained in hexane, ethyl acetate and ethanol extracts from the heartwood of *Peltogyne lecointei* were carried out. Through nuclear magnetic resonance, thin layer chromatography, gas chromatography, and mass spectrometry, it was possible to notice the presence of a variety of organic components contained in the extracts. Qualitative phytochemical tests for the extracts suggested the presence of terpenoids and phenolic compounds, including flavonoids, anthocyanins, and leucoanthocyanins.

Keywords: *Peltogyne lecointei*. Purple heartwood. Peltogynoids. Natural wood durability.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	6
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
2.1	FABACEAE.....	7
2.2	GÊNERO <i>PELTOGYNE</i>	8
2.2	<i>PELTOGYNE LECOINTEI</i>	9
2.3	LEUCOANTOCIANIDINAS E BIOSSÍNTESE.....	10
2.4	ATIVIDADE BIOLÓGICA.....	16
2.4.1	Atividade antifúngica	16
2.4.2	Atividade antitermita	18
2.4.3	Atividade antibiótica	20
2.4.4	Corante de alimentos	21
2.4.5	Atividade larvicida	22
2.4.6	Experimentação com pH	23
3	OBJETIVOS	25
4	METODOLOGIA	26
4.1	AMOSTRA VEGETAL.....	26
4.2	PREPARO DO EXTRATO.....	26
4.3	CROMATOGRAFIA EM COLUNA.....	29
4.4	CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA.....	33
4.5	ANÁLISES FITOQUÍMICAS QUALITATIVAS.....	34
4.5.1	Taninos e Fenóis	34
4.5.2	Saponinas	34
4.5.3	Alcaloides	34
4.5.4	Flavonoides	35
4.5.5	Antocianinas	35
4.5.6	Leucoantocianinas	35
4.5.7	Terpenoides e esteroides	36
4.5.8	Esteroides	36
4.5.9	Quinonas	37
4.5.10	Antraquinonas	37
4.6	RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR.....	37
4.7	ANÁLISE DE GC-MS PARA EXTRATO EM HEXANO.....	39

5	RESULTADOS E ANÁLISES	40
5.1	PREPARO DO EXTRATO.....	40
5.2	CROMATOGRAFIA EM COLUNA.....	40
5.3	CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA.....	41
5.4	ANÁLISES FITOQUÍMICAS QUALITATIVAS.....	43
5.4.1	Taninos e Fenóis	44
5.4.2	Saponinas	44
5.4.3	Alcaloides	45
5.4.4	Flavonoides	46
5.4.5	Antocianinas	47
5.4.6	Leucoantocianinas	48
5.4.7	Terpenoides e esteroides	48
5.4.8	Esteroides	49
5.4.9	Quinonas	50
5.4.10	Antraquinonas	50
5.5	RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR.....	51
5.5.1	Peltoginol	54
5.5.2	Mopanol	55
5.5.3	Pubeschin	56
5.5.4	Leucofisetinidina	57
5.5.5	Leucocianidina	58
5.5.6	Peltomexicanin	59
5.6	ANÁLISE DE GC-MS PARA EXTRATO EM HEXANO.....	60
6	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	65
6.1	CONCLUSÃO.....	65
6.2	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	66
7	REFERÊNCIAS	67
8	ANEXOS	70

1. INTRODUÇÃO

A busca por componentes químicos biologicamente ativos com origem vegetal tem grande importância na ciência contemporânea, possibilitando avanços em áreas como medicina e biotecnologia. A presente pesquisa visa fazer um levantamento bibliográfico com respeito ao perfil metabólico de espécies do gênero *Peltogyne spp.*, com suas possíveis aplicabilidades, e verificar experimentalmente a presença de metabólitos secundários no cerne de uma árvore da espécie *Peltogyne lecointei*, árvore tipicamente encontrada em regiões florestais do Pará e Amapá (SILVA, 1976).

Metabólitos são substâncias orgânicas presentes em todos os organismos vivos. Essas substâncias são usualmente referidas como moléculas simples, sendo produtos ou intermediários nas vias metabólicas, responsáveis por conduzir o funcionamento biológico de um organismo. Os metabólitos podem ser classificados como primários ou como secundários, de acordo com sua origem e funcionalidade (SHASTRI, 2006).

Os metabólitos primários são as moléculas orgânicas diretamente envolvidas no crescimento, desenvolvimento, e reprodução de um organismo, e portanto são essenciais para a fisiologia do sistema. Exemplos de metabólitos primários incluem proteínas, DNA, RNA, carboidratos, ácidos graxos, álcoois, e alguns aminoácidos. Na indústria é comum a produção de metabólitos primários, utilizando-se de fungos e bactérias, processo que é utilizado na produção de bebidas alcoólicas por fermentação, no isolamento de aminoácidos como L-glutamato para suplementação dietética, na produção de ácido cítrico, entre outros usos. (SHASTRI, 2006).

Os metabólitos secundários, por sua vez, não atuam diretamente no desenvolvimento e funcionamento de um organismo, e são tipicamente formados partindo de modificações químicas de metabólitos primários, em ramificações das vias metabólicas básicas. Apesar dos metabólitos primários serem comuns para todos os organismos vivos, os metabólitos secundários têm grande especificidade filogenética, apresentando funcionalidades específicas que auxiliam na sobrevivência e reprodução de espécies em seu meio natural, e é comum espécies de mesmo gênero apresentarem um perfil metabólico similar. Os metabólitos secundários são também amplamente produzidos na indústria. Partindo-se de plantas, fungos, e bactérias, é possível obter substâncias capazes de tratar e prevenir doenças, como, por exemplo,

os antibióticos eritromicina e bacitracina, e também produzir pigmentos, antifúngicos, entre outros compostos quimicamente e biologicamente ativos (SHASTRI, 2006).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 FABACEAE

A espécie em estudo, *Peltogyne lecointei*, pertence à família Fabaceae, plantas também conhecidas como leguminosas. A família Fabaceae é uma das maiores famílias botânicas, de ampla distribuição geográfica, sendo a terceira maior família de angiospermas, com aproximadamente 751 gêneros e 19.500 espécies conhecidas (CHRISTENHUSZ; BYNG, 2016). No Brasil a família Fabaceae é a mais diversa com mais de 2800 espécies catalogadas, ocupando o primeiro lugar em diversidade de espécies nos biomas da Amazônia e Caatinga (ZAPPI et al., 2015). As leguminosas incluem árvores de grande porte à pequenas ervas, e se destacam por produzir frutos em forma de vagem. Seus frutos estão amplamente presentes na dieta humana, e são usualmente ricos em fibras, proteínas, vitaminas e minerais. Essa família botânica é considerada uma das mais importantes para o agronegócio mundial. No Brasil é produzida uma grande quantidade de leguminosas para o mercado interno e externo, principalmente soja, feijão, crotalária, acácia, e gliricídia. Brasil e Estados Unidos competem como maiores produtores de soja do mundo, sendo produzidas mais de 135 milhões de toneladas de soja a cada safra (CONAB, 2021), produto principalmente destinado para consumo animal, e para produção de óleo. Quanto ao feijão, o Brasil se destaca como um dos maiores produtores e consumidores mundiais do grão, alimento de alto teor proteico. Outras leguminosas podem representar diversas aplicabilidades, a crotalária, por exemplo, é utilizada como adubação verde e apresenta resistência a nematóides, permitindo maior rendimento da produção subsequente quando associada ao plantio de outras leguminosas, como soja, além de potencializar a fixação de nitrogênio (CAMARGO et al., 2017).

Devido à diversidade de gêneros e espécies, as leguminosas representam uma grande variedade de metabólitos secundários. Essas substâncias usualmente atuam na defesa contra microorganismos e herbívoros, e também como sinalizadores para animais polinizadores. Muitas espécies da família são também plantas fixadoras de nitrogênio atmosférico, e isso permite uma maior produção de metabólitos

secundários contendo nitrogênio, como alcaloides, aminas, glicosídeos cianogênicos, e peptídeos. (WINK, 2013).

2.2 GÊNERO *PELTOGYNE*

O gênero *Peltogyne spp.* comporta árvores de grande porte, que podem ser encontradas na América Tropical, incluindo México, Panamá, Colômbia, Bolívia, e se estendendo até a região sudeste do Brasil, tendo a Amazônia como seu centro de distribuição geográfica. As árvores alcançam de 30 a 50 m de altura, com diâmetro de 1,5 m. Possuem flores pequenas e frutos em forma de vagem, característico da família Fabaceae, contendo uma única semente. Atualmente as espécies do gênero *Peltogyne spp.* são utilizadas exclusivamente na extração da madeira, com registro de alguns poucos estudos feitos com objetivo de avaliar as propriedades biológicas contidas nos extratos vegetais (SILVA, 1976).

A madeira das espécies do gênero *Peltogyne spp.* tem uma coloração distinta para o cerne (porção interna da madeira), que se distingue do alburno (porção que envolve o cerne), apresentando tonalidade violeta após o corte ser exposto (SILVA, 1976), (IPT, s.d.). A madeira não apresenta odor característico, e possui elevada densidade e dureza de trabalhabilidade. Apesar de alta dureza, o cerne da madeira é comercialmente valorizado no Brasil e no mundo, devido à sua coloração violeta. A madeira é usada na construção civil, assoalhos, mobiliário, instrumentos, entre outros trabalhos de marcenaria (IPT, s.d.).

Sabendo-se que a exploração e o trabalho com a madeira de muitas espécies vegetais produz uma grande quantidade de rejeitos, é de interesse científico e ambiental a procura por finalidades biológicas para esse material. Portanto, é importante se conhecer o perfil químico das espécies vegetais exploradas, e, para isso, pode-se partir de análises bioquímicas do extrato e o material celulósico.

Quanto à atividade biológica de extratos do gênero *Peltogyne spp.*, a literatura sugere uma boa resistência da madeira para ataque de organismos xilófagos, como fungos apodrecedores e cupins (IPT, s.d.). Essa característica natural da espécie indica uma possibilidade do uso dos rejeitos de exploração da madeira para se obter compostos químicos seletivamente citotóxicos para uso na indústria.

Previamente foram feitos estudos químicos em extratos de espécies do gênero *Peltogyne spp.*, e foi descoberta a presença majoritária de flavonoides,

especialmente dois compostos classificados como peltoginoides, o peltoginol e o mopanol (HARBORNE, 1988 E BUCKINGHAM; MUNASINGHE, 2015). Também foram registrados ensaios laboratoriais verificando a atividade biológica dos extratos de madeiras do gênero *Peltogyne spp.*, e obteve-se relativa eficácia no controle de fungos, bactérias, e cupins.

Figura 1. Corte transversal do tronco de *Peltogyne sp.*



Fonte: Adaptado de (RODRIGUES, 2010).

2.3 PELTOGYNE LECOINTEI

A espécie *Peltogyne lecointei* Ducke é uma árvore de 20 a 30 m de altura, glabra, com ramos jovens escuros, tronco ereto com sapopemas na base, casca cinzenta, e cerne violáceo. Possui folhas curtas, cachos de flores curtas, e seu fruto é um legume orbicular, de 4 cm de comprimento. A espécie é usualmente encontrada no norte do Brasil, especificamente na Mata de terra firme do Pará (Óbidos, rio Tapajós) e Amapá (SILVA, 1976).

Poucos estudos científicos foram relatados para a espécie em questão. Um estudo feito na Universidade Federal de Mato Grosso realizou uma análise da composição química estrutural de madeiras da Amazônia Meridional. O estudo mostrou para a espécie *Peltogyne lecointei* uma porcentagem de aproximadamente 23,98% de lignina, 73,33% de celulose com hemicelulose, e 2,69% de extrativos. Este

estudo sugere um baixo teor de extrativos na composição da madeira, o que é comum para espécies arbóreas, como observado nas outras espécies analisadas, que tiveram entre 1,99% e 3,47% de extrativos. (ALMEIDA; RODRIGUES; CASTELO, 2015). Outro estudo, realizado recentemente, utilizou o cerne da madeira de *Peltogyne lecointei* para o preparo de extratos, que foram testados contra larvas de *Aedes aegypti*, e observou-se alguma eficácia para o extrato preparado com hexano no controle desses insetos (GARCIA, 2021).

2.3 LEUCOANTOCIANIDINAS E BIOSÍNTESE

Considerando a busca por metabólitos secundários presentes nas espécies do gênero *Peltogyne spp.*, tem-se registros de algumas substâncias que são recorrentes entre espécies gênero, e em outros gêneros de filogenia próxima. As substâncias mais abundantes são os isômeros peltoginol e mopanol (Figura 2), e são classificados como peltoginoides, leucoantocianidinas que fazem parte do grupo dos flavonoides. Os peltoginoides se diferem de outros flavonoides pela presença de um quarto anel formado por uma ponte de um carbono entre a função 3-oxi e C-2' ou C-6' do anel B, e portanto é sugerido um sistema de numeração alternativo, que considera o carbono adicional (Figura 3). O peltoginol é sempre acompanhado de seu isômero 7 β -ol, peltoginol B, e o par de isômeros correspondentes, mopanol e mopanol B. (HARBORNE, 1988 E BUCKINGHAM; MUNASINGHE, 2015).

Essas duas leucoantocianidinas estão presentes principalmente no alburno e no cerne, sugerindo uma finalidade desses metabólitos como defesa química contra parasitas, na tentativa de manter a integridade estrutural do caule do organismo (RODRIGUES, 2010).

Figura 2. Estrutura molecular das substâncias peltoginol e mopanol.

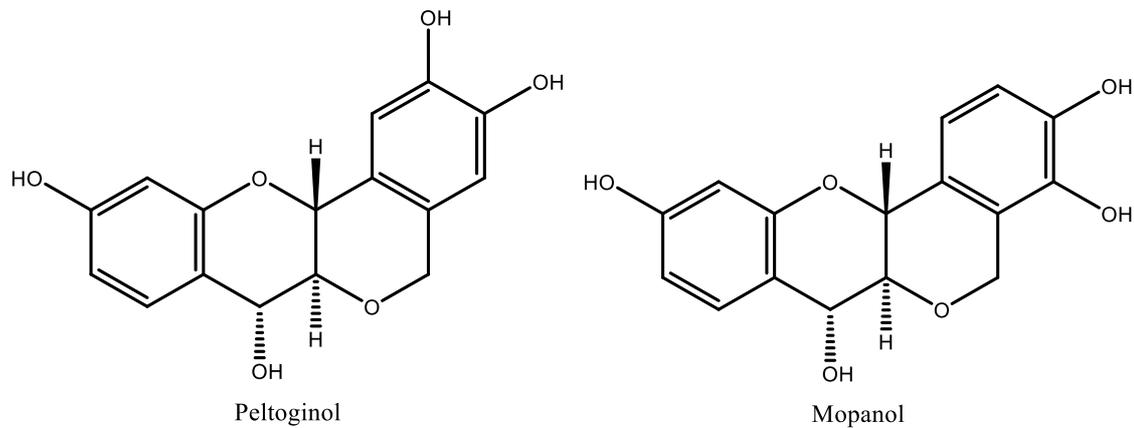


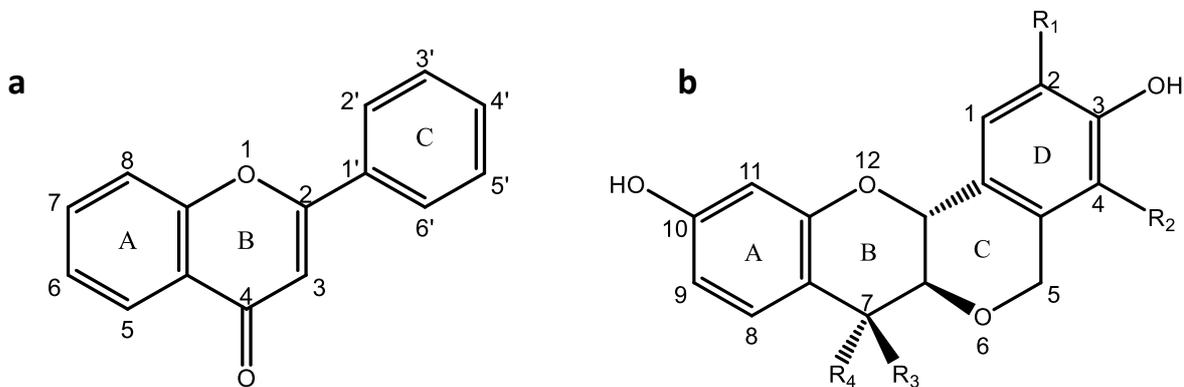
Figura 3. a) Estrutura química da flavona (2-fenil-1,4-benzopirona), molécula base do grupo das flavonas, identificada com a numeração geral para os flavonoides.

b) Estrutura química geral de peltoginoides, com o sistema de enumeração e identificação dos anéis adaptado.

$R^1 = R^4 = \text{OH}$, $R^2 = R^3 = \text{H}$; Peltoginol. $R^1 = R^3 = \text{OH}$, $R^2 = R^4 = \text{H}$; Peltoginol B.

$R^1 = R^3 = \text{H}$, $R^2 = R^4 = \text{OH}$; Mopanol. $R^1 = R^4 = \text{H}$, $R^2 = R^3 = \text{OH}$; Mopanol B.

$R^1 = \text{OH}$, $R^2 = R^3 = R^4 = \text{H}$; Pubeschin.

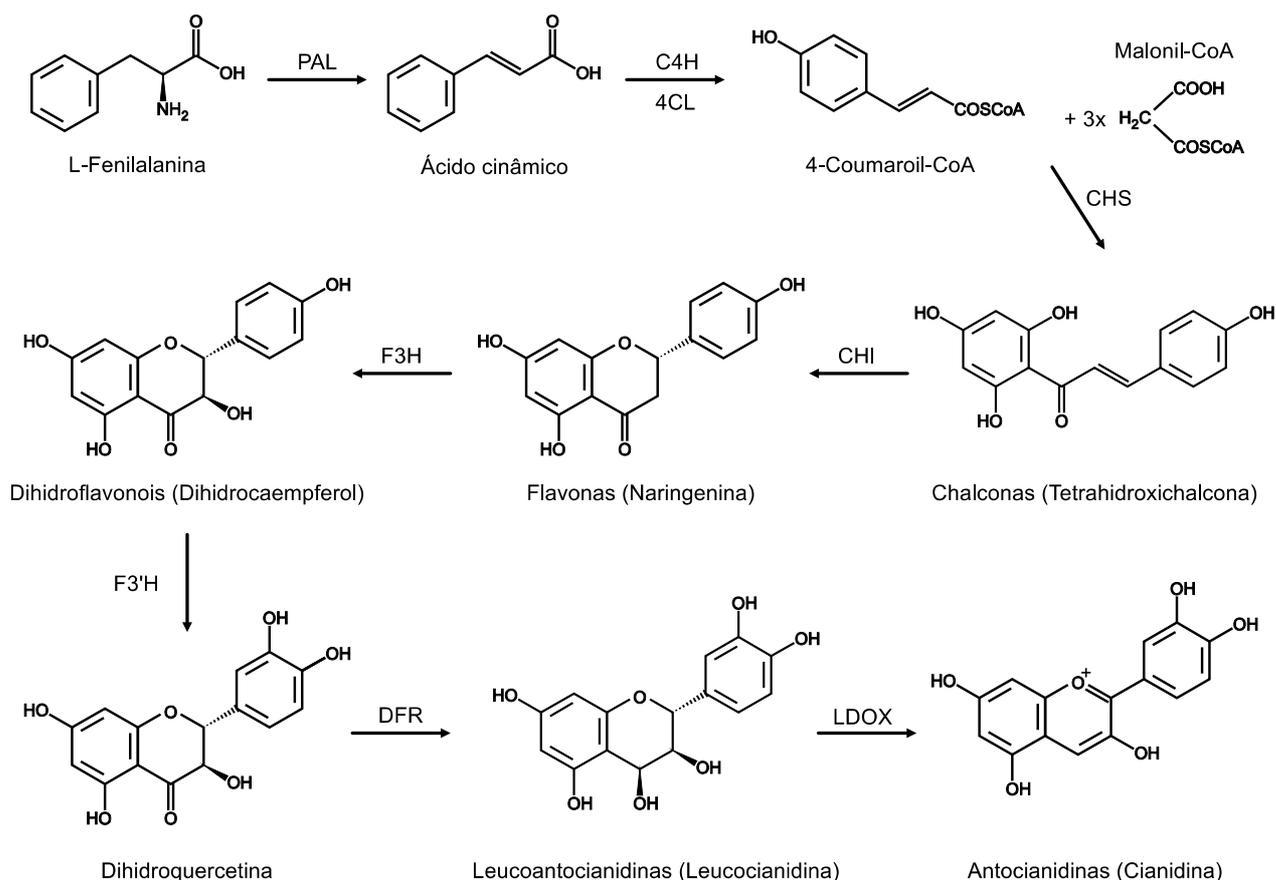


O mecanismo de biossíntese das leucoantocianidinas é conhecido, sendo um processo intermediário na biossíntese de antocianinas, um mecanismo que permanece constante em plantas de diferentes espécies (HOLTON; CORNISH, 1995 E TANAKA; OHMIYA, 2008), e foi confirmado por análise de transcriptoma (MING et al., 2021).

O processo de biossíntese de antocianinas é uma extensão do mecanismo geral de formação de flavonoides, envolvendo a formação de leucoantocianidinas como precursor (Figura 4). Flavonoides são metabólitos secundários da classe dos polifenóis, produzidos em plantas a partir da via metabólica dos fenilpropanoides, na qual partindo do aminoácido fenilalanina é produzido ácido cinâmico pela enzima Fenilalanina amônia liase, possibilitando uma série de reações. A biossíntese de antocianinas se inicia com a enzima chalcona sintase (CHS) produzindo naringenina chalcona a partir de 4-Coumaroil-CoA e três moléculas de malonil-CoA. Em seguida a naringenina chalcona é isomerizada à naringenina pela enzima chalcona isomerase (CHI). A naringenina é então convertida à dihidrocaempferol pela enzima flavanona 3-hidroxilase (F3H), processo de hidroxilação que pode ser expandindo à formação de outros dihidroflavonois, a dihidroquercetina com a enzima flavonoide 3'-hidroxilase (F3'H) ou a dihidromiricetina pela enzima flavonoide 3', 5'-hidroxilase (F3'5'H). Os dihidroflavonois formados são então reduzidos à leucoantocianidinas por meio da enzima dihidroflavonol-4-redutase (DFR), gerando compostos que usualmente não possuem coloração. Esses compostos podem ser convertidos à antocianidinas pela enzima leucoantocianidina dioxigenase (LDOX), também conhecida como antocianidina sintase (ANS), formando compostos conjugados que apresentam coloração característica. (HOLTON;CORNISH, 1995 E TANAKA;OHMIYA, 2008).

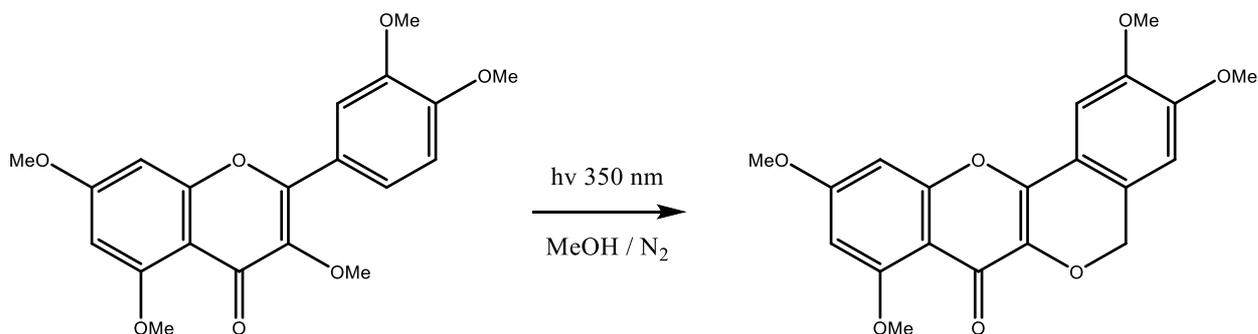
Figura 4. Biossíntese de antocianidinas.

PAL: Fenilalanina amônia liase; CH4: cinamato 4-hidroxilase; 4CL: 4-coumaroil CoA ligase; CHS: chalcona sintase; CHI: chalcona isomerase; F3H: flavanona 3-hidroxilase; F3'H: flavonoide 3'-hidroxilase; DFR: dihidroflavonol-4-redutase; LDOX: leucoantocianidina dioxigenase.



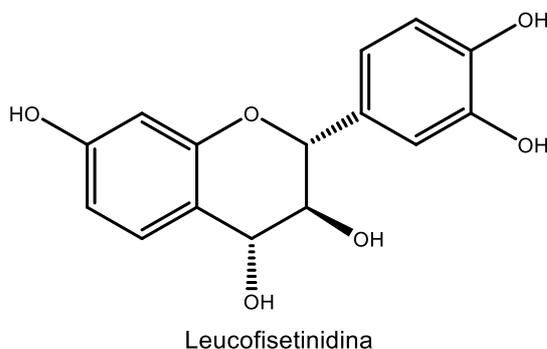
Em um estudo para investigar per-O-metilflavonois (WAISS; CORSE, 1965) foi feita uma reação de fotociclicação oxidativa de quercetina penta-O-metil éter, obtendo tetra-O-metil éter de β -fotometilquercetina, com rendimento de 32%, utilizando metanol e nitrogênio seco, juntamente com uma lâmpada de mercúrio de baixa pressão, com radiação em 350 nm. O resultado obtido levou os autores a sugerirem que reações fotoquímicas poderiam estar envolvidas na biossíntese do peltoinol e de rotenoides. A reação fotoquímica mencionada é representada na Figura 5. (SISA et al., 2010 E WAISS; CORSE, 1965).

Figura 5. Ciclização foto-oxidativa de quercetina 3,5,7,3',4'-pentametil éter.



Mopanol e mopanol B foram encontrados por Drewes e Roux (1965) no cerne de *Colophospermum mopane*. Juntamente no extrato foram encontrados peltoginol e leucofisetinidina. Uma composição semelhante foi encontrada em *Peltogyne spp.* (*P. porphyrocardia*; *P. venosa*, e *P. pubescens*) (DREWES; ROUX, 1967). A ocorrência simultânea desses compostos pode indicar uma relação biogenética, levantando a possibilidade de que mopanol e peltoginol são derivados da leucofisetinidina (Figura 6). (MARKAKIS, 1982)

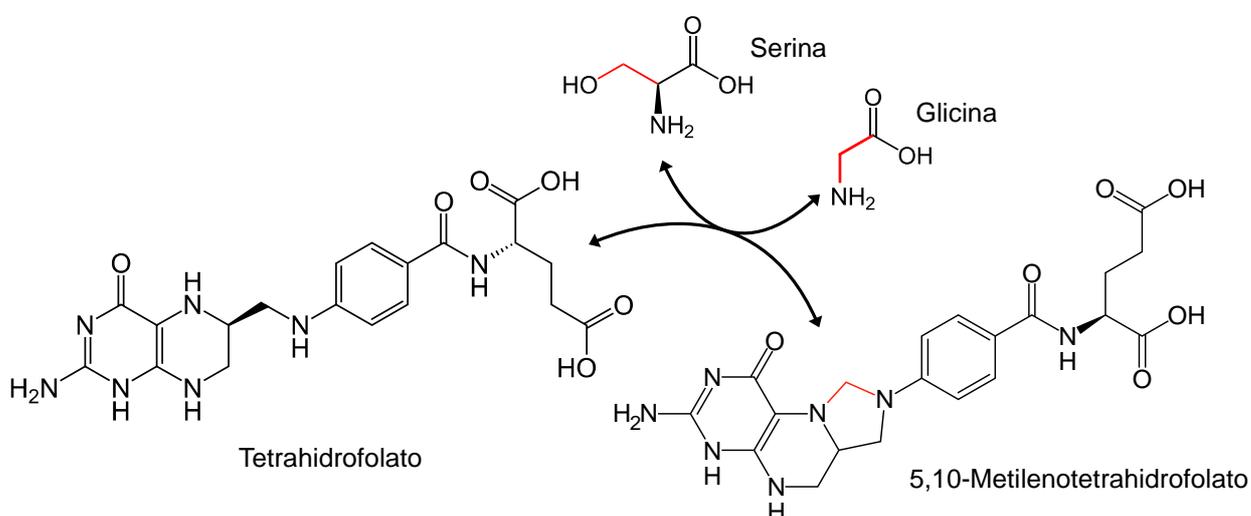
Figura 6. Estrutura molecular da leucofisetinidina.



Outra proposta para a formação de peltoginol e mopanol partindo de leucofisetinidina seria com base em um processo biológico conhecido, a via do glicolato. Essa via é importante em organismos vegetais, pois atua na remoção de 2-fosfoglicolato, um metabólito tóxico para a planta, que inibe algumas vias metabólicas. Nessa via ocorre uma reação reversível entre o peroxissomo e a mitocôndria das células vegetais, que é a conversão simultânea de L-serina para glicina e tetraidrofolato para 5,10-metilenotetrahidrofolato. A formação de 5,10-metilenotetrahidrofolato envolve ciclização entre os grupos de amina 5 e 10, por meio

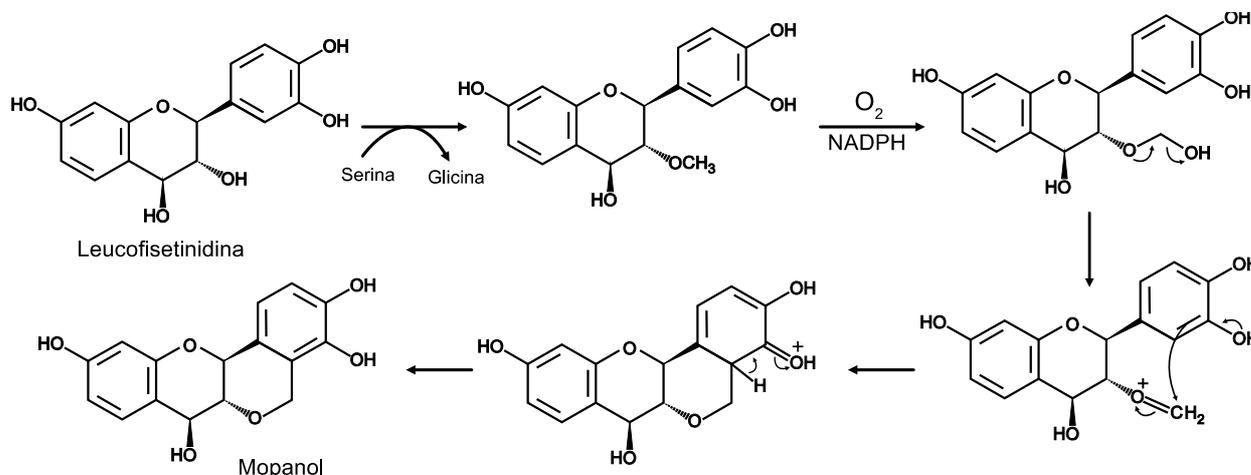
da adição de um carbono derivado dos aminoácidos glicina e serina, processo que é catalizado pelas enzimas glicina-descarboxilase (GLDC) e serina-hidroximetiltransferase (SHMT). Analogamente a ciclização para a formação de peltoginoides pode partir de outros flavonoides, com posterior adição de carbono conforme a reação descrita, apresentada na figura 7. (NELSON; COX, 2013 E DEWICK, 2009).

Figura 7. Conversão simultânea de L-Serina a Glicina, e tetrahydrofolato a 5,10-Metilenotetrahydrofolato, reação catalisada pelas enzimas GLDC e SHMT, na via do glicolato.



Seguindo a ideia da proposta mencionada acima, é possível que a reação de formação do mopanol partindo de leucofisetinidina ocorra com auxílio de enzimas denominadas monooxigenases. Essas enzimas catalizam uma adição direta de oxigênio à molécula, partindo de oxigênio molecular, e reduzindo um oxigênio à água com auxílio de um agente redutor como NADPH ou ácido ascórbico (DEWICK, 2009). Assim, partindo da adição de carbono pela conversão de serina para glicina na via do glicolato, a ciclização posterior pode ser auxiliada pela adição de oxigênio através de monooxigenases, reação representada na figura 8.

Figura 8. Proposta da reação de formação de mopanol partindo de leucofisetinidina.



Com respeito à coloração apresentada pela madeira das árvores do gênero *Peltogyne spp.*, supondo-se que os metabólitos responsáveis pela coloração violeta sejam os peltoginoides, deve-se observar que essas moléculas não possuem estruturas conjugadas, e portanto não apresentam coloração naturalmente, como seria o caso das antocianidinas. Uma possível explicação envolve a observação de que a madeira apresenta coloração apenas mediante exposição ao ar e luz solar, após ser feito o corte da madeira, podendo então se tratar de uma reação de oxidação catalisada por luz. Os compostos fenólicos podem ser oxidados com auxílio de coenzimas como NAD^+ presentes no meio biológico, e tornar-se quinonas, conforme substituição das funções álcool por cetona, e ainda com posterior oxidação liberar parte dos hidrogênios, formando ligações duplas entre carbonos, e gerando uma estrutura conjugada, como é notado para a peltomexicanina (Figura 12).

2.4 ATIVIDADE BIOLÓGICA

2.4.1 Atividade Antifúngica

De acordo com um estudo feito com amostras de árvores nativas da Guiana Francesa (RODRIGUES, 2010), a espécie do gênero *Peltogyne sp.* analisada apresentou atividade citotóxica contra fungos lignívoros e fungos dermatófitos. Extratos da casca, do alburno, e do cerne mostraram grande inibição no halo de crescimento de *Pycnoporus sanguineus* (podridão branca), e o extrato da casca mostrou atividade contra *Gloeophyllum trabeum* (podridão parda). É notada baixa

atividade antifúngica para os extratos derivados das folhas, uma explicação possível é devido à curta duração de vida das folhas, assim como sua posição, não exigindo o investimento na biossíntese de substâncias para a defesa contra o ataque fúngico (RODRIGUES, 2010).

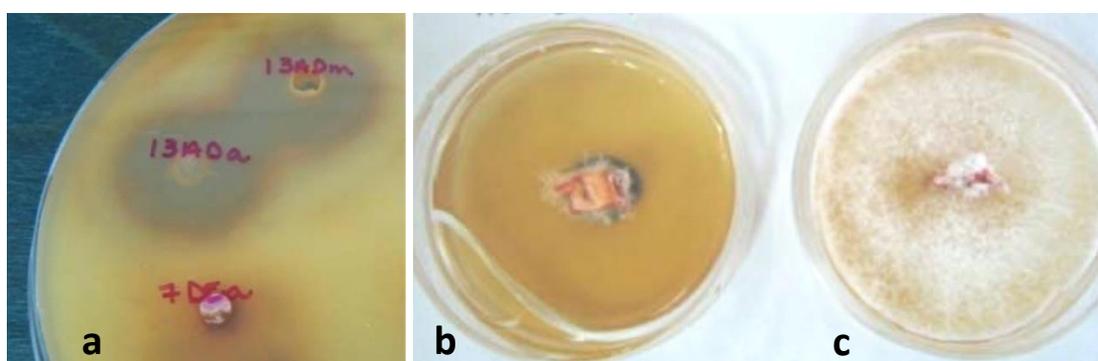
A atividade antifúngica foi inicialmente avaliada pelo método de perfuração em ágar, no qual extratos brutos feitos com acetato de etila e com metanol foram colocados em cavidades perfuradas no meio sólido, com o fungo inoculado sobre a superfície do meio (Figura 9). Após o teste qualitativo, foi realizado um método quantitativo determinando-se os índices de atividade antifúngica (IA). O teste foi feito comparando-se o crescimento radial dos micélios em meio de cultura tratado com extrato com o não tratado (Figura 9). Os resultados para *Peltogyne sp.* no primeiro teste mostraram inibição no crescimento fúngico de *P. sanguineus* em 16 mm para folha, 31 mm para casca, e 45 mm para o alburno e cerne. No extrato por acetato de etila apenas a casca mostrou inibição, com 13 mm para *G. trabeum*, já os extratos metanólicos não foram ativos. No teste de atividade antifúngica para *Peltogyne sp.* com os extratos selecionados teve-se um índice de aproximadamente 34% para *P. sanguineus* e superior a 50% para *G. trabeum*.

O mesmo estudo utilizou microdiluição em meio líquido para analisar os extratos contra fungos filamentosos e leveduras, permitindo por esse processo determinar os valores para a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato. O teste mostrou boa eficácia da madeira de *Peltogyne sp.* contra algumas espécies, como *Candida glabrata* (CIM 8 $\mu\text{g.ml}^{-1}$), e *Candida albicans* (CIM 16 $\mu\text{g.ml}^{-1}$). Esse estudo sugere que o extrato de árvores do gênero *Peltogyne* podem mostrar efetividade comparável à antifúngicos comerciais, como fluconazol, para determinados parasitas.

Em outro estudo realizado com objetivo de extrair agentes antifúngicos da madeira de espécies arbóreas da Guiana Francesa (BASSET; EPARVIER; ESPINDOLA, 2015), obteve-se o composto (+)-mopanol no extrato em acetato de etila de uma árvore *Peltogyne sp.* O mopanol foi testado por microdiluição em meio líquido contra diversos fungos patógenos em plantas e humanos, e apresentou boa seletividade antifúngica contra *Candida albicans* (CIM mopanol = 0,5 $\mu\text{g.ml}^{-1}$), e outras espécies de *Candida spp.*, especialmente *C. krusei* (CIM mopanol = 1 $\mu\text{g.ml}^{-1}$), que é uma das espécies resistentes a antifúngicos comerciais (CIM fluconazol > 64 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, CIM itraconazol = 16 $\mu\text{g.ml}^{-1}$). Esse estudo permitiu avaliar que a busca por novos antifúngicos pode partir de madeiras que apresentam boa durabilidade natural,

verificado na espécie *Peltogyne sp.* estudada, com destaque ao agente antifúngico (+)-mopanol. (BASSET; EPARVIER; ESPINDOLA, 2015).

Figura 9. a) Teste de perfuração em ágar, na porção superior, para o extrato metanólico e em acetato de etila de *Bagassa guianensis*, mostrando dois halos de inibição de crescimento fúngico de *G. trabeum*, na parte inferior, o extrato em acetato de etila de *Qualea rosea* com baixa inibição. b) Teste de atividade antifúngica com o extrato por acetato de etila em 250 µg.ml⁻¹ de *Sextonia rubra*. c) Controle negativo com alta dispersão de micélios.



Fonte: Adaptado de (RODRIGUES, 2010).

2.4.2 Atividade Antitermita

Os termites, também conhecidos como cupins, são insetos eussociais que taxonomicamente pertencem à ordem Blattodea, juntamente com as baratas, e também são referidos como “baratas sociais”. Conforme a taxonomia, compõem a subordem Isoptera, que tem cerca de 2800 espécies, insetos conhecidos por causar grandes prejuízos econômicos, devido à sua característica de destruir madeira e outros materiais celulósicos. Os termites são hemimetábolos, possuindo três estágios de vida, ovo, ninfa, e estágio adulto. Os cupins do gênero *Nasutitermes* pertencem à família Termitidae que compreende 85% das espécies de cupins conhecidas no Brasil, e mais de 70% das espécies conhecidas no mundo, os chamados “cupins superiores”, que não possuem flagelados simbiotes (DEITZ et al., 2003). A literatura indica que os cupins da família Termitidae produzem uma maior quantidade de celulase quando comparados com outras famílias de cupins (BIGNELL, 2010), permitindo que consumam material celulósico com maior eficiência. Esses cupins consomem madeira, folhas, e húmus, e muitos constroem ninhos grandes e complexos.

Um estudo realizado com árvores nativas da Guiana Francesa, já mencionado anteriormente (RODRIGUES, 2010), utilizou o extrato de *Peltogyne sp.* para avaliar eficácia no controle de cupins. Foi realizado um teste de contato direto dos insetos com discos de papel de filtro, que possuem alto teor de celulose, tratados com extratos brutos da madeira em diferentes concentrações, extratos derivados dos solventes acetato de etila ou de metanol. Após 72 horas de exposição, obteve-se 83% de mortalidade dos cupins para o extrato em concentração de $9,3 \mu\text{g}.\text{mm}^{-2}$ feito com acetato de etila, para uma amostra contendo o alburno e cerne externo. Para o extrato de uma amostra do cerne interno em mesmas condições, foi obtido apenas 28% de mortalidade, indicando maior defesa natural da madeira em sua porção externa.

Fazendo um comparativo dos resultados obtidos para fungos e cupins com os extratos analisados no estudo, percebeu-se que a atividade biológica contra os dois tipos de organismos não foi exatamente equivalente. Essa observação sugere que os metabólitos produzidos por essas plantas não são apenas citotóxicos para diversos organismos, mas sim moléculas que são ativas para um alvo biológico específico. Além disso, os resultados para a atividade biológica e rendimentos dos extratos obtidos em diferentes regiões da árvore mostraram especificidade metabólica para os diferentes órgãos, possivelmente de acordo com a adaptação evolutiva para resistência aos parasitas. (RODRIGUES, 2010).

Figura 10. a) Disco de celulose tratado com o extrato em acetato de etila do cerne de *Ormosia flava*, após 72 horas de contato direto com operários da espécie *Nasutitermes macrocephalus*. **b)** Termite do gênero *Nasutitermes*.



Fonte: Adaptado de (RODRIGUES, 2010)

Fonte: <https://www.flickr.com/photos/berniedup>.

2.4.3 Atividade Antibiótica

De acordo com um artigo publicado na Universidade Estadual de Ponta Grossa (GRANATO et al., 2005), extratos derivados de *Peltogyne sp.* mostraram atividade antibiótica contra bactérias patogênicas em humanos. Partindo do descarte de madeiras comercializadas no Pará, foram retirados extratos em diferentes solventes, para análise e teste em bactérias patogênicas.

O extrato foi preparado partindo de amostras da madeira seca, utilizando equipamento Soxhlet, com diclorometano seguido de metanol. O extrato de Roxinho (*Peltogyne sp.*) foi também retirado por acetato de etila e metanol. Os extratos foram separados por cromatografia em camada delgada e os componentes foram observados por luz UV, borrifando-se reagentes reveladores para grupos de terpenoides (anisaldeído, H₂SO₄), fenóis (FeCl₃) e alcaloides (Dragendorff). Foram também feitas análises qualitativas por UV/VIS em metanol para os extratos, e cada medida do espectro foi repetida adicionando-se NaOH, para confirmar a presença de compostos fenólicos por deslocamento batocrômico. O experimento sugeriu a presença de terpenos e principalmente fenóis no extrato.

As suspensões de bactérias foram padronizadas e inoculadas em meio Agar Tripton de Soja. Os extratos foram dissolvidos em DMSO, colocados em cavidades de 6 mm localizadas no centro do meio de cultura, e após incubação por 24 h, os halos de inibição do crescimento de bactérias em torno das cavidades foram medidos. Nesse estudo o extrato de acetato de etila de *Peltogyne sp.* mostrou uma inibição de 9 a 10 mm no halo de crescimento de colônias de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Micrococcus luteus*, *Proteus mirabilis*, e *Staphylococcus aureus*.

Em outra pesquisa realizada em 1961 por Lima e Maia, extraiu-se de uma árvore da espécie *Peltogyne recifensis* uma substância cristalizada, de estrutura molecular não definida, e seu comportamento sugeriu que pertencia aos compostos da classe dos flavonoides. Esse material cristalizado demonstrou propriedades antimicrobianas, apresentando uma moderada ação antibiótica contra cepas do gênero *Mycobacterium* e *Nocardia*, e uma leve reatividade contra *Bacillus mycoides*, *Sarcina lutea*, *Moraxella catarrhalis*, *Brucella suis* e *Candida stellatoidea*. (SILVA, 1976 E LIMA; MAIA, 1961).

2.4.4 Corante de Alimentos

Atualmente a indústria de alimentos está envolvida na busca por aditivos químicos não prejudiciais à saúde dos consumidores, e compostos naturais são usualmente alternativas promissoras para os componentes sintéticos. Pigmentos naturais como antocianinas, betalaínas e carotenoides são alternativas seguras e benéficas para os corantes artificiais usados na indústria. Além de não prejudiciais, esses compostos naturais têm propriedade antioxidante (MOJICA et al. 2017 E LOREDO et al. 2016), permitindo efeito preventivo de câncer (BONTEMPO et al., 2015), anti-inflamatório (SZYMANOWSKA et al. 2015) e também antimicrobiano (CISOWSKA et al. 2011). (GUTIÉRREZ-MACÍAS et al., 2019).

Um estudo realizado na Cidade do México utilizou o extrato derivado de metanol do cerne de *Peltogyne mexicana*, uma árvore nativa de Guerrero, no México, com objetivo de avaliar sua viabilidade como corante de alimentos. Assim como as espécies nativas do Brasil e da Guiana Francesa, para a *Peltogyne mexicana* foi encontrado um peltoginoide. Esse composto foi denominado peltomexicanin, uma molécula de estrutura conjugada, que aparenta coloração violeta. (GUTIÉRREZ-MACÍAS et al., 2016 E GUTIÉRREZ-MACÍAS et al., 2019).

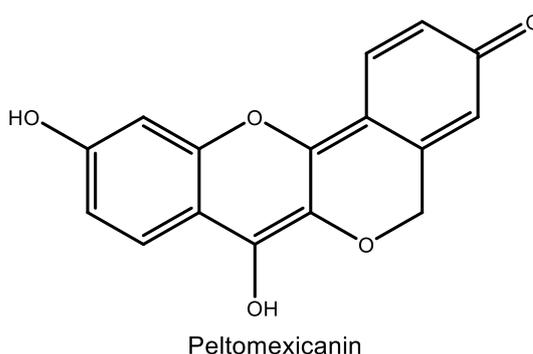
Foram feitos ensaios em organismos vivos com o pigmento peltomexicanin, primeiramente analisando a sua toxicidade em ratos e efeito mutagênico em bactérias do gênero *Salmonella*. O pigmento foi constatado como sendo seguro, não promovendo qualquer efeito tóxico ou mutagênico observado, demonstrando ser uma alternativa promissora para corantes químicos de espectro violeta usados para alimentos. O pigmento apresentou boa estabilidade em pH 3-6, uma escala viável na indústria, uma vez que os alimentos são usualmente processados entre pH 4-7, e permitiu produzir um espectro variado de colorações na faixa do violeta, testado em gelatina e iogurte (figura 11). Na figura 12 é possível notar uma extensa conjugação com ligações duplas alternadas na estrutura da peltomexicanin, justificando a energia emitida no espectro visível, observada na coloração violeta. (GUTIÉRREZ-MACÍAS et al., 2016 E GUTIÉRREZ-MACÍAS et al., 2019).

Figura 11. Alimentos contendo os pigmentos violetas extraídos e condicionados a partir do cerne de *Peltogyne mexicana*. **a)** Gelatina. **b)** Iogurte.



Fonte: Adaptado de (GUTIÉRREZ-MACÍAS et al., 2019).

Figura 12. Estrutura molecular do peltoginoide peltomexicanin.



2.4.5 Atividade Larvicida

Segundo uma pesquisa realizada recentemente (GARCIA, 2021), com objetivo de verificar atividade larvicida em *Aedes aegypti* partindo de extratos de plantas nativas brasileiras, foi feita uma análise para a espécie *Peltogyne lecointei*, a espécie estudada no presente trabalho, e seu extrato retirado por hexano apresentou atividade larvicida moderada. Foram utilizadas larvas da linhagem Rockefeller de *Aedes aegypti*, as larvas foram colocadas em placas com poços contendo, em cada, 10 larvas no estágio 3 de desenvolvimento, e então foram diretamente expostas aos extratos das plantas estudadas, com 3 mL de água e o extrato bruto a 250 ppm, tendo-se água como controle negativo. Após 24 h e 48 h os poços foram observados a fim de verificar alguma mortalidade. A exposição aos extratos brutos de *Peltogyne lecointei* não ocasionou letalidade às larvas após 24 h, contudo, após 48 h, o extrato

obtido em n-hexano resultou em uma média de mortalidade de 55%. O resultado sugere uma efetividade moderada do extrato em n-hexano de *Peltogyne lecointei*, devido à nula, ou baixa, reatividade das outras espécies estudadas, com exceção da espécie *Handroanthus incanus*, que demonstrou ser muito mais eficaz, apresentando uma mortalidade de 100% com o extrato derivado de hexano nas primeiras 24h. (GARCIA, 2021).

No mesmo estudo foram feitas análises por cromatografia gasosa dos extratos, permitindo identificar alguns compostos presentes nos extratos preparados com acetato de etila e com hexano, para as espécies estudadas. Para a espécie *Peltogyne lecointei*, foram encontradas as substâncias resorcinol, e benzaldeído, no extrato em acetato de etila, ácido 1-naftaleno pentanoico, e 3-etil-N-nitroso-2(3H)-benzotiazolimina, no extrato em hexano, e ácido 2-pentenoico em ambos os extratos. (GARCIA, 2021).

Figura 13. Ensaio para avaliação de atividade larvívica por exposição direta das larvas aos extratos brutos.



Fonte: Adaptado de (GARCIA, 2021).

2.4.6 Experimentação com pH

Um experimento realizado na Escola Estadual de Ensino Fundamental e Médio Heitor Villa Lobos (Ariquemes – RO) utilizou lascas de uma árvore do gênero *Peltogyne sp.* para produzir uma escala visual de pH, com objetivo de lecionar aos alunos sobre acidez e basicidade. Foram retiradas lascas do tronco da árvore encontrada regionalmente, que foram cortadas em cubos, para então extração com etanol por cerca de 6 horas. Em seguida, soluções tampão de pH conhecido foram

separadamente colocadas no extrato etanólico obtido, e obteve-se variabilidade na coloração do extrato de acordo com o pH do meio. Dessa forma foi possível construir uma escala de pH conforme a coloração da solução. Utilizando a escala de pH natural construída, os alunos puderam retirar amostras de diferentes materiais encontrados e avaliar sua acidez ou basicidade. (SERPA et al., 2014).

Esse experimento demonstrou a possibilidade do uso do extrato de *Peltogyne sp.* como uma ferramenta de análise qualitativa de pH, conforme reações químicas envolvendo os metabólitos presentes no extrato. (SERPA et al., 2014).

Figura 14. Soluções tampão contendo o extrato etílico de *Peltogyne sp.*



Fonte: Adaptado de (SERPA et al., 2014).

3. OBJETIVOS

A presente pesquisa visa ampliar o entendimento acerca do perfil metabólico contido na espécie *Peltogyne lecointei*, com foco na descoberta e confirmação de metabólitos secundários, especulando possíveis utilidades na medicina e indústria. A seguir são apresentados os objetivos específicos.

- I. Realizar um levantamento bibliográfico com respeito à espécie *Peltogyne lecointei*, com foco no registro de metabólitos secundários encontrados em amostras do gênero, e pesquisas demonstrando aplicabilidade industrial desses metabólitos.
- II. Partindo de uma amostra do cerne da madeira de *Peltogyne lecointei*, objetiva-se preparar o extrato, utilizando os solventes hexano, acetato de etila, e etanol.
- III. Utilizar métodos cromatográficos, como cromatografia líquida, e cromatografia em camada delgada, com objetivo de separar e avaliar os componentes químicos presentes no extrato.
- IV. Por meio de espectrometria de massas, cromatografia gasosa, e ressonância magnética nuclear de hidrogênio, objetiva-se identificar os componentes químicos do extrato que estão presentes em bancos de dados.

4. METODOLOGIA

4.1 AMOSTRA VEGETAL

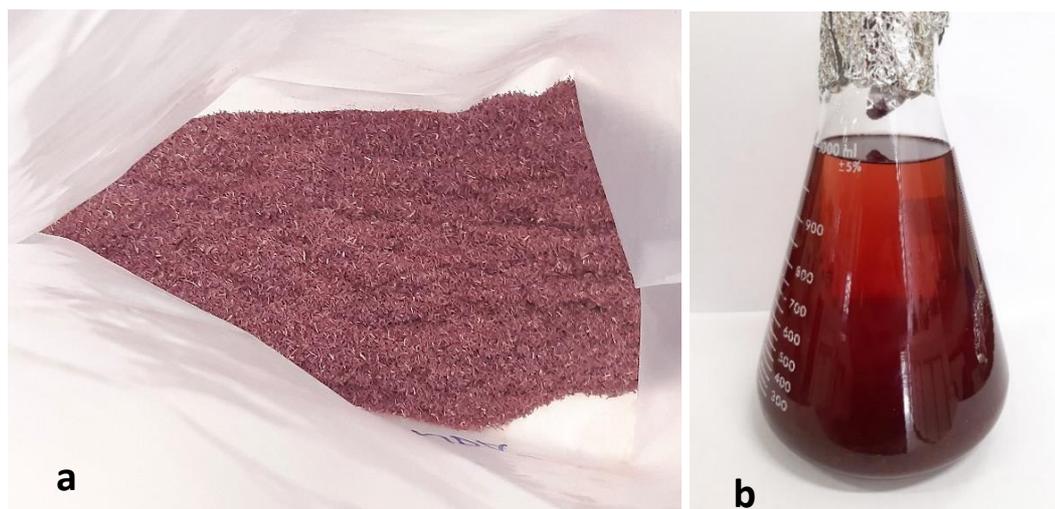
A presente pesquisa utiliza o material vegetal bruto obtido na pesquisa de Garcia, L. F. (2021), sobre o efeito de extratos de madeiras encontradas no Brasil contra larvas de *Aedes aegypti*. De acordo com a pesquisa, as amostras foram coletadas em junho de 2017 na Floresta Nacional do Jacundá, ao norte do Estado de Rondônia. Foram coletadas amostras das espécies que estavam sendo exploradas na Unidade de Manejo Florestal de Jacundá, e o processamento foi realizado no laboratório do instituto florestal. Os troncos das árvores obtidos foram cortados em discos, e as espécies foram identificadas pelos botânicos taxonomistas Carlos Alberto da Silva e Luiz Carlos Lobato. Para cada disco foi retirado um corte de cunha de aproximadamente um quarto de seu diâmetro, as cunhas foram então aplainadas e moídas em um moinho de facas do tipo Willey. O material foi então padronizado com um agitador de peneiras Bertel, com peneiras de 40 e 60 mesh, e foi utilizado o material que ficou retido na peneira de 40 mesh. (GARCIA, 2021).

4.2 PREPARO DOS EXTRATOS

A madeira triturada e padronizada foi protegida da luz, ar, e umidade, desde o momento de sua coleta até durante a execução da presente pesquisa, para evitar alterações moleculares e decomposição do material. Os extratos foram preparados conforme exposição da madeira a diferentes solventes com polaridades distintas. O material passou por nove extrações, sem troca do material vegetal, visando a retirada de componentes presentes nas células vegetais, conforme a afinidade química das moléculas em cada solvente. Foram colocados aproximadamente 100 g do material vegetal em frascos Erlenmeyer de 1 L, preenchendo-se na sua totalidade com o solvente escolhido. O primeiro extrato foi preparado com o solvente acetato de etila, o segundo extrato por uma mistura de acetato de etila com etanol em proporções iguais, em seguida foram feitos extratos com etanol puro até clareamento da solução, e por fim foi utilizado hexano. Adicionalmente, para algumas das extrações, foi utilizado banho ultrassônico, método que fornece energia cinética ao sistema sem requerer adição de calor, aumentando a colisão dos componentes químicos com o

solvente, e melhorando o rendimento da extração. Foi preparado um total de 9 extratos, sendo quatro feitos com etanol, dois preparados com hexano, e também um extrato puramente em hexano com renovação do material vegetal.

Figura 15. a) Cerne de *Peltogyne lecointei* triturado e padronizado. **b)** Extrato etanólico obtido pela exposição direta da madeira ao solvente.



Cada extrato foi filtrado com um funil de Büchner de vidro, que contém uma placa porosa, utilizando-se um sistema de vácuo acoplado à um Kitasato para auxiliar a filtragem. O material filtrado foi transferido para um balão volumétrico, e submetido à rotaevaporação, com objetivo de retirar parte do solvente e concentrar o extrato. O extrato restante foi transferido para um frasco âmbar de 30 mL previamente pesado, e então deixado na capela de exaustão do laboratório, para que o solvente restante fosse evaporado, até completa secagem do extrato. O mesmo procedimento foi repetido para todos os extratos preparados nos diferentes solventes. Frascos de vidro âmbar foram escolhidos devido à sua capacidade de proteger componentes químicos fotossensíveis para luz visível, ultravioleta, e infravermelho. Após secagem, os frascos foram devidamente selados, e colocados no congelador do laboratório, para assim reduzir a ocorrência de alterações moleculares, como a degradação natural dos metabólitos contidos nos extratos.

Figura 16. a) Extrato hexânico do cerne de *Peltogyne lecointei* em banho ultrassônico. **b)** Sistema de filtração para o extrato obtido em hexano.



Figura 17. Sistema de rotaevaporação, utilizado para retirada da maior parte do solvente adicionado na preparação do extrato.



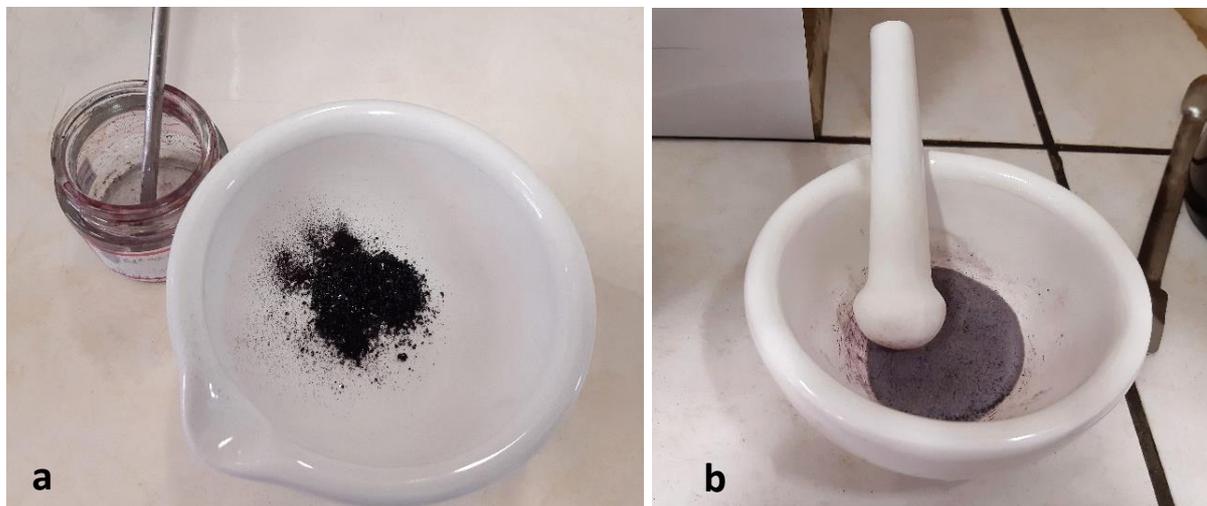
Figura 18. Balão volumétrico contendo extrato etanólico do cerne de *Peltogyne lecointei* após rotaevaporação do solvente.



4.3 CROMATOGRAFIA EM COLUNA

Com objetivo de separar os componentes químicos presentes em cada extrato, foi feita uma separação por cromatografia em coluna. O método consiste na utilização de uma coluna de vidro que é preenchida com sílica, a amostra é então colocado sobre a superfície de sílica, e em seguida a coluna é preenchida com solvente, usualmente fazendo-se um gradiente de polaridade. Dessa forma são obtidas frações de moléculas distintas, conforme interação dos componentes químicos da amostra com cada solvente utilizado, sendo os solventes a fase móvel do método, e a coluna de sílica a fase estacionária. O preparo das amostras foi feito com aproximadamente 120 mg dos extratos secos contidos nos frascos âmbar, fazendo-se uma mistura com pó de sílica, com auxílio de hexano e um almofariz para completa homogeneização da amostra (figura 19). Os solventes utilizados na cromatografia foram hexano, acetato de etila, e etanol. As proporções de solvente foram variadas conforme o correr das colunas, usualmente aumentando-se 10% na proporção do solvente mais polar para cada fração.

Figura 19. a) Extrato seco de *Peltogyne lecointei* preparado com acetato de etila e etanol (50:50). **b)** Preparo da amostra para cromatografia em coluna, contendo o extrato seco e sílica, após homogeneização.



Cada fração foi coletada em balões de fundo redondo de 200 a 500 mL. O balão foi então acoplado em um rotaevaporador, para retirada do solvente e concentração das frações do extrato. As frações foram por fim transferidas para frascos âmbar, e deixadas por alguns dias na capela de exaustão do laboratório, para completa secagem das frações.

Figura 20. a) Cromatografia em coluna preparada com sílica, para fracionamento do extrato de *Peltogyne lecointei* obtido com acetato de etila e etanol.



Figura 21. Cromatografia em coluna para o extrato obtido em acetato de etila com etanol. Pode-se observar cores diferentes, variando do amarelo para o verde conforme o decorrer da separação. As colunas subsequentes apresentaram colorações semelhantes.



Adicionalmente foi feito um experimento com cromatografia flash a seco, para o segundo extrato etanólico. Esse método consiste também no uso de uma coluna de vidro utilizando sílica como fase estacionária, porém foi utilizada uma coluna de maior diâmetro, e cada fração é coletada após a total passagem do solvente pela coluna de sílica, até completa secagem do sistema. Este método demonstrou requerer uma quantia consideravelmente menor de tempo de operação, mas sua eficiência não foi comparada com o método anterior neste trabalho.

Figura 22. Frações do extrato etanólico de *Peltogyne lecointei*, obtidas por cromatografia flash a seco, e seladas em frascos âmbar.



4.4 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

Cada fração foi posteriormente analisada por cromatografia em camada delgada (CCD). Para isso foram utilizadas placas de sílica, nas quais foram colocadas pequenas quantias das frações obtidas na cromatografia em coluna, adicionando-se etanol para dissolução das frações secas. Para separação dos componentes conforme a CCD, foram preparadas diferentes proporções de hexano com acetato de etila, aumentando-se a polaridade de acordo com as frações obtidas durante o fracionamento por cromatografia em coluna. As placas foram observadas em luz UV de 254 e 365 nm.

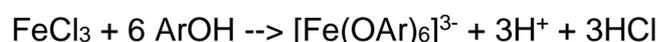
O método permitiu avaliar o fracionamento, observando-se a quantia de componentes diferentes em cada fração, e as frações que apresentaram o mesmo perfil cromatográfico foram transferidas para o mesmo frasco âmbar para as análises posteriores. Por fim, as frações foram transferidas dos frascos âmbar para recipientes eppendorf previamente pesados, utilizando-se etanol como solvente de dissolução, e então os frascos foram deixados para secagem na capela de exaustão. O uso de frascos eppendorf permite melhor armazenamento das pequenas quantias de amostras obtidas, ajuda a evitar maiores contaminações, e também facilita a coleta para análises posteriores.

4.5 ANÁLISES FITOQUÍMICAS QUALITATIVAS

Com objetivo de identificar grupos de metabólitos presentes na madeira, foram feitas análises visuais qualitativas, utilizando-se o extrato seco que foi obtido por acetato de etila e etanol, e fazendo-se os testes de acordo com os reagentes relatados na literatura. Foi feita uma pesquisa para se obter os métodos e reagentes que poderiam indicar a presença de cada grupo de metabólitos encontrados nas plantas, verificando-se a possibilidade de preparo dos testes em laboratório.

4.5.1 Taninos e Fenóis

Uma pequena quantia do extrato foi colocada em um tubo de ensaio e dissolvida em etanol até homogeneização. Foram adicionadas gotas de uma solução aquosa de cloreto de ferro 1 g/L. O aparecimento de uma coloração azul escura indica a presença de fenóis (PRASHANT et al., 2011) e/ou taninos (EVANS, 2002). Como controle positivo o teste foi realizado para o fenol. Abaixo pode ser observada a reação geral de complexação de compostos fenólicos em meio aquoso com FeCl_3 .



4.5.2 Saponinas

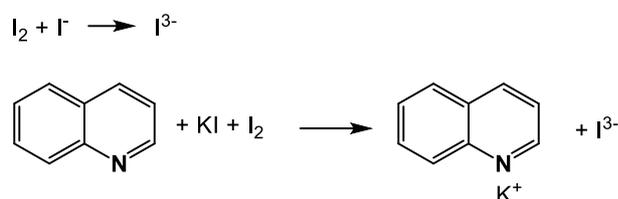
Ao extrato em metanol foi adicionada água destilada e clorofórmio, e então a solução foi filtrada. Ocorre assim a formação de duas fases. A fase aquosa superior foi agitada observando-se a formação de espuma. Para comparação, o teste foi feito também com digitonina, uma saponina esteroidal, observando-se a formação de espuma persistente sob mesmas condições.

4.5.3 Alcaloides

Para o grupo de alcaloides, foi utilizado o teste de Wagner. O extrato seco foi colocado em um tubo de ensaio seguido por ácido clorídrico diluído, e assim foi deixado por alguns minutos. Observando-se coloração no meio e presença de partículas sólidas apenas ao fundo, adicionou-se uma solução contendo iodeto e

iodeto de potássio (reagente de Wagner). A formação imediata de um precipitado vermelho ou marrom indica a presença de alcaloides (KUMAR et al., 2014).

Figura 23. Mecanismo de reação da quinolina, um alcaloide, ao reagente de Wagner.



4.5.4 Flavonoides

No teste para flavonoides foram observadas mudanças de coloração de acordo com o pH do meio. Na análise utilizou-se soluções aquosas de hidróxido de sódio, ácido clorídrico, e ácido sulfúrico. Na adição de hidróxido de sódio, deve-se observar uma mudança de coloração, que é diferente do tom avermelhado observado para acidificação do meio com ácido clorídrico ou ácido sulfúrico (EVANS, 2002).

4.5.5 Antocianinas

Uma pequena quantia de extrato foi dissolvida em etanol, e então foi adicionado ácido clorídrico, seguido de um leve aquecimento, e por fim adicionou-se amônia, por meio de hidróxido de amônio diluído. O aparecimento de uma tonalidade rosa avermelhada que se torna azul ou violeta indica a presença de antocianinas (HARSHA et al., 2014).

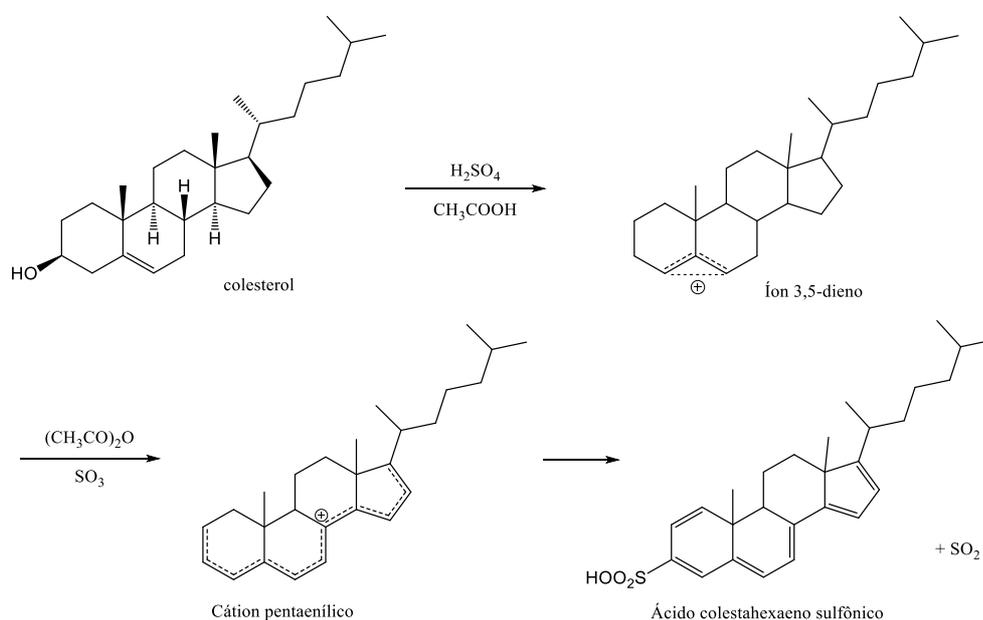
4.5.6 Leucoantocianinas

O extrato foi colocado em um tubo de ensaio, e então foi deixado por alguns minutos com água destilada em banho ultrassônico. Em seguida a solução foi filtrada e adicionou-se álcool isoamílico (3-metil-butan-1-ol), observando-se mudança de coloração. A formação de coloração na fase superior indica a presença de leucoantocianinas (HARSHA et al., 2013).

4.5.7 Terpenoides e esteroides

Para a identificação de terpenoides e/ou esteroides foi utilizado o teste de Liebermann-Burchard, teste comumente utilizado na identificação de colesterol e terpenos. O extrato foi diluído em etanol, e então foram adicionadas algumas gotas de anidrido acético, seguido de ácido sulfúrico. O aparecimento de uma coloração rosa ou violeta indica a presença de terpenoides (SOFOWORA, 1993).

Figura 24. Mecanismo da reação de Liebermann–Burchard para o colesterol.



4.5.8 Esteroides

Em um novo teste para esteroides foi utilizado o método de Salkowski. Ao extrato aquoso foi adicionado clorofórmio e ácido sulfúrico diluído, seguido de agitação. Deve ocorrer a formação de uma fase avermelhada, e uma fase amarelada fluorescente caso tenha-se esteroides em solução (HARSHA et al., 2013).

4.5.9 Quinonas

Para o teste de quinonas a literatura sugere que a adição de hidróxido de sódio ocasiona a formação de coloração azul esverdeada ou vermelha na presença de quinona (SALNA et al., 2011). Na adição de ácido clorídrico concentrado, ocorre a formação de um precipitado amarelado quando há quinona em solução (KUMAR et al., 2014).

4.5.10 Antraquinonas

Para verificar a presença de antraquinonas no extrato foi feito o teste de Borntrager. Para a solução etanólica do extrato, foi adicionado clorofórmio, e então uma solução de hidróxido de amônio diluído para observação de mudança de cor. Uma coloração rosa, vermelha, ou violeta indica a presença de antraquinonas livres (SOFOWORA, 1993).

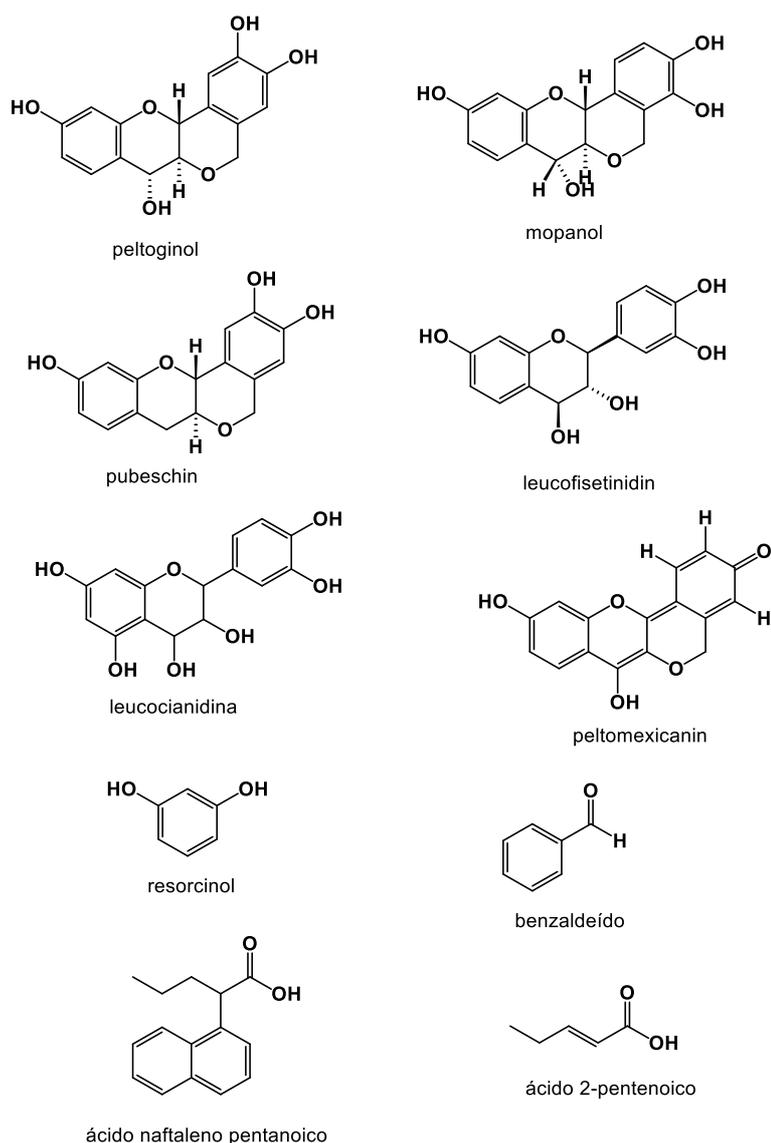
4.6 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Cinco amostras de extrato bruto foram enviadas para análise por ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio em 600 MHz. As amostras analisadas foram os extratos preparados com os solventes acetato, acetato com etanol, e os três primeiros extratos em etanol puro. Para reduzir a interferência na análise por conta de solventes restantes na amostra, cada extrato foi deixado por algumas horas em um sistema de vácuo, utilizando-se um pequeno balão volumétrico acoplado à uma bomba. Após obtenção do extrato seco, foi feito um teste de dissolução do extrato em solvente clorofórmio deuterado, e o extrato demonstrou ser pouco solúvel, mesmo com auxílio de ultrassom. Os extratos foram então dissolvidos em solvente DMSO deuterado, e enviados para análise na Central Analítica do Instituto de Química da UnB (CAIQ). Para a análise foi utilizado um espectrômetro de ressonância magnética nuclear de 600 MHz, modelo Magneto Ascend 600, com console Avance III HD.

Os espectros obtidos foram analisados utilizando-se o software MestReNova. Devido à complexidade dos dados obtidos, foi feita uma análise geral comparativa, utilizando-se como base as possíveis moléculas encontradas na literatura para o gênero *Peltogyne sp.* (figura 25), e também algumas moléculas encontradas por

análise de cromatografia gasosa feita para a espécie *Peltogyne lecointei* na pesquisa sobre metabólitos larvicidas em *Aedes aegypti*, mencionada anteriormente (GARCIA, 2021). Os softwares ChemDraw e Mnova foram utilizados para auxiliar na predição de picos para os hidrogênios presentes nessas moléculas, e assim foi feito um comparativo dos sinais que pudessem pertencer a essas moléculas. Sinais presentes na predição e na análise são indicativos de que os metabólitos podem estar presentes nos extratos analisados. Com objetivo de simplificar a análise dos componentes, foi selecionado apenas o espectro obtido para o segundo extrato, preparado em acetato de etila com etanol em iguais proporções, que mostrou conter os compostos presentes nos outros extratos analisados.

Figura 25. Moléculas utilizadas como referência na análise de RMN 1H dos extratos.



4.7 ANÁLISE DE GC-MS PARA EXTRATO EM HEXANO

Devido à notável volatilidade dos extratos em hexano obtidos durante a preparação para coluna, baixo rendimento de extrato, bem como um aroma diferenciado, observado nas frações iniciais da cromatografia em coluna obtidas em hexano, decidiu-se fazer uma nova análise para o extrato em hexano. Foram pesados 9,08 g de madeira para extração com 60 mL de hexano, utilizando-se um Erlenmeyer, e então o sistema foi deixado por dois dias com constante agitação por barra magnética, sem aquecimento. Após procedimento de rotaevaporação, observou-se o rendimento do extrato. Em seguida, para verificar a presença de componentes químicos, foi feita uma análise por CCD, utilizando-se para o método uma mistura do solvente hexano com 10% de acetato de etila.

Com esses dados, optou-se por uma análise de cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massas (GC-MS), para análise de compostos voláteis, como, por exemplo, uma classe de metabólitos conhecidos por sesquiterpenos. Foram preparadas duas amostras em concentrações diferentes, uma contendo 1 µl da solução em hexano, e outra contendo 10 µl, completando-se o frasco de análise na marcação de 1 mL, e também foi feito um branco contendo apenas hexano. Para a análise foi utilizado um equipamento da marca Shimadzu, com modelo de cromatógrafo GC-2010, detector GCMS-QP2010 Plus, injetor AOC-5000, com coluna padrão do equipamento. As condições de análise foram as seguintes, fluxo de hélio a 1 mL/min, modo split (1:6), com injetor e detector a 200 °C, e range de massas de 50 a 500 m/z. A rampa foi feita com início em 60 °C até 240 °C, aumentando a uma taxa de 3 °C/min, com tempo de 1 hora.

Por meio do software LabSolutions GCMS da marca Shimadzu, juntamente com uma biblioteca NIST integrada para espectros de massas, foi possível determinar possíveis componentes presentes no extrato analisado.

5 RESULTADOS E ANÁLISES

5.1 PREPARO DO EXTRATO

Os extratos preparados em etanol e acetato de etila mostraram uma forte coloração vermelha, e os extratos preparados em hexano permaneceram praticamente incolores. A tabela abaixo contém as massas e rendimentos dos extratos secos.

Tabela 1. Rendimento dos extratos do cerne de *Peltogyne lecointei* de acordo com o solvente utilizado na extração, partindo da massa inicial de 100,02 g de madeira.

Extrato	Solvente	Massa (g)	Rendimento (%)
1	Acetato de etila	1.2472	1.25
2	EtOAc / EtOH	1.781	1.78
3	Etanol	2.4273	2.43
4	Etanol	0.4848	0.48
5	Etanol	0.558	0.56
6	Etanol	0.6731	0.67
Total Etanol	Etanol	4.1432	4.14
7	Hexano	0.243	0.24
8	Hexano	0.7791	0.78
Total Hexano	Hexano	1.0221	1.02

5.2 CROMATOGRAFIA EM COLUNA

O método utilizado permitiu separação dos compostos de polaridades diferentes, que foram verificados posteriormente por CCD, porém, não foi possível um bom acompanhamento por coloração visível na coluna, pois a amostra gerou tonalidades concentradas de verde, amarelo, e violeta, que constantemente se misturavam na coluna. Além disso o método demonstrou requerer bastante tempo para sua completa finalização, o que dificulta a experimentação com uma maior quantidade de frações por solventes de diferentes polaridades, uma vez que esse método de separação idealmente deve ser iniciado e completo no mesmo dia, para evitar maiores perturbações no sistema. Outro ponto observado é que, conforme as

primeiras adições de acetato de etila, surge uma reação exotérmica devido à adsorção do acetato de etila com a sílica presente na coluna, podendo gerar pontos onde a coluna de sílica se torna seca, gerando perturbação no sistema de separação.

5.3 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)

O método permitiu avaliar de forma generalizada a separação por cromatografia em coluna. O fracionamento demonstrou-se adequado, mas não ideal para o isolamento de determinados compostos, uma vez que muitas das frações tiveram componentes similares e misturas. Abaixo podem ser observadas imagens do método, vale mencionar que as imagens possuem placas que foram utilizadas mais de uma vez aumentando-se a polaridade dos solventes, e portanto alguns dos componentes já são observados acima da faixa de diferenciação. A maioria dos componentes químicos presentes foram visíveis na lâmpada de 254 nm, e alguns interagiram em 365 nm.

Figura 26. a) Cromatografia em camada delgada para as frações do extrato etanólico de *Peltogyne lecointei* observadas em luz ambiente. **b)** Placas do fracionamento do extrato de acetato de etila observadas na luz de 254 nm. **c)** Fracionamento do extrato em etanol observado na luz de 254 nm. **d)** Fracionamento do extrato em etanol observado na luz de 365 nm.

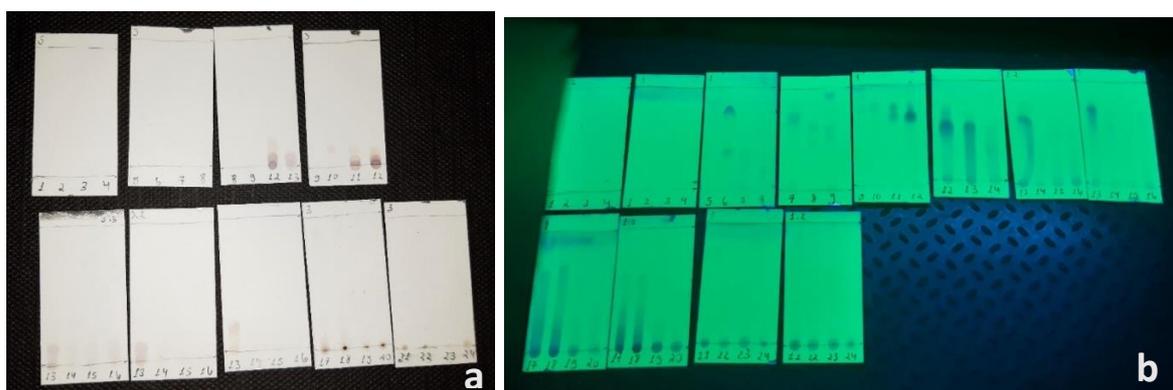


Tabela 2. Massa final para cada fração após secagem.

Fração	Massa (mg)	Fração	Massa (mg)	Fração	Massa (mg)
1.1.1	1.6	1.2.5	20.4	1.3.1	0.9
1.1.6	2.2	1.2.6	20.1	1.3.2	13.2
1.1.7	1.2	1.2.7	17.7	1.3.3	2.4
1.1.8	1.9	1.2.8	23.8	1.3.7	3.2
1.1.9	1.7	1.2.9	17.6	1.3.8	1.5
1.1.10	6.2	1.2.12	32.3	1.3.10	3.3
1.1.11	2.1	1.2.13	18.2	1.3.11	38.8
1.1.14	12.8	1.2.17	19.4	1.3.14	6.5
1.1.17	0.8	1.2.18	18.7	1.3.17	9.7
1.1.19	8.8	1.2.21	18.7	1.3.19	20.5
		1.2.25	22.7	1.3.21	13.4

5.4 ANÁLISES FITOQUÍMICAS QUALITATIVAS

Os testes fitoquímicos qualitativos realizados foram suficientemente responsivos, permitindo avaliação da possibilidade, confirmação, ou negação, da presença de grupos de metabólitos conhecidos.

Tabela 3. Resultados de testes fitoquímicos qualitativos para o extrato de madeira da espécie *Peltogyne lecointei*, obtido em acetato de etila com etanol.

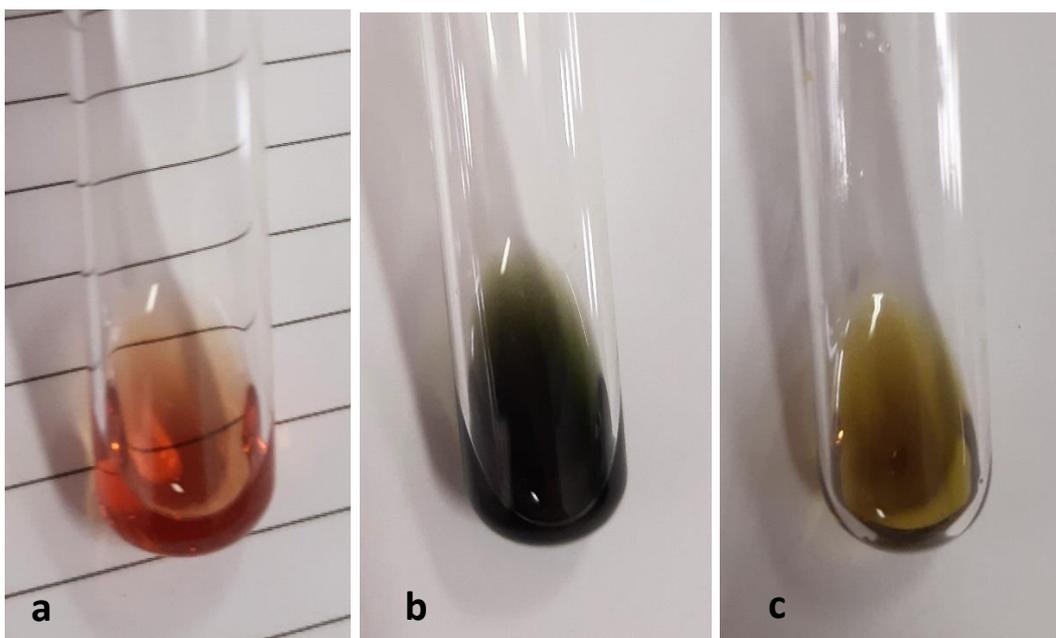
Constituintes	Teste	Resultado
Taninos e fenóis	FeCl ₃	positivo
Saponinas	Espuma em fase aquosa	negativo
Alcaloides	Reagente de Wagner	negativo
Flavonoides	pH	positivo
Antocianinas	HCl e amônia	positivo
Leucoantocianinas	Álcool isoamílico	positivo
Terpenoides e esteroides	Liebermann-Burchard	positivo
Esteroides	Salkowski	inconclusivo

Quinonas	HCl e NaOH	negativo
Antraquinonas livres	Borntrager	negativo

5.4.1 Taninos e Fenóis

Na adição de cloreto de ferro a solução tornou-se esverdeada escura, e com o tempo tornou-se quase preta, com presença de precipitado, portanto seu resultado foi positivo para compostos fenólicos. O mesmo teste foi feito para o fenol como controle positivo, e apresentou mudança de coloração semelhante.

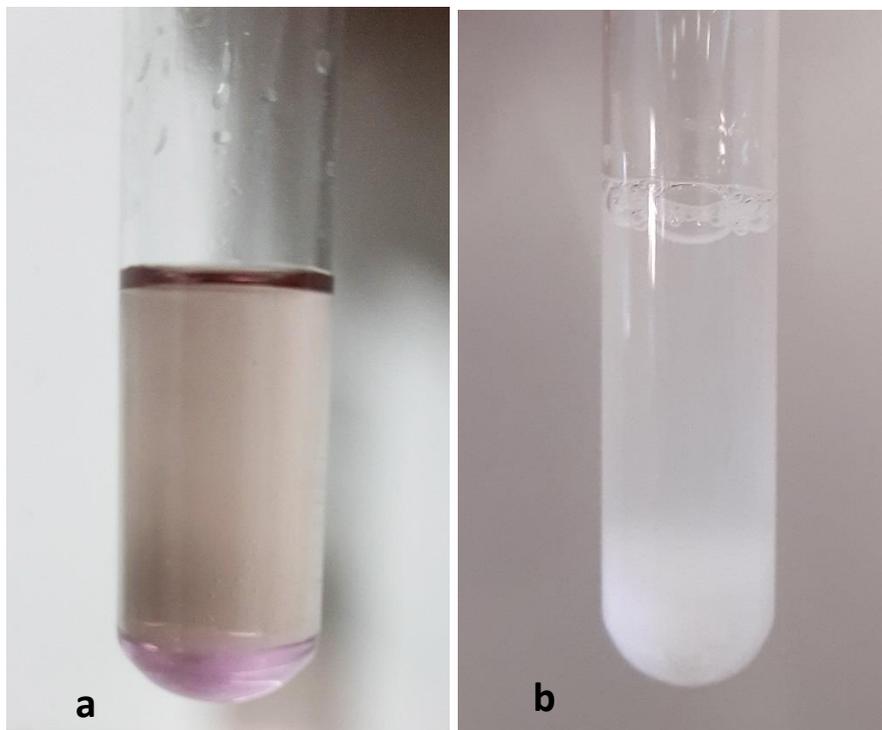
Figura 28. **a)** Extrato em etanol. **b)** Solução (a) com adição de FeCl_3 . **c)** Fenol sob mesmas condições.



5.4.2 Saponinas

O teste para saponinas foi negativo, pois não demonstrou a persistência de espuma após agitação da fase aquosa. Como controle positivo foi feito o mesmo teste para a digitonina, e para esta foi observada a persistência de espuma após agitação.

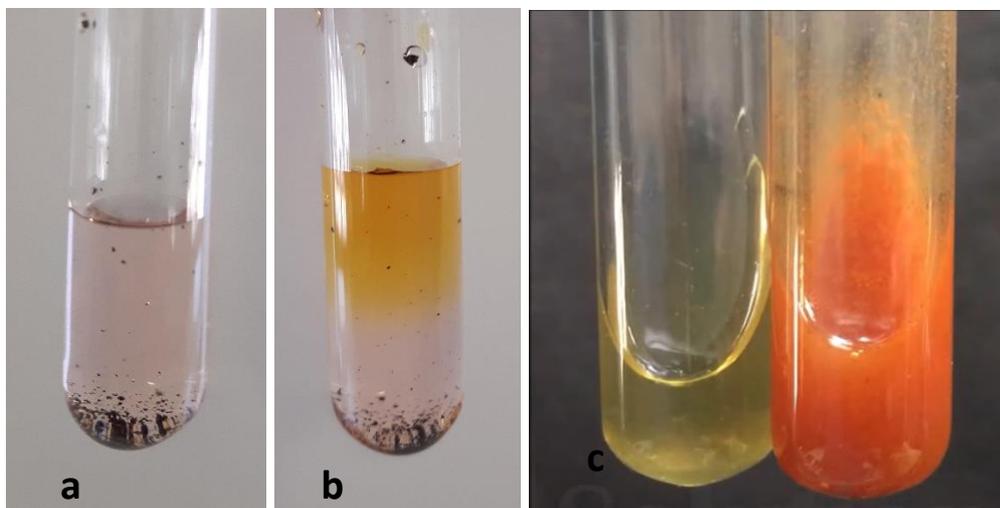
Figura 29. a) Extrato submetido a agitação após separação de fase aquosa, não há formação de espuma. **b)** Digitonina sob mesmas condições de teste, após agitação observa-se formação de espuma.



5.4.3 Alcaloides

Na adição do reagente de Wagner, a solução mostrou coloração amarelada, com aparecimento de um precipitado cinza após alguns minutos, porém não observou-se precipitado amarelado. Dessa forma o teste foi considerado negativo para alcaloides.

Figura 30. a) Extrato em ácido clorídrico. b) solução (a) com adição de reagente de Wagner. c) Reação demonstrada na literatura, com formação imediata de precipitado.

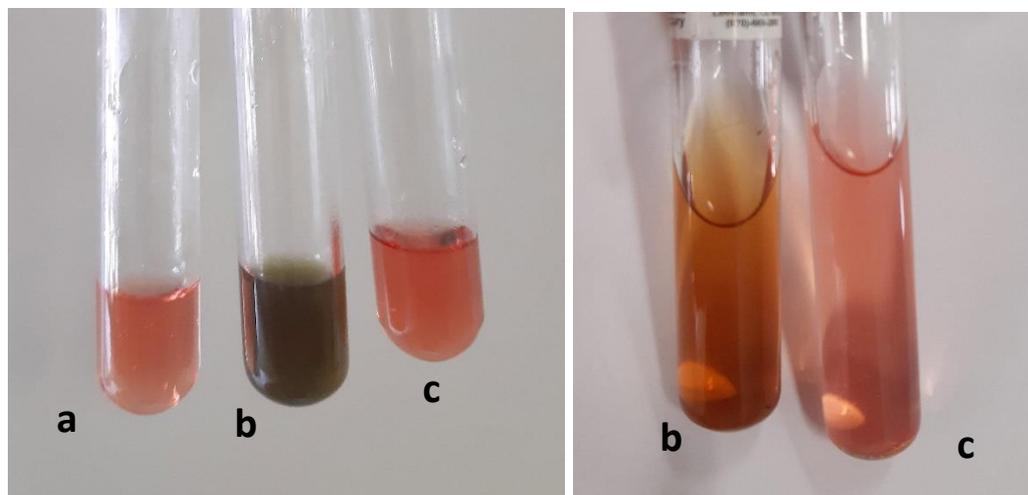


Fonte: <https://youtu.be/kDB6ohp7NV4>.

5.4.4 Flavonoides

Na adição de hidróxido de sódio observou-se um escurecimento com formação de tonalidade verde, e com adição de ácido clorídrico sua cor retornou à coloração inicial. Em solução diluída de hidróxido de sódio a solução apresentou coloração marrom. Na adição de apenas ácido clorídrico ao extrato a solução tomou uma coloração vermelha. De acordo com a literatura esse é um comportamento característico para os flavonoides (EVANS, 2002). Essas colorações também estão de acordo com o estudo de pH feito com extrato de *Peltogyne sp.* mencionado anteriormente (SERPA et al., 2014). Outro teste realizado foi com acidificação por ácido sulfúrico, no qual foi observada também uma coloração avermelhada, que está de acordo com a literatura (KUMAR et al., 2014). Considerando essas observações, juntamente com a incidência de flavonoides para o gênero *Peltogyne spp.*, como descrito na literatura, o teste foi considerado positivo para flavonoides.

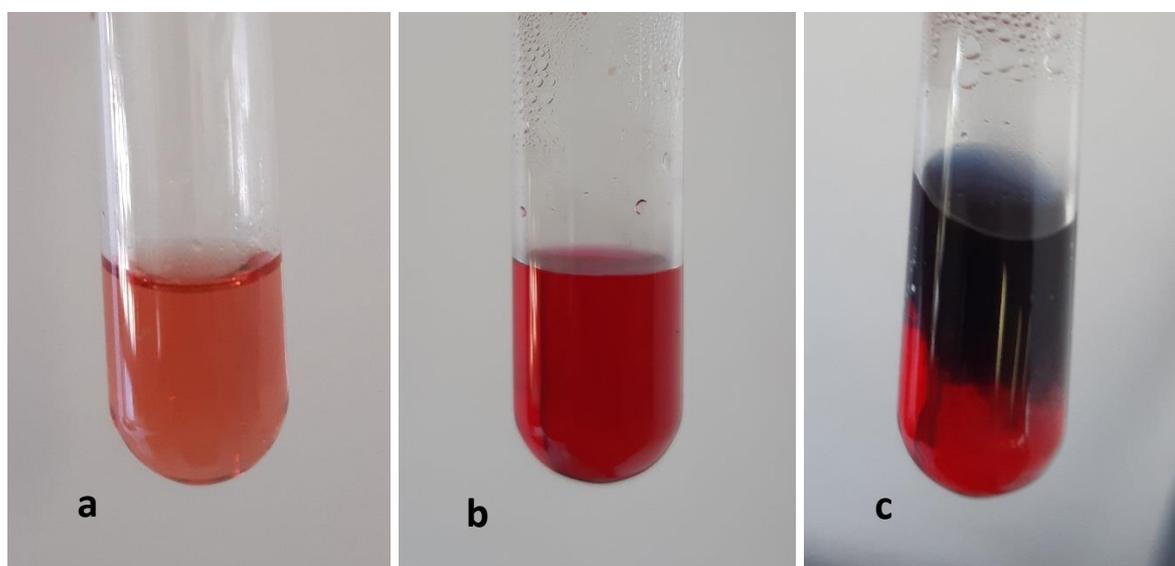
Figura 31. Extrato com etanol e adição de: **a)** Ácido sulfúrico. **b)** Hidróxido de sódio. **c)** Ácido clorídrico.



5.4.5 Antocianinas

Na adição de hidróxido de amônia a solução mostrou formação de uma tonalidade violeta escura, que está de acordo com o comportamento descrito para antocianinas na literatura (HARSHA et al., 2014). Portanto o teste foi positivo para antocianinas.

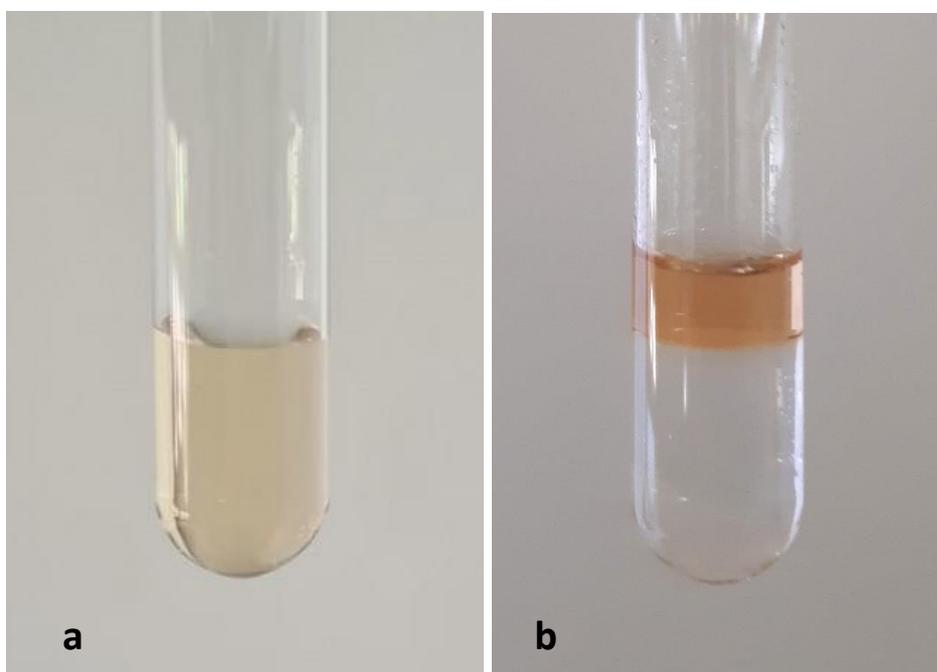
Figura 32. **a)** Extrato em etanol e ácido clorídrico. **b)** Solução (a) com aquecimento. **c)** Solução (b) com adição de amônia.



5.4.6 Leucoantocianinas

Após adição de álcool isoamílico e agitação, foi observada coloração na fase alcoólica superior. Não foi encontrada referência visual para o teste na literatura, e considerando a incidência de leucoantocianidinas para o gênero *Peltogyne* sp. como mencionado anteriormente no trabalho, o teste foi considerado positivo.

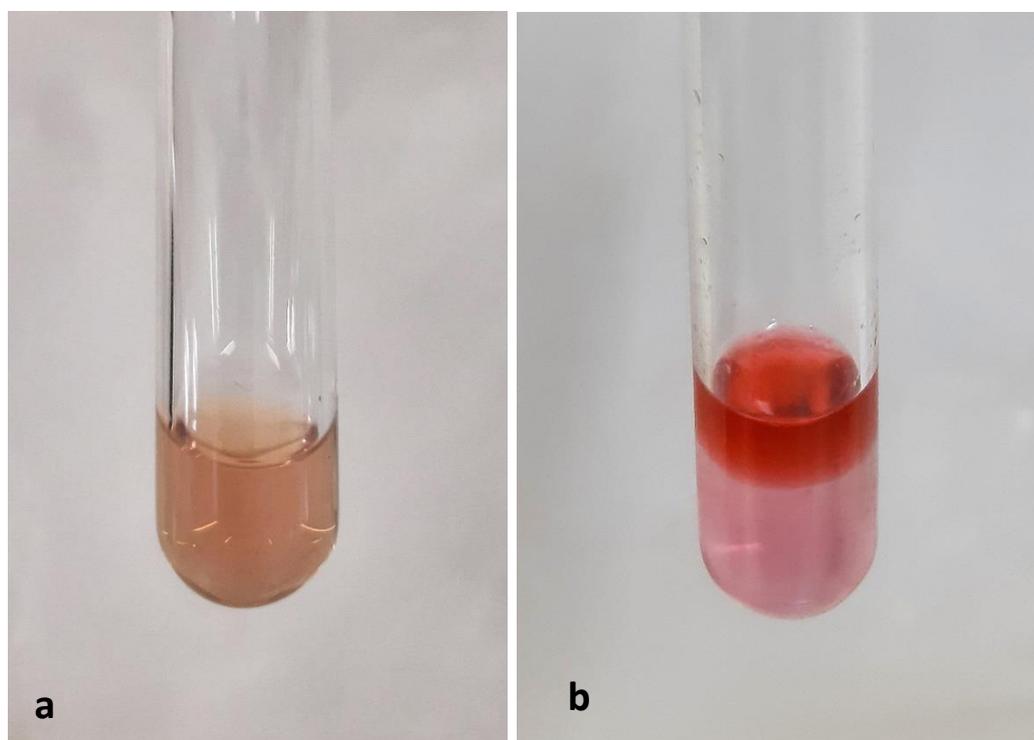
Figura 33. a) Extrato em água destilada após filtração. b) Adição de álcool isoamílico e agitação.



5.4.7 Terpenoides e esteroides

O teste de Liebermann-Burchard resultou na formação de um anel de coloração vermelha, distinta da observada apenas para o meio ácido, sendo um indicativo para a presença de terpenoides no extrato (SOFOWORA, 1993).

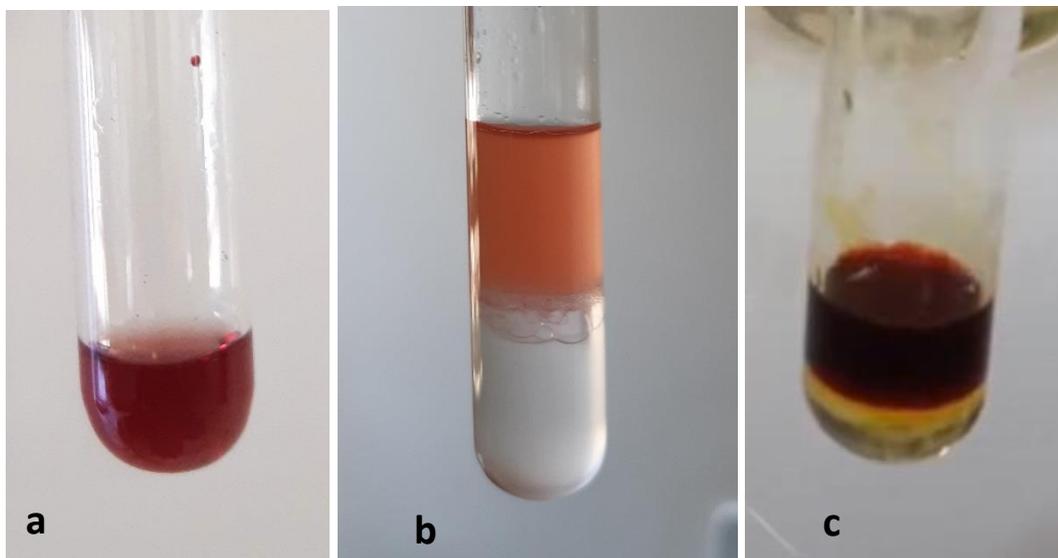
Figura 34. a) Extrato em etanol e anidrido acético. **b)** Solução (a) após adição de H_2SO_4 .



5.4.8 Esteroides

Por meio do método de Salkowski foi observada a formação de um anel avermelhado, e uma fase levemente fluorescente na lâmpada de 365 nm. Devido à característica avermelhada de flavonoides em meio ácido, é necessário realizar outros testes antes de concluir a presença ou ausência de esteroides no extrato.

Figura 35. a) Extrato em etanol. **b)** Extrato aquoso sob o teste de Salkowski. **c)** Teste de Salkowski para o colesterol.



Fonte: https://youtu.be/T56xyG1_P4Q.

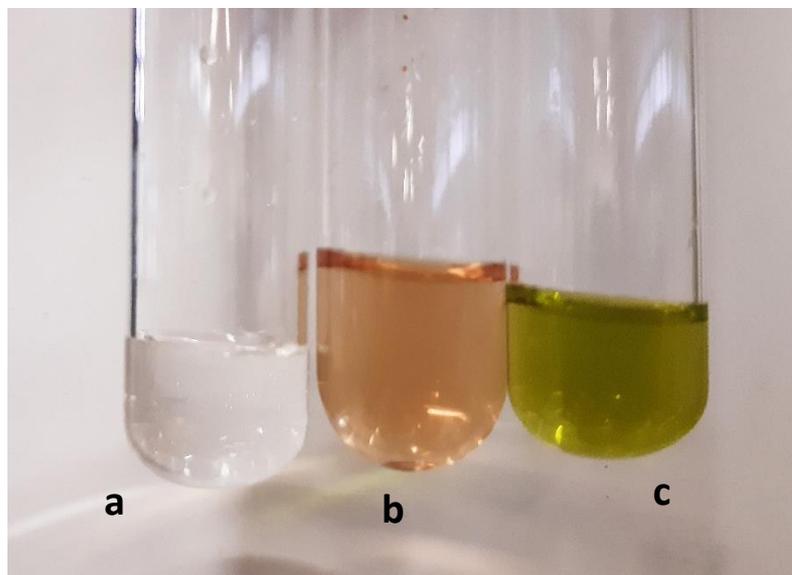
5.4.9 Quinonas

Os mesmos reagentes, hidróxido de sódio e ácido clorídrico, foram utilizados nos testes para flavonoides, e não houve observação de coloração azul esverdeada ou vermelha em hidróxido de sódio, ou precipitado amarelado na adição de HCl. Portanto, segundo esses testes, pode-se concluir que não há presença significativa de quinonas no extrato analisado.

5.4.10 Antraquinonas

Conforme adição de amônia, a coloração observada foi de esverdeada a amarelo, e laranja, ao invés da coloração rosa, vermelha, ou violeta proposta para o teste. Portanto o teste foi considerado negativo para antraquinonas livres.

Figura 36. a) Controle negativo para o teste, não contendo extrato. **b)** Extrato em etanol. **c)** Solução (b) tratada com clorofórmio e amônia



5.5 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Os espectros obtidos por RMN de hidrogênio sugerem uma certa diversidade de moléculas, incluindo diferentes classes de metabólitos. Também é notada alguma contaminação por solvente, incluindo água devido ao solvente DMSO. Abaixo pode ser observado um comparativo dos espectros obtidos para os cinco extratos analisados (figuras 37-40), e nota-se uma grande semelhança para os picos encontrados, sendo um forte indicativo para compostos semelhantes presentes em todos os extratos. Dessa forma, para simplificação da análise, foi selecionado apenas o gráfico obtido para o segundo extrato, preparado em acetato de etila com etanol em iguais proporções. Para análise das moléculas mencionadas (figura 25), foi feito um comparativo de predições calculadas por software para o RMN das moléculas, com o espectro experimental obtido para o extrato. Abaixo, os espectros para as moléculas apresentam em preto os sinais obtidos experimentalmente para o extrato, e alguns deles possuem em azul os sinais obtidos por predição que não foram encontrados experimentalmente. As moléculas possuem em azul o sinal predito em ppm, e os picos destacados no espectro para os sinais experimentais do extrato estão acompanhados de uma aproximação para sua multiplicidade e o valor do deslocamento em ppm.

Figura 37. Comparação dos gráficos obtidos na análise por RMN de ^1H , 600 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, dos cinco primeiros extratos, na faixa de 9,2 a 12,5 ppm.

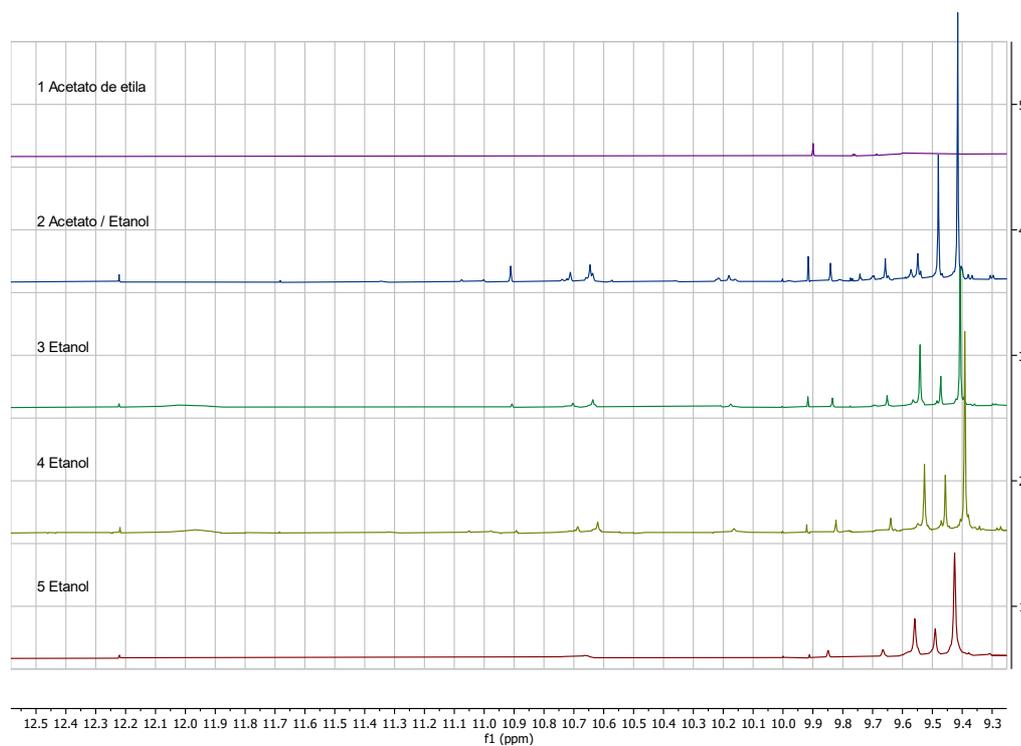


Figura 38. Comparação dos gráficos obtidos na análise por RMN de ^1H , 600 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, dos cinco primeiros extratos, na faixa de 6 a 9,2 ppm.

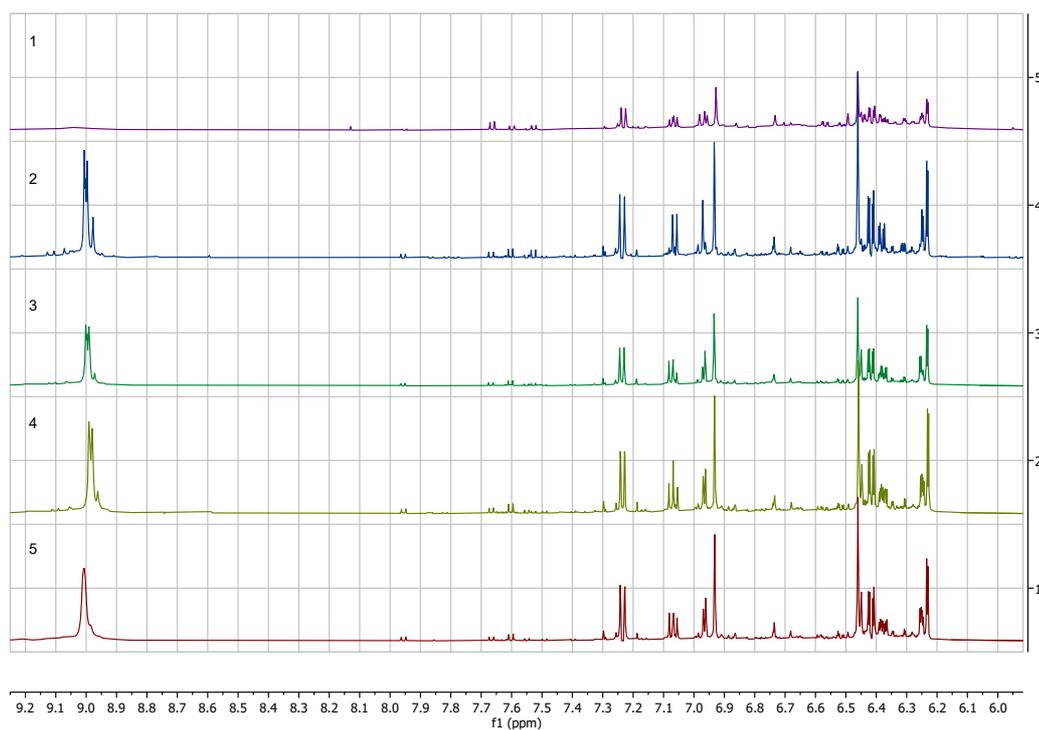


Figura 39. Comparação dos gráficos obtidos na análise por RMN de ^1H , 600 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, dos cinco primeiros extratos, na faixa de 2,8 a 6 ppm.

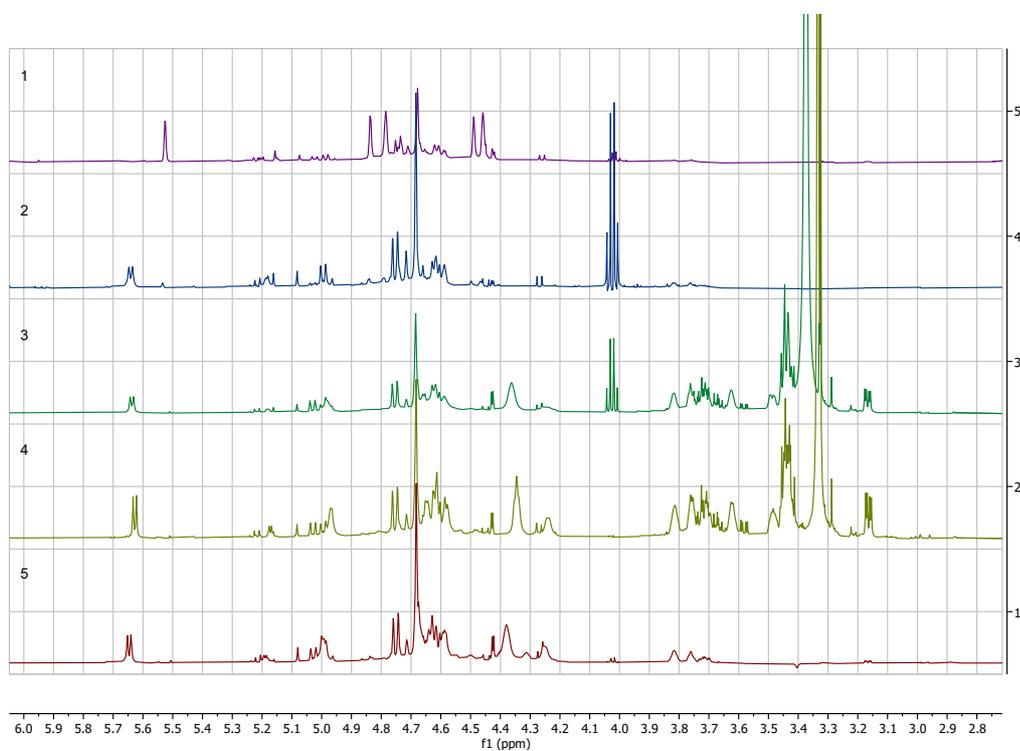
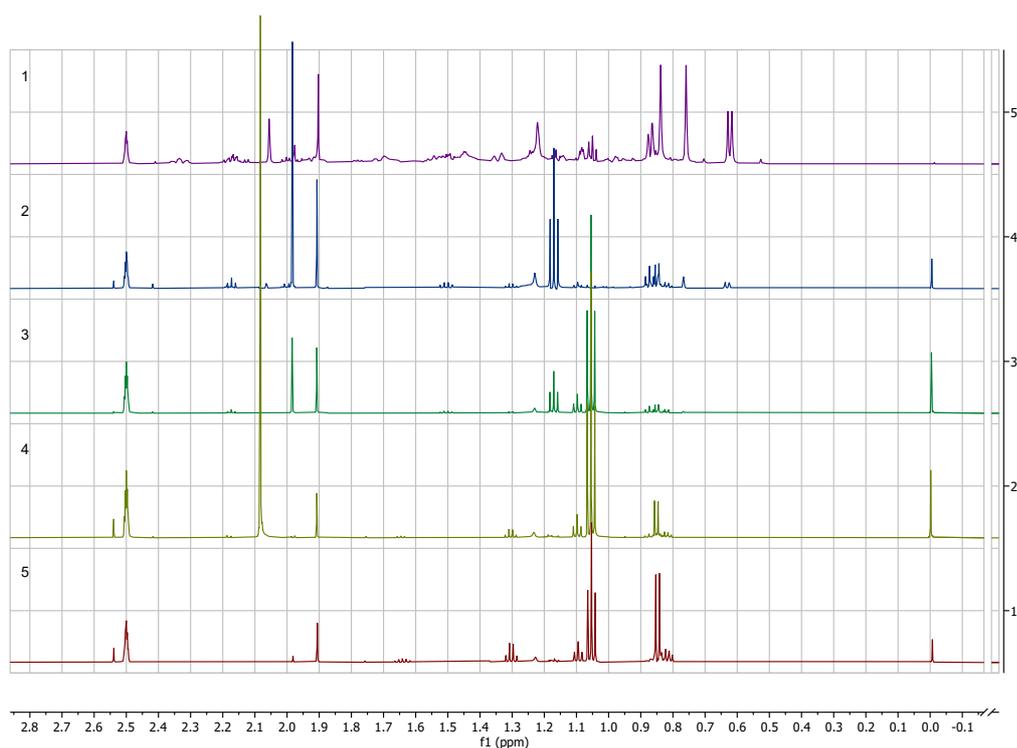
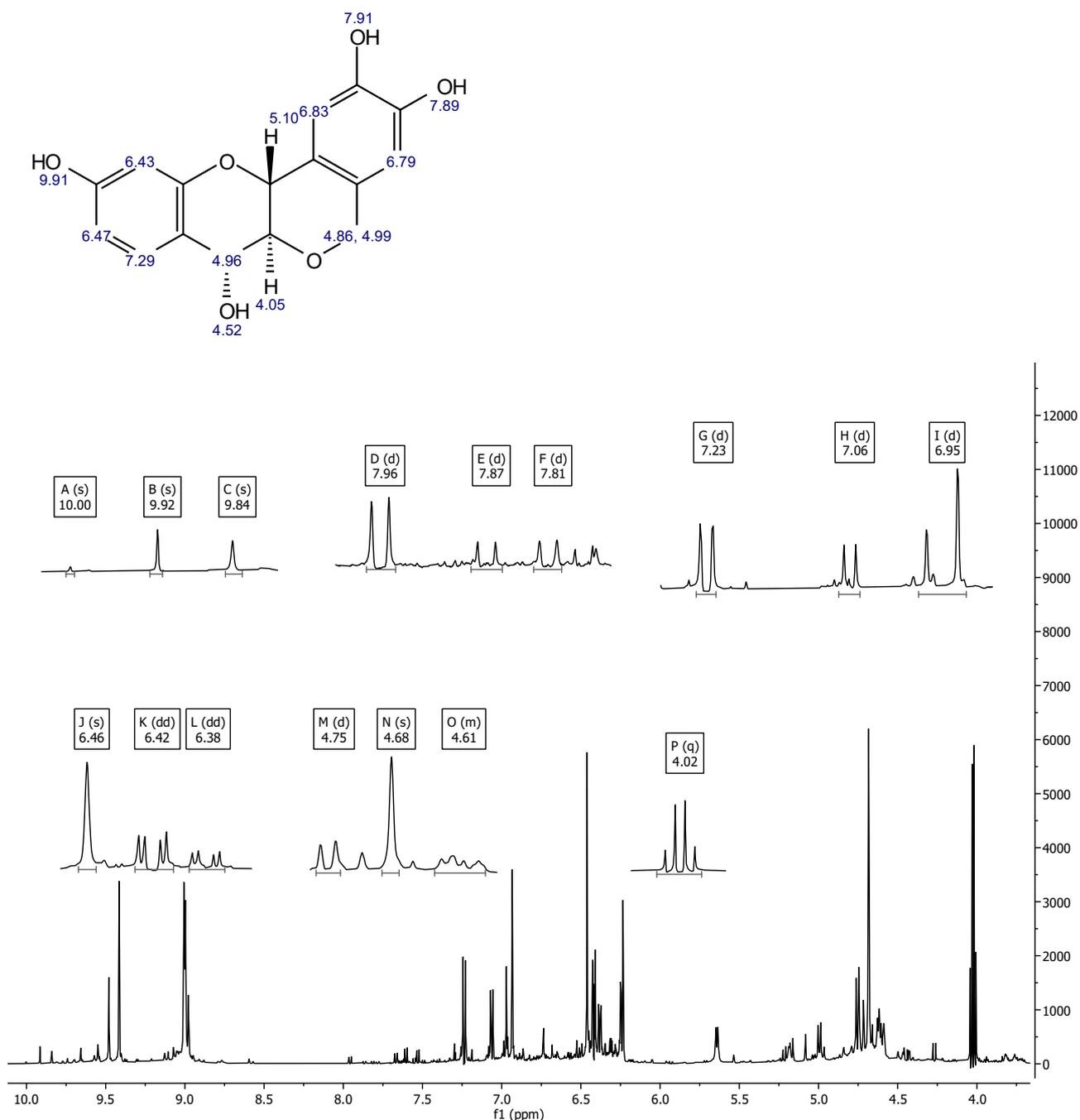


Figura 40. Comparação dos gráficos obtidos na análise por RMN de ^1H , 600 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, dos cinco primeiros extratos, na faixa de 0 a 2,8 ppm.



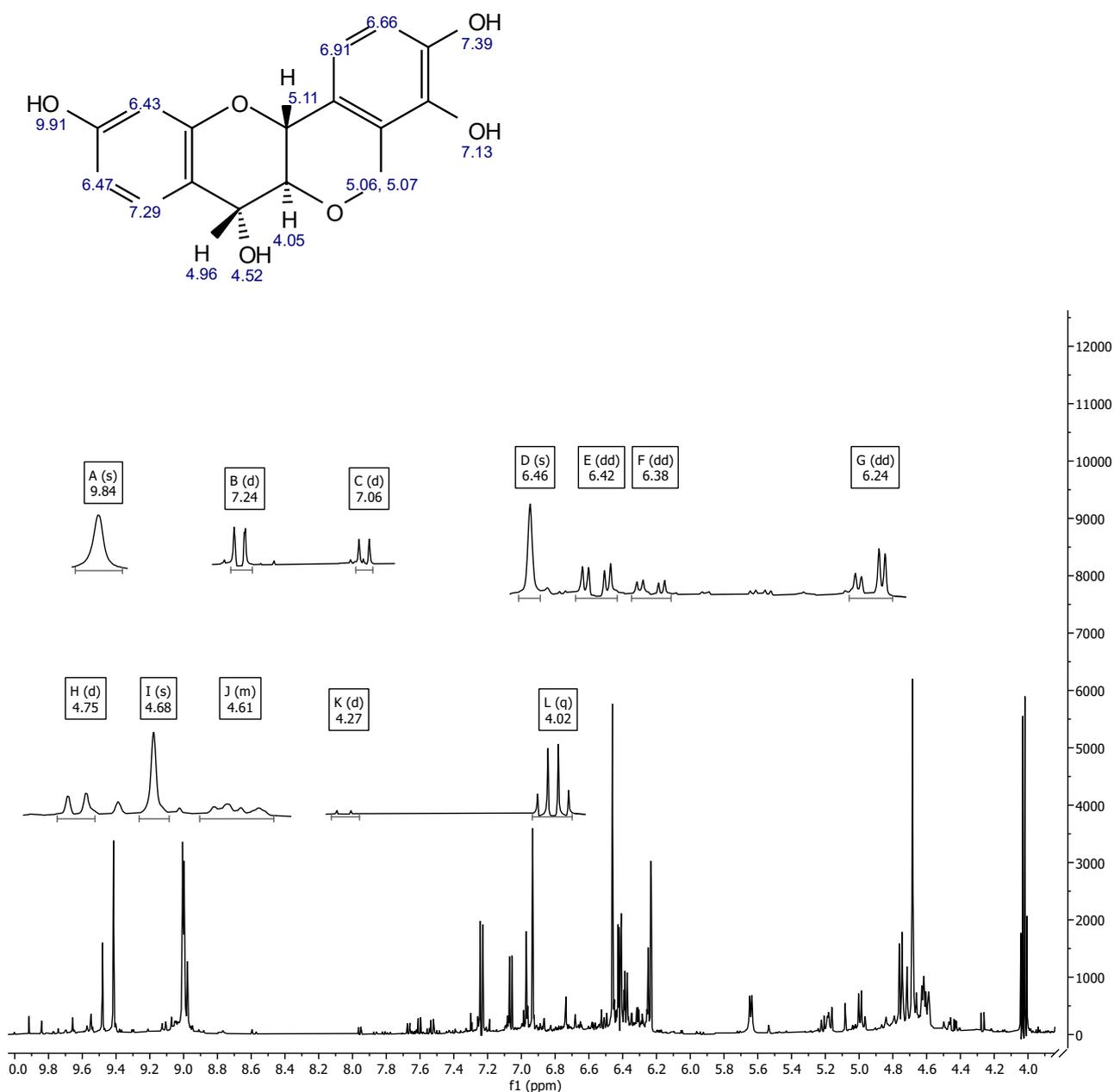
5.5.1 Peltoginol

Figura 41. Dados experimentais de RMN de ^1H ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) para o extrato 2 (acetato de etila com etanol), comparado à sinais preditos para o peltoginol, representados em azul na estrutura molecular. Para todos os átomos de hidrogênio podem ser encontrados picos correspondentes, com exceção do hidrogênio com sinal 4,05, que pode estar omitido pelo sinal do solvente acetato de etila, representado por um quarteto em 4,02 ppm. Há possibilidade da ocorrência de peltoginol no extrato 2.



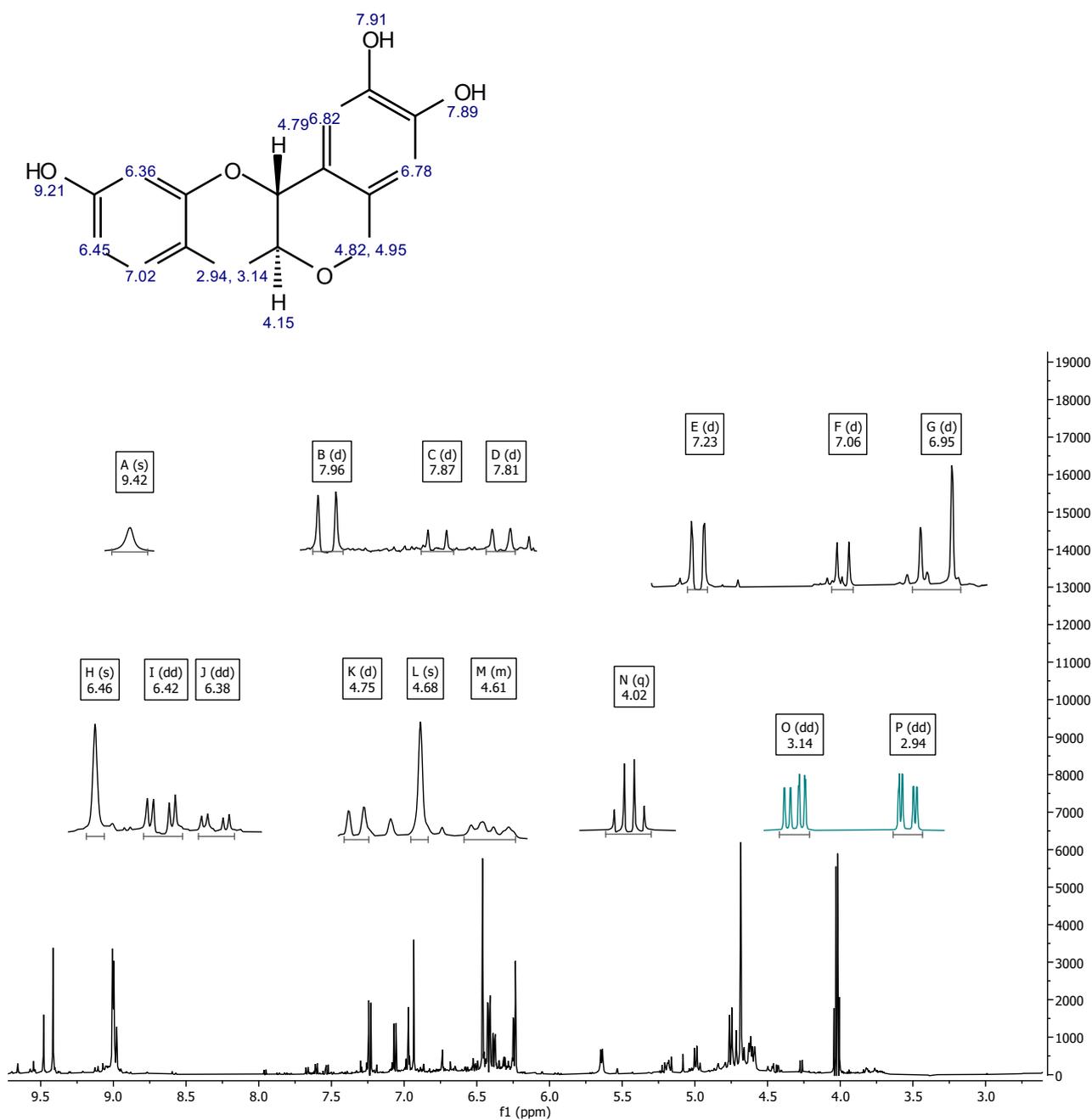
5.5.2 Mopanol

Figura 42. Dados de RMN de ^1H ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) para o extrato 2, comparado à sinais preditos para o mopanol. Para todos os átomos de hidrogênio podem ser encontrados sinais correspondentes, com exceção do hidrogênio em sinal 4,05 que pode estar omitido pelo acetato de etila. É possível a ocorrência de mopanol no extrato.



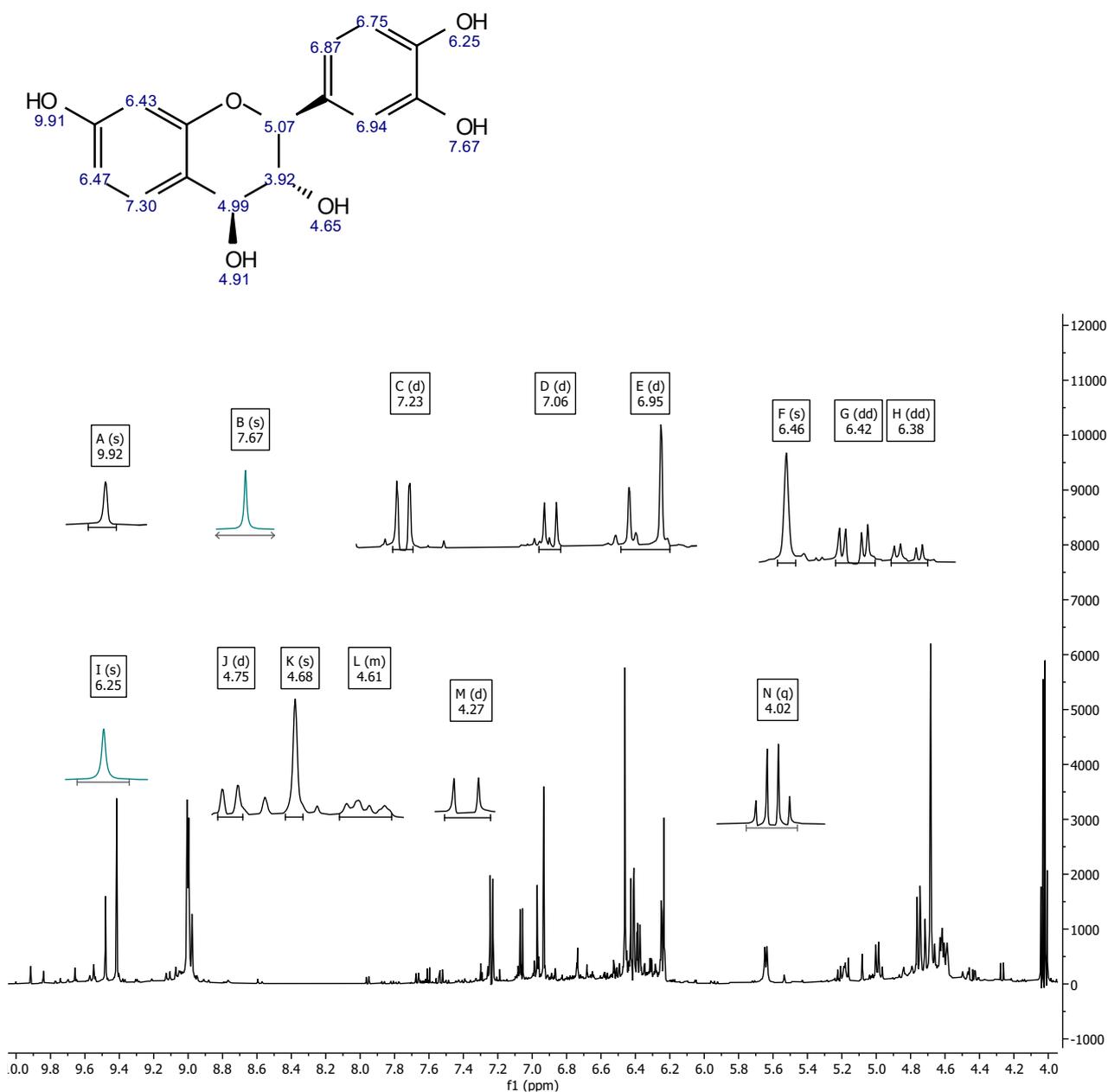
5.5.3 Pubeschin

Figura 43. Dados de RMN de ^1H ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) para o extrato 2, comparado à sinais preditos para o pubeschin. Há presença de vários sinais correspondentes. Não foram encontrados picos correspondentes aos sinais 3,14 e 2,94. A presença de pubeschin não pode ser inferida.



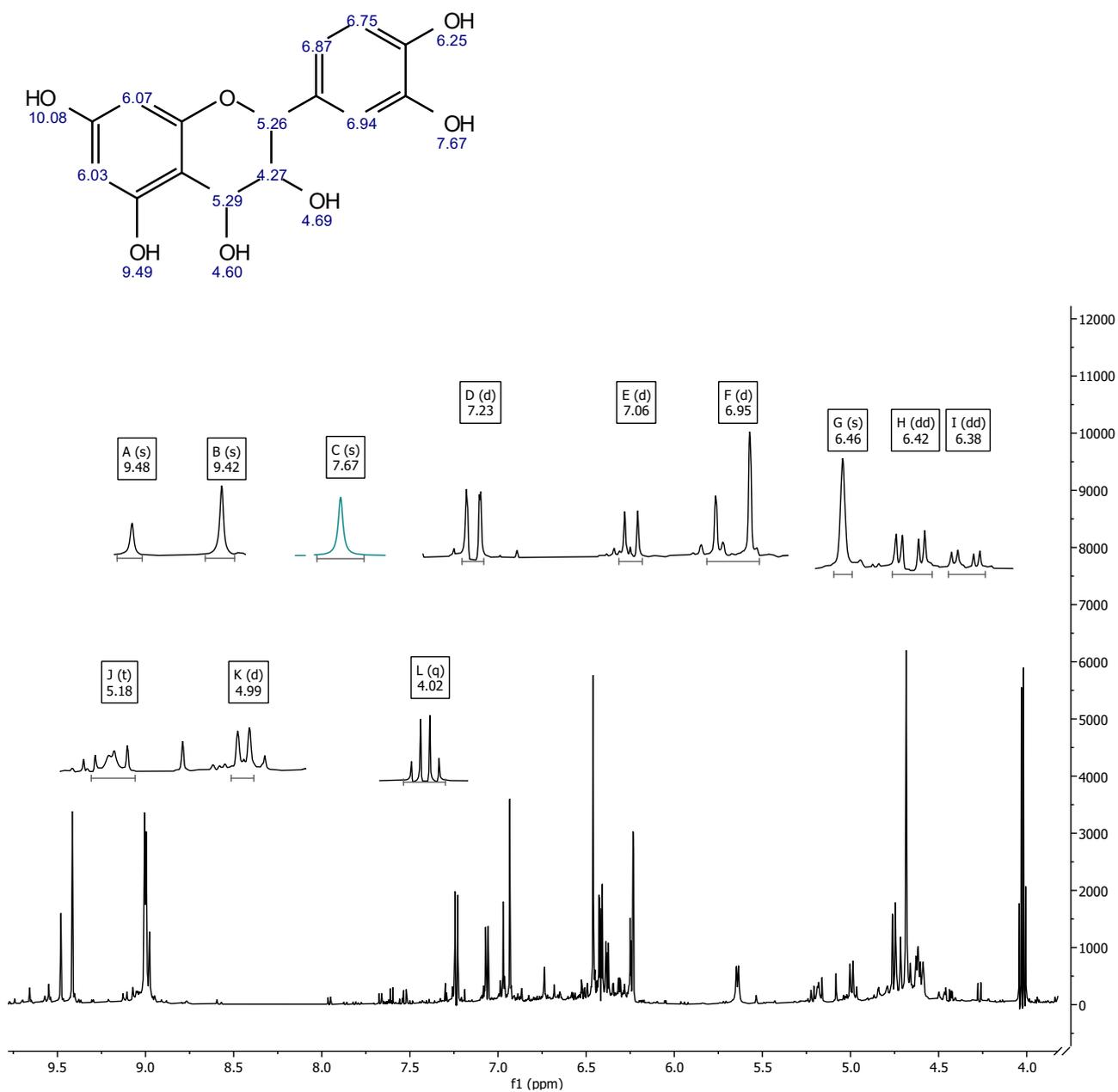
5.5.4 Leucofisetinidina

Figura 44. Dados de RMN de ^1H ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) para o extrato 2 comparado à sinais preditos para a leucofisetinidina. Podem ser encontrados a maioria dos picos correspondentes aos sinais de leucofisetinidina, porém os sinais para as hidroxilas em 7,67 e 6,25 não foram observados em alcance próximo. Há possibilidade da ocorrência de leucofisetinidina no extrato.



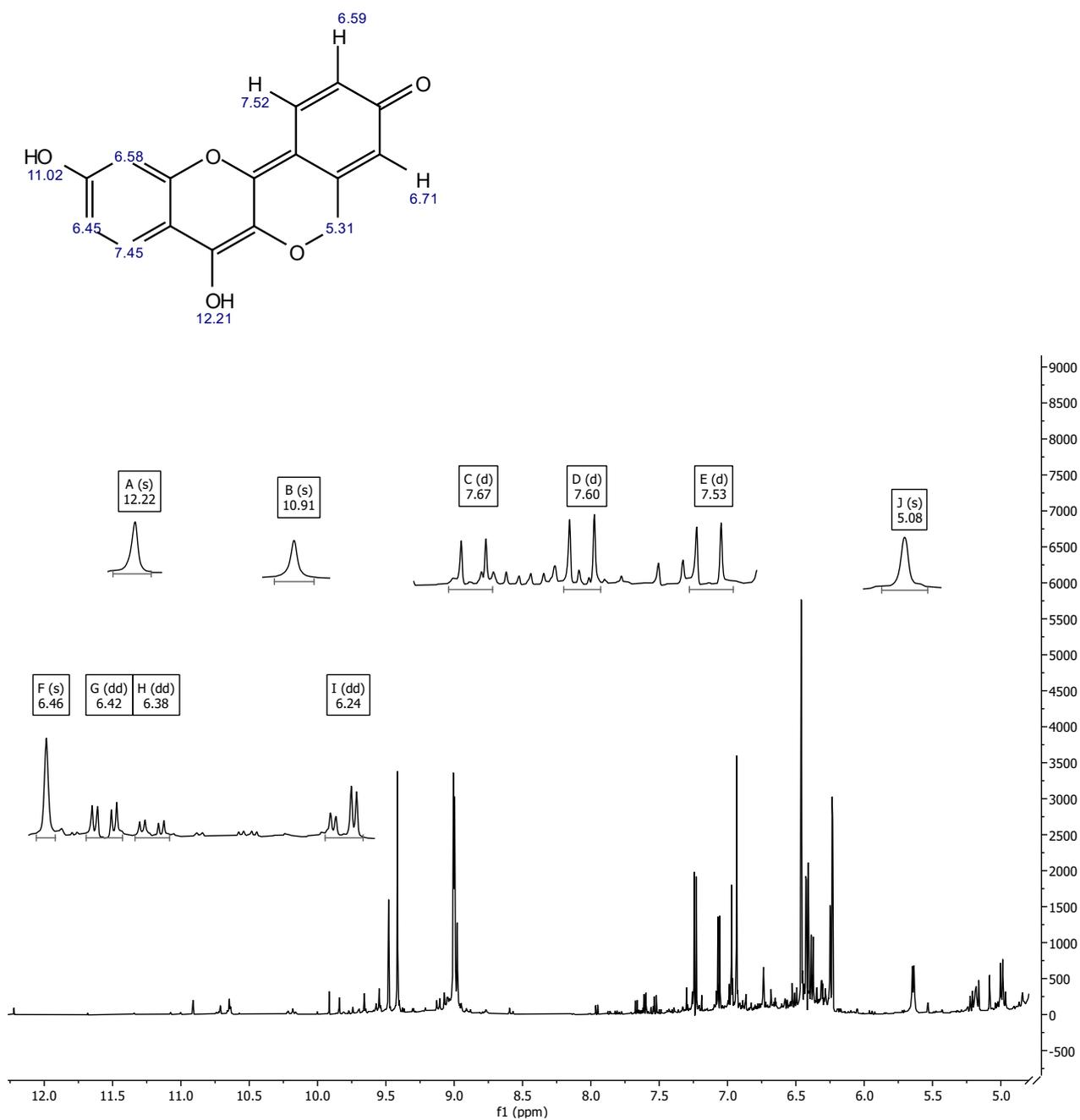
5.5.5 Leucocianidina

Figura 45. Dados de RMN de ^1H ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) para o extrato 2 comparado à sinais preditos para a leucocianidina. Podem ser observados sinais correspondentes para todos os hidrogênios, com exceção do singlete próximo de 7,67 ppm. Há possibilidade de ocorrência de leucocianidina no extrato.



5.5.6 Peltomexicanin

Figura 46. Dados de RMN de ^1H ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) para o extrato 2 comparado ao espectro predito para peltomexicanin. Podem ser encontrados picos correspondentes para todos os hidrogênios preditos para peltomexicanin, mas há dificuldade na comparação de hidrogênios aromáticos. Há chance da ocorrência de peltomexicanin no extrato.

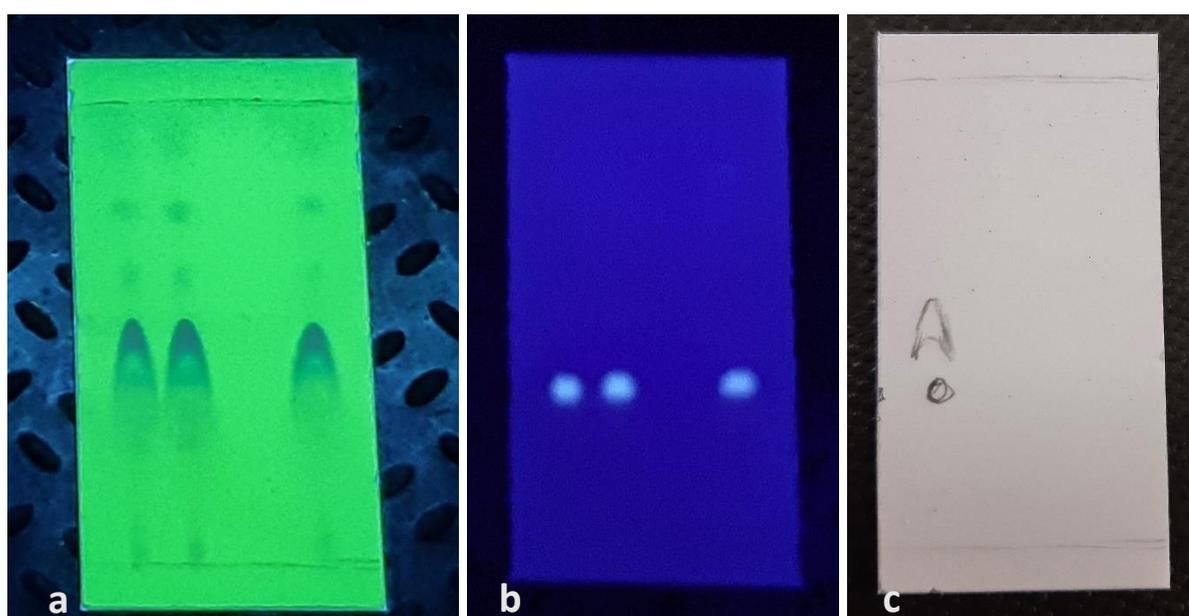


Para as substâncias resorcinol, benzaldeído, e ácido naftaleno pentanoico, não foram encontrados sinais característicos dessas substâncias nos espectros experimentais. Portanto, pelo método utilizado não é possível inferir a existência dessas substâncias nos extratos analisados.

5.6 ANÁLISE DE GC-MS PARA O EXTRATO EM HEXANO

O extrato obtido por hexano apresentou caráter incolor, diferentemente dos extratos preparados em acetato de etila e/ou em etanol, que tiveram coloração vermelha. Após procedimento de rotaevaporação, não foi possível notar massa significativa restante, assumindo-se a presença de compostos voláteis, e, além disso, o balão volumétrico continha um aroma diferenciado, como tinha sido notado anteriormente durante a cromatografia em coluna. Com adição de uma pequena quantia de solvente hexano foi possível realizar a análise por CCD. Foram observados ao menos 5 componentes distintos na lâmpada de 254 nm, e um componente foi notado na lâmpada de 365 nm.

Figura 47. Análise por CCD do extrato em hexano de *Peltogyne lecointei* em: **a)** 254 nm. **b)** 365 nm. **c)** Comparativo da posição para a substância visível na lâmpada de 365 nm



Após observação do comportamento volátil do extrato, e presença de diferentes componentes químicos observados por CCD, foi feita uma análise por GC-MS. O cromatograma obtido demonstrou a presença de compostos relativamente polares, que aparecem a partir de aproximadamente 40 minutos na análise, em torno de 180 °C, que se diferenciam do cromatograma obtido para o hexano puro, que representa os picos iniciais dos espectros. Por meio do software LabSolutions GCMS juntamente com uma biblioteca NIST para espectros de massas, foi feita uma determinação de possíveis componentes presentes na amostra, pela similiaridade do espectro experimental com espectros do banco de dados. A seguir pode ser observado o espectro da amostra mais concentrada, com 10 µL da solução inicial, e o espectro do branco feito com hexano. Em seguida tem-se uma análise dos picos mais relevantes do cromatograma, com as moléculas do banco de dados que tiveram maior similaridade com os espectros experimentais, e o fator de similaridade pode ser encontrado enumerado abaixo de cada molécula.

Figura 48. Cromatograma de GC-MS para o extrato de *Peltogyne lecointei* preparado com hexano.

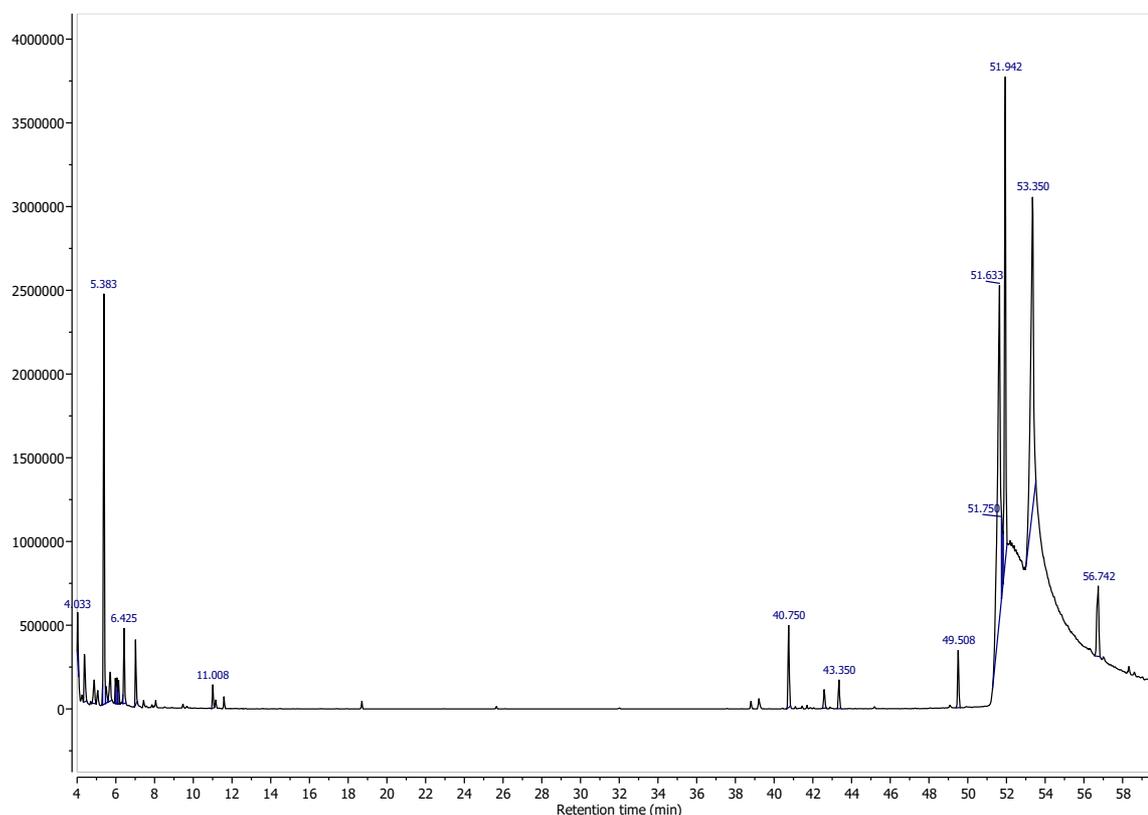


Figura 49. Cromatograma de GC-MS para o solvente hexano.

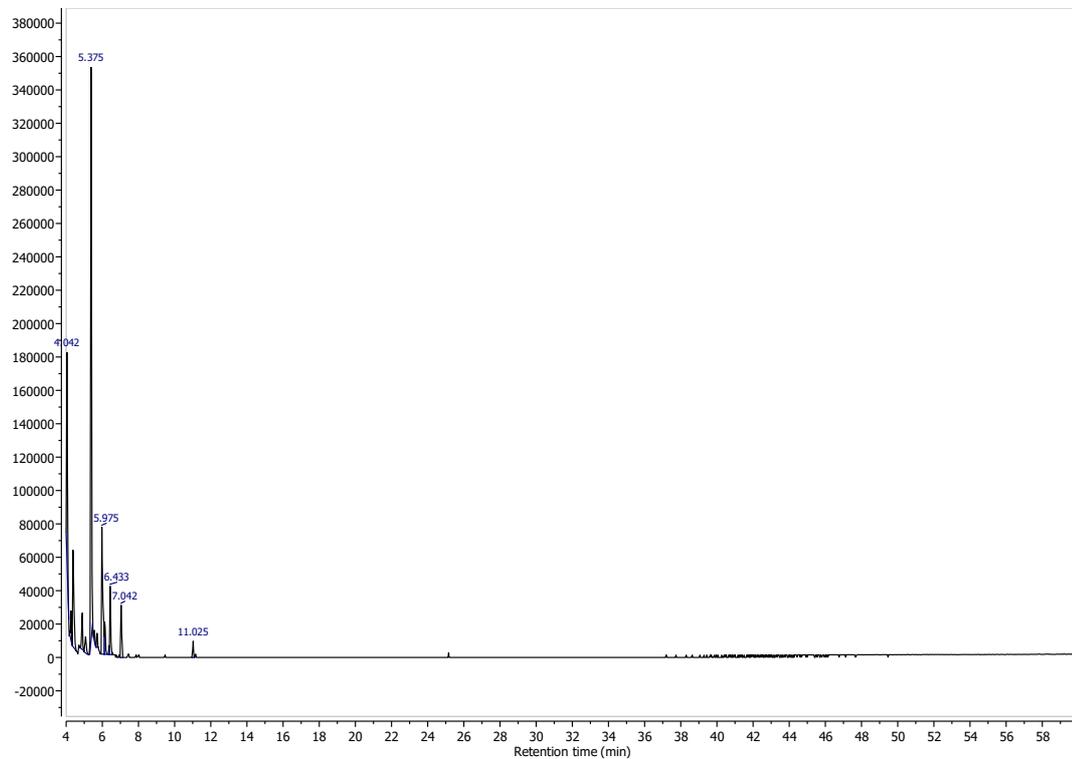


Figura 50. Cromatograma de GC-MS para o extrato hexânico de *Peltogyne lecointei*, com as moléculas que melhor representam os picos indicados no intervalo de 38 a 41 minutos, conforme similaridade com espectros de massas conhecidos.

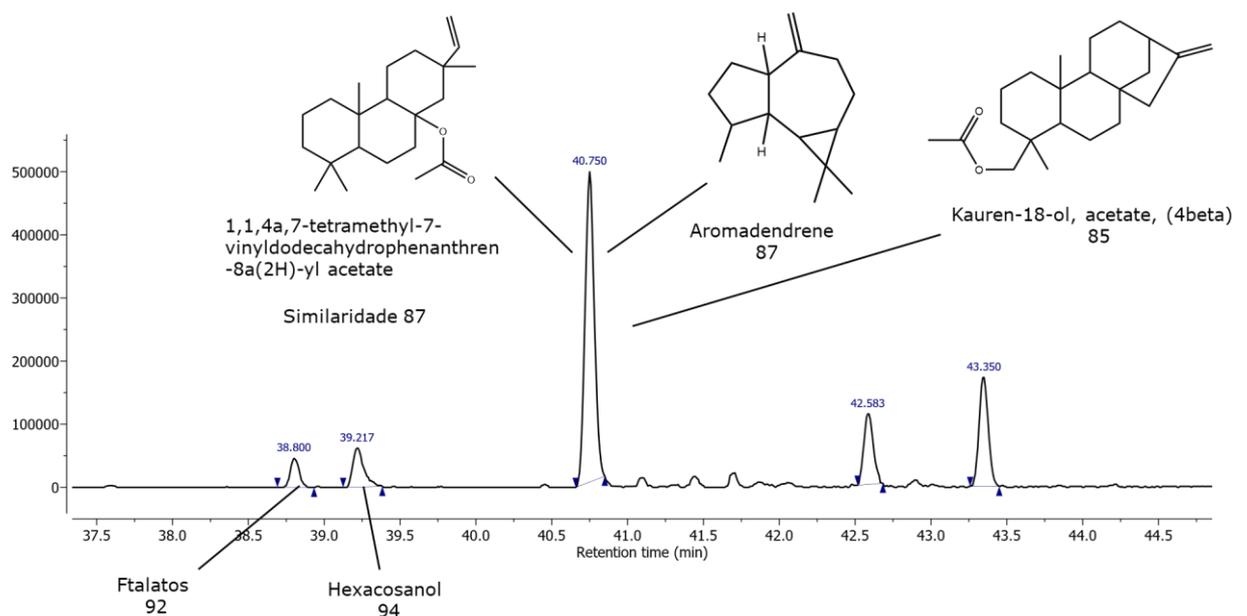


Figura 51. Cromatograma de GC-MS para o extrato hexânico de *Peltogyne lecointei*, com as moléculas que melhor representam os picos indicados no intervalo de 42 a 44 minutos, conforme similaridade com espectros de massas conhecidos.

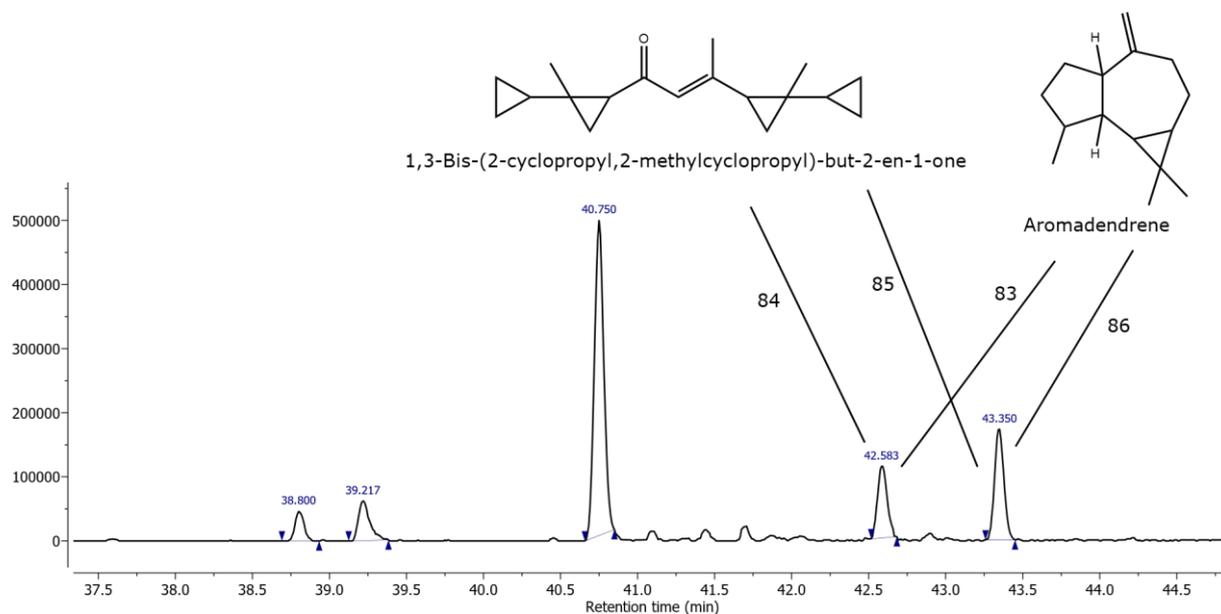


Figura 52. Cromatograma de GC-MS para o extrato hexânico de *Peltogyne lecointei*, com as moléculas que melhor representam os picos indicados no intervalo de 49 a 51,7 minutos, conforme similaridade com espectros de massas conhecidos.

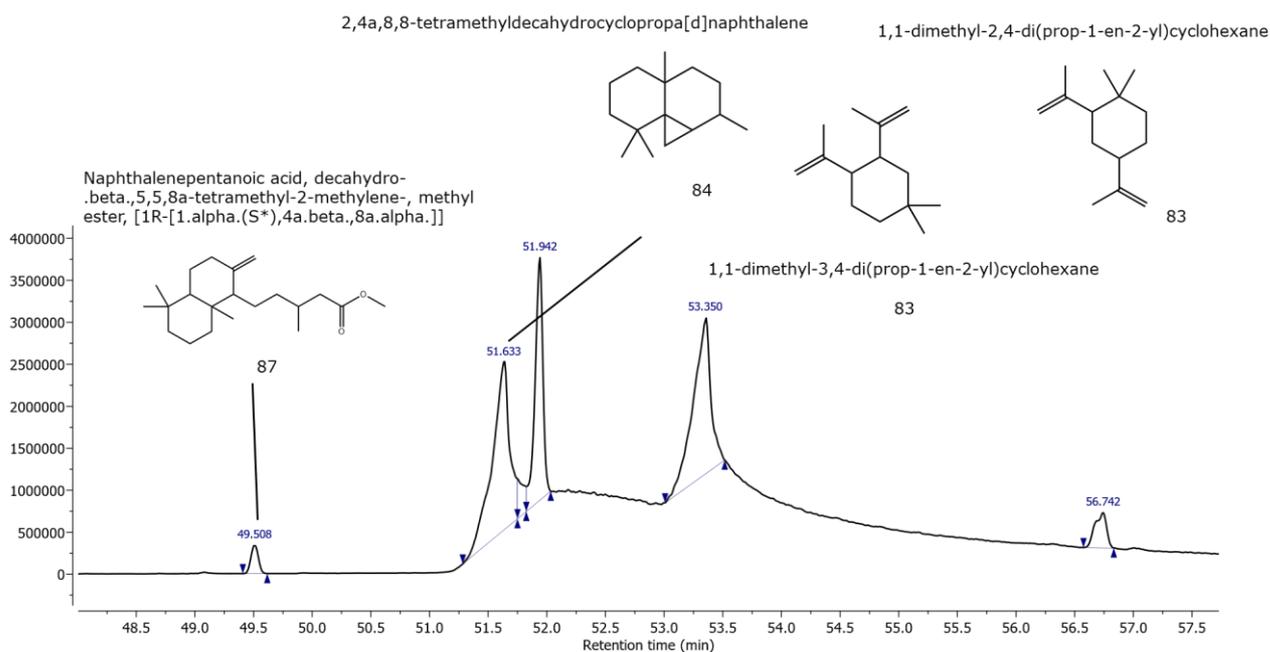


Figura 53. Cromatograma de GC-MS para o extrato hexânico de *Peltogyne lecointei*, com as moléculas que melhor representam os picos indicados no intervalo de 51,7 a 55 minutos, conforme similaridade com espectros de massas conhecidos.

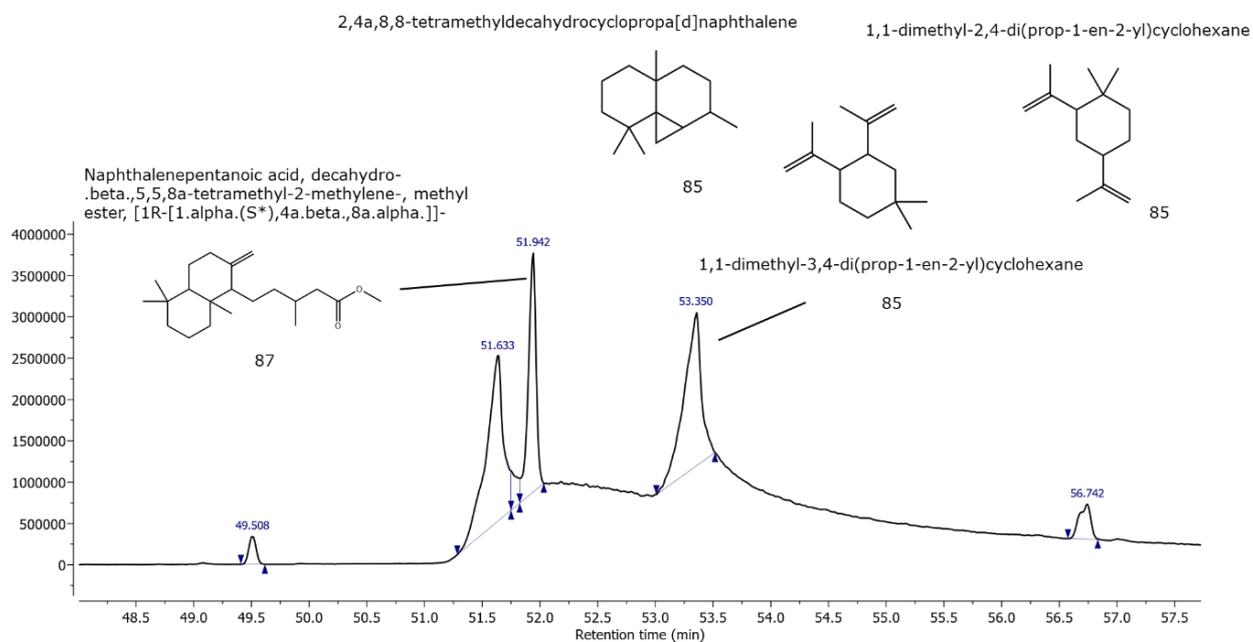
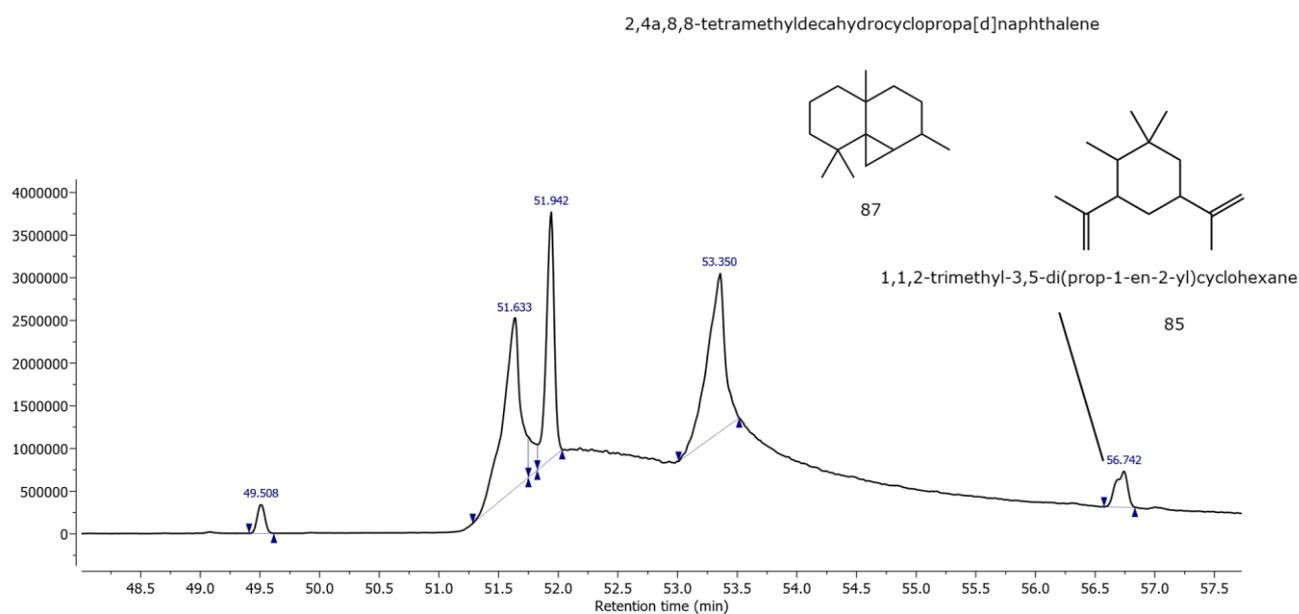


Figura 54. Cromatograma de GC-MS para o extrato hexânico de *Peltogyne lecointei*, com as moléculas que melhor representam o pico com retenção em média de 56,7 minutos, conforme similaridade com espectros de massas conhecidos.



6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

6.1 CONCLUSÃO

No presente trabalho foi realizado um levantamento de informações com respeito à fitoquímica relacionada ao gênero de árvores *Peltogyne spp.* com foco na espécie *Peltogyne lecointei*, incluindo especulações de possíveis utilidades industriais dos extrativos dessas árvores.

Com objetivo de explorar especificamente o perfil metabólico contido na madeira de *Peltogyne lecointei*, foram realizados ensaios laboratoriais cromatográficos e espectrométricos, utilizando-se extratos preparados com os solventes hexano, acetato de etila, e etanol. No total pôde se obter um rendimento adequado de extrativos, pouco desviante do relatado para a literatura, como pode ser observado para o Anexo B. Os métodos cromatográficos demonstraram-se úteis na separação de componentes químicos contidos nos extratos, requerendo, porém, maior especificidade de separação para análises posteriores com as moléculas isoladas, reduzindo-se a quantia de interferentes e permitindo melhor identificação e elucidação dos componentes dos extratos.

Foi possível observar por meio de ressonância magnética nuclear de hidrogênio o indicativo de uma diversidade de moléculas contidas nos extratos, incluindo diferentes classes de metabólitos. Por análise dos espectros foram encontrados picos que poderiam corresponder a flavonoides, como foi relatado na literatura, compostos comumente encontrados para o gênero *Peltogyne spp.*, possivelmente as moléculas mopanol, peltoginol, peltomexicanin, leucofisetinidin, e leucocianidin.

Testes fitoquímicos qualitativos feitos para o extrato em acetato de etila com etanol indicaram a presença de compostos fenólicos, incluindo os grupos flavonoides, antocianidinas, e leucoantocianidinas. Além de polifenóis, foi notada também a presença de terpenoides.

O extrato da madeira feito com solvente hexano indicou a presença de componentes voláteis, e foi analisado por GC-MS. A análise mostrou a presença de compostos de relativa alta polaridade, encontrados no cromatograma após a temperatura 180 °C. Utilizando-se de banco de dados foi possível fazer um comparativo com os espectros de massas obtidos, e as moléculas que tiveram melhor

similaridade foram terpenoides, como por exemplo o aromadendreno, um sesquiterpeno que é o principal constituinte do óleo essencial de *Eucalyptus globulus*. A incidência de terpenoides é esperada, uma vez que os terpenoides englobam o maior grupo de metabólitos voláteis.

6.2 PERSPECTIVAS FUTURAS

Para se ter uma melhor separação e determinação dos componentes contidos nos extratos de *Peltogyne lecointei*, outros métodos espectrométricos de análise devem ser considerados, como por exemplo RMN de carbono, cromatografia líquida acoplada com espectrômetro de massas (LC-MS), e infravermelho. A presente pesquisa foi realizada visando análise por LC-MS, método que deve ser idealmente realizado antes da separação por cromatografia, pois, tendo-se uma ideia aproximada dos grupos de metabólitos contidos no extrato, a separação pode ser feita de forma mais específica, visando isolamento dos componentes que passarão por análises posteriores.

Com objeto de se obter a fórmula molecular dos compostos presentes nos extratos e nas frações obtidas por cromatografia em coluna, foram feitos os preparativos para análise por LC-MS. Devido à alta sensibilidade do método, as amostras foram solubilizadas e diluídas em água com metanol, solvente que posteriormente seria utilizado no equipamento, até se ter uma concentração de aproximadamente 1 ppm. As amostras foram preparadas inicialmente dissolvendo-se de 1 a 3 mg de cada extrato e fração secos, em 1 mL de solvente etanol, e então, a dissolução foi complementada com auxílio de banho ultrassônico. Em seguida utilizou-se filtros de PVDF hidrofílico de 0.45 µm para que partículas restantes fossem retidas. Com auxílio de uma micropipeta, 1 µL dessa solução foi diluída em aproximadamente 1 mL de uma mistura de metanol e água 50%, a mesma solução que seria utilizada no equipamento de separação por cromatografia líquida, e ao fim obteve-se uma concentração de aproximadamente 1 ppm ou 1 µg/mL.

Outro ponto a ser considerado são os ensaios biológicos. Com os extratos brutos, ou após separação e identificação das moléculas, futuramente poderiam ser realizados testes envolvendo materiais biológicos, como bactérias, fungos, cupins ou outros insetos, e também efeito corante. Caso a finalidade seja aplicada em humanos, deve se fazer também análises de toxicidade das substâncias.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, A. P. S.; RODRIGUES, D. A.; CASTELO, P. A. R. Determinação das Propriedades Químicas de Madeiras da Amazônia Meridional. **Scientific Electronic Archives**, v. 1, n. Id, p. 1–4, 2015.
- BASSET, C.; EPARVIER, V.; ESPINDOLA, L. S. The search for antifungals from amazonian trees: A bio-inspired screening. **Natural Product Communications**, v. 10, n. 4, p. 605–608, 2015.
- BIGNELL, David Edward; ROISIN, Yves; LO, Nathan (Ed.). **Biology of termites: a modern synthesis**. Springer Science & Business Media, 2010.
- BUCKINGHAM, J.; MUNASINGHE, V. R. **Dictionary of flavonoids**. New York: Taylor & Francis Group, 2015.
- CAMARGO, G. et al. Potencial de extrato de flores de *Crotalaria* no controle de nematoides da soja. **XII Jornada Acadêmica da Embrapa Soja**, p. 165–176, 2017.
- CHRISTENHUSZ, M. J. M.; BYNG, J. W. Phytotaxa. **Phytotaxa**, v. 261, n. 3, p. 201–217, 2016.
- DEITZ, LEWIS L.; NALEPA, Christine; KLASS, Klaus-Dieter. Phylogeny of the Dictyoptera re-examined (Insecta). **Entomologische Abhandlungen**, v. 61, n. 1, p. 69-91, 2003.
- DEWICK, P. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach**. 3. ed. United Kingdom: John Wiley & Sons Ltd, 2009.
- EVANS, W. C. Trease and Evans Pharmacognosy. 15th (ed.) Saunders Publishers, an imprint of Elsevier Science Ltd. 2002.
- GARCIA, L. F. A madeira como fonte de larvicidas naturais contra o *Aedes aegypti*: estudo de revisão e avaliação da atividade larvicida de seis espécies nativas brasileiras. Tese (Doutorado em Tecnologias Química e Biológica) – Universidade de Brasília, Brasília, 2021.
- GRANATO, D. et al. Chemical and biological evaluation of rejects from the wood industry. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, n. SPEC. ISS., p. 237–241, 2005.
- GUTIÉRREZ-MACÍAS, P. et al. Peltomexicanin, a peltogynoid quinone methide from peltogyne mexicana martínez purple heartwood. **Molecules**, v. 21, n. 2, p. 4–9, 2016.
- GUTIÉRREZ-MACÍAS, P. et al. Purple pigment from Peltogyne mexicana heartwood as a potential colorant for food. **Journal of Food Science and Technology**, v. 56, n. 7, p. 3225–3238, 2019.
- HARBORNE, J. B. **The Flavonoids: advances in research since 1980**. Springer Science+Business Media Oordrecht, 1988.

HARSHA, N. et al. Phytochemical analysis of some selected spices. **Int J Innov Res Sci Eng Technol**, v. 2, n. 11, p. 6618-6621, 2013.

HOLTON T. A., CORNISH E. C. Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. **Plant Cell** 7, 1071–1083. 10.1105/tpc.7.7.1071, 1995.

Informações sobre madeiras, Pau-roxo. Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT), São Paulo. Disponível em: <http://www.ipt.br/informacoes_madeiras/49-roxinho.htm>. Acesso em: 8 de abr. de 2021.

KUMAR, R. Sasi et al. Preliminary studies on phytochemicals and antimicrobial activity of solvent extracts of *Coriandrum sativum* L. roots (Coriander). **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 2, n. 6, 2014.

LIMA, O. DE & MAIA, M. H. D. . Substâncias Antimicrobianas de plantas superiores. **Rev. Inst. de Antibióticos**, 3(1) : 87-92, 1961.

LIU, Y. et al. “Anthocyanin Biosynthesis and Degradation Mechanisms in Solanaceous Vegetables: A Review.” **Frontiers in chemistry** vol. 6 52. 9 Mar. 2018.

MARKAKIS, P. **Anthocyanins as Food Colors**. Department of Food Science and Human Nutrition, Michigan State University. New York: Academic Press, 1982.

MING, H. et al. Transcriptome analysis reveals the mechanism of anthocyanidins biosynthesis during grains development in purple corn (*Zea mays* L.). **Journal of Plant Physiology**, v. 257, n. November 2020, 2021.

NAKAJIMA, J. et al. Reaction mechanism from leucoanthocyanidin to anthocyanidin 3-glucoside, a key reaction for coloring in anthocyanin biosynthesis. **J Biol Chem**. 2001 Jul 13;276(28):25797-803. Epub 2001 Apr 20.

NELSON, D.; COX, M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

PRASHANT, T. et al. A Review on phytochemical screening and extraction. **Int. J. Pharm. Sci**, v. 1, n. 1, 2011.

RODRIGUES, A. M. DE S. Análise e valorização bioinspirada dos metabólitos secundários responsáveis pela durabilidade natural de madeiras exploradas na Guiana Francesa. p. 266. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) – Universidade de Brasília, Brasília, 2010.

Safra Brasileira de Grãos. Conab, Brasília 2021. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safra/graos>> Acesso em: 27 de abr. de 2021.

SALNA, K. P. et al. A comparative study of phytochemicals investigation of *Andrographis paniculata* and *Murraya koenigii*. **Int J Pharm Pharm Sci**, v. 3, n. 3, p. 291-292, 2011.

SERPA, A. et al. Roxinho (*Peltogyne* cf. *subsessilis*) como proposta de indicador natural de pH e sua aplicação em uma escola de ensino de Ariquemes – Rondônia – Amazônia Ocidental – Brasil. **South American Journal of Basic Education, Technical and Technological**, 1(1), 2014.

SHASTRI, Varun. **Industrial biotechnology**. Gyan Publishing House, 2006.

SILVA, M. F. DA. Revisão taxonômica do gênero *Peltogyne* Vog. (Leguminosae-Caesalpinioideae). **Acta Amazonica**, v. 6, n. 1 suppl 1, p. 5–61, 1976.

SISA, M. et al. Photochemistry of flavonoids. **Molecules**, v. 15, n. 8, p. 5196–5245, 2010.

SOFOWORA, A. Screening plants for bioactive agents. **Medicinal Plants and Traditional Medicinal in Africa. 2nd Ed. Spectrum Books Ltd, Sunshine House, Ibadan, Nigeria**, p. 134-156, 1993.

TANAKA Y., OHMIYA A. Seeing is believing: engineering anthocyanin and carotenoid biosynthetic pathways. **Curr. Opin. Biotechnol.** 19, 190–197. 10.1016/j.copbio.2008.02.015, 2008.

WAISS A.C., JR., CORSE J. Photooxidative Cyclization of Quercetin Pentamethyl Ether. **J. Am. Chem. Soc.**, 87:2068–2069, 1965.

WINK, M. Evolution of secondary metabolites in legumes (Fabaceae). **South African Journal of Botany**, v. 89, p. 164–175, 2013.

ZAPPI, D. C. et al. Growing knowledge: An overview of Seed Plant diversity in Brazil. **Rodriguesia**, v. 66, n. 4, p. 1085–1113, 2015.

ANEXOS

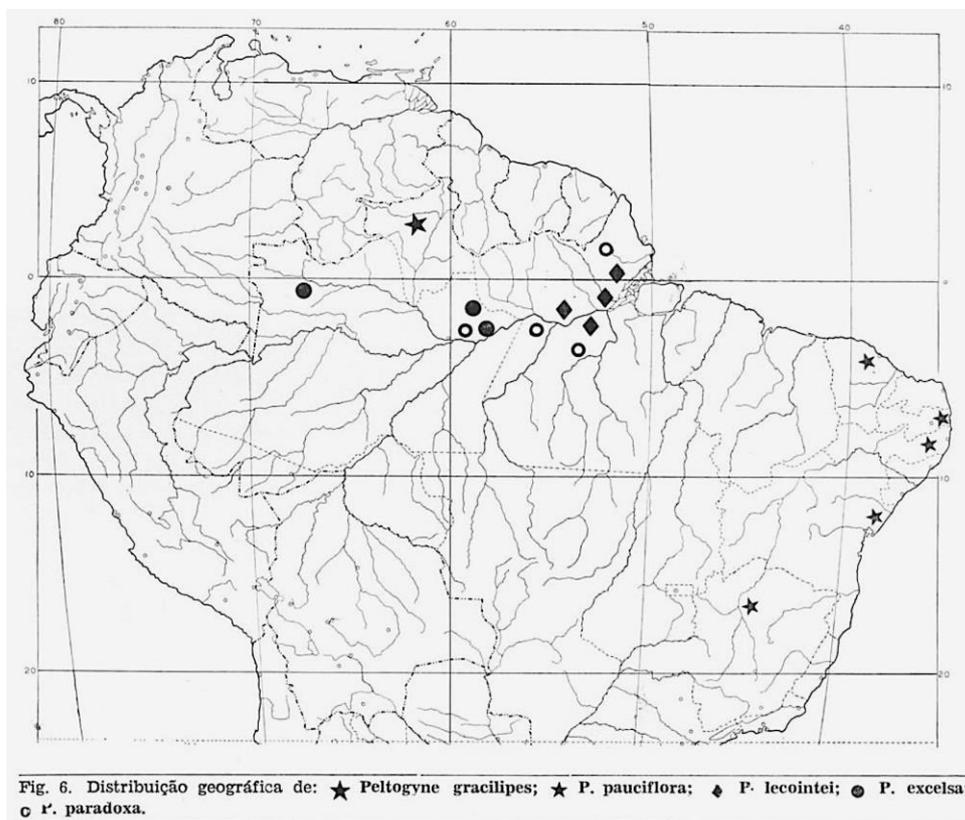
ANEXO A – DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DE *PELTogyNE LECOINTEI*ANEXO B – TABELA DE COMPOSIÇÃO QUÍMICA (FONTE: ALMEIDA;
RODRIGUES; CASTELO, 2015)

Tabela 1. Análise química das espécies estudadas

Espécies	Extrativos	Lignina	Holocelulose
<i>Hymenolobium petraeum</i>	3,01	23,84	73,15
<i>Trattinnickia burseraefolia</i>	2,65	23,01	74,34
<i>Erisma uncinatum</i>	3,47	22,01	74,52
<i>Peltogyne lecointe</i>	2,69	23,98	73,33
<i>Hymenaea courbaril</i>	1,99	20,98	77,03

Extrativos totais (%); Lignina (%); Holocelulose (%).

ANEXO C – ZONAS DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO FÚNGICO DE *P. SANGUINEUS* E *G. TRABEUM* EM CONTATO COM EXTRATOS DE *PELTOGYNE LECOINTEI* (FONTE: ADAPTADO DE RODRIGUES, 2010)

Espécie	Órgão ^a	Zonas de inibição (mm) do crescimento de :			
		<i>P. sanguineus</i>		<i>G. trabeum</i>	
		AcOEt	MeOH	AcOEt	MeOH
<i>Peltogyne</i> sp.	F	16	0	0	0
	C	31	0	13	0
	A+Ce	45	0	0	0

F = Folha; C = Casca; A = Alburno; Ce = Cerne.

ANEXO D – TESTE DE MICRODILUIÇÃO EM MEIO LÍQUIDO DO EXTRATO EM ACETATO DE ETILA DE *PELTOGYNE LECOINTEI* CONTRAFUNGOS PATÓGENOS (FONTE: : ADAPTADO DE RODRIGUES, 2010)

Tabela 15 – Concentrações inibitórias mínimas (CIM em $\mu\text{g.ml}^{-1}$) para os extratos selecionados. Os valores inferiores ou iguais a $125 \mu\text{g.ml}^{-1}$ estão marcados em negrito.

Espécies	Extratos ^a	Filamentosos ^b			Leveduras ^b					
		<i>M.g.</i>	<i>M.c.</i>	<i>T.r.</i>	<i>C.a.</i>	<i>C.a.</i>	<i>C.p.</i>	<i>C.g.</i>	<i>C.k.</i>	<i>C.g.</i>
		LMGO	LMGO	LMGO	ATCC	LMGO	ATCC	LMGO	LMGO	LMGO
		10	22	4218	10231	102	22019	44	174	L1
<i>Peltogyne</i> sp.	Ma	500	125	62	31	16	125	8	62	62

^a M = madeira (alburno + cerne) ; C = casca ; C = cerne ; CE = cerne externo ; CI = cerne interno ; A = alburno ; a = acetato de etila ; m = metanol.

^b *M.g.* = *Microsporium gypseum*, *T.r.* = *Trichophyton rubrum*, *M.c.* = *Microsporium canis*, *C.a.* = *Candida albicans*, *C.p.* = *Candida parapsilosis*, *C.g.* = *Candida glabrata*, *C.k.* = *Candida krusei*.

ANEXO E – TESTE DE MORTALIDADE DE CUPINS EM CONTATO O EXTRATO EM ACETATO DE ETILA DE *PELTOGYNE LECOINTEI* (FONTE: ADAPTADO DE RODRIGUES, 2010)

Tabela 26 – Mortalidade dos cupins após 72 horas de contato com os discos tratados pelos extratos nas concentrações 9,3 ; 5,6 e 1,9 $\mu\text{g.mm}^{-2}$ ($P < 0.0001$, n = 2).

Espécies	Órgão ^a	9,3 $\mu\text{g.mm}^{-2}$		5,6 $\mu\text{g.mm}^{-2}$		1,9 $\mu\text{g.mm}^{-2}$							
		AcOEt	MeOH	AcOEt	MeOH	AcOEt	MeOH						
<i>Peltogyne</i> sp.	A+CE	83	$\pm 12,5$	25	± 5	10	± 0	8	$\pm 2,5$	8	$\pm 2,5$	13	$\pm 7,5$
	CI	28	$\pm 12,5$	3	$\pm 2,5$	13	$\pm 2,5$	13	$\pm 2,5$	13	± 5	10	$\pm 2,5$

**ANEXO F – AVALIAÇÕES QUÍMICAS PARA GRUPOS METABÓLICOS EM
EXTRATOS DE REJEITOS DA INDÚSTRIA DE MADEIRA (FONTE: ADAPTADO
DE GRANATO et al., 2005)**

Madeira	Fenóis	Terpenos	Alcaloides
Itaúba	+	+	+
Peroba Rosa	+	-	+
Imbúia	+	+	-
Cedrilho	-	+	-
Curupixá	+	+	-
Jatobá	+	+	-
Roxinho	+	+	-

**ANEXO G – TESTES ANTIBIÓTICOS PARA OS EXTRATOS DE MADEIRAS DE
REJEITOS DA INDÚSTRIA (FONTE: ADAPTADO DE GRANATO et al., 2005)**

Extratos	Ec	Kp	MI	Pm	Sa	ob
Itaúba (MeOH)	0	11	10	0	11	--
Jatobá	14	13	13	14	14	0
Imbúia	11	--	--	12	11	--
Roxinho	0	--	--	0	10	--
Roxinho (AcOEt)	9	10	9.5	10	9	0
Cedrilho	0	--	--	0	0	--
Peroba Rosa	0	9	9	21	9	0
Curupixá	0	--	--	0	0	--

-- = não testado; **Ec** = *K. pneumoniae*; **MI** = *M.luteus*; **Pm** = *P. mirabilis*; **As** = *S. aureus*; **ob** = outras bactérias testadas: *P. aeruginosa*, *S. mutans*, e *E. Aerogenes*.