

Constituintes químicos e efeito ecotoxicológico de extratos de folhas de *Eucalyptus urograndis*

Lucienir Pains Duarte, Rute Cunha Figueiredo, Débora Barbosa da Silva Soares,

Marcela Maciel Nogueira

Depto de Química, ICEx - UFMG

31270-901 Belo Horizonte, MG

lucienir@ufmg.br, Barbosa.debora@gmail.com, marcelamnogueira_113@hotmail.com

Fabíola Oliveira Lino de Araújo, Arnola Cecília Rietzler

Departamento de Biologia Geral, ICB - UFMG

31270-901, Belo Horizonte, MG

fabiolalino@hotmail.com, rietzler@mono.icb.ufmg.br

Flaviano Oliveira Silvério

ICA - UFMG

39404-006 Montes Claros, MG

flavianosilverio@yahoo.com.br

Sidney Augusto Vieira Filho

Depto de Farmácia, Escola de Farmácia, UFOP

35400-000, Ouro Preto, MG

bibo@ef.ufop.br

Resumo

Florestas artificiais de *Eucalyptus* produzem grande quantidade de serapilheira que através de ventos e águas pluviais são arrastadas para dentro de ambientes hídricos, com consequente alteração do ecossistema aquático. Para avaliar o efeito ecotoxicológico da serapilheira de *Eucalyptus urograndis* no ambiente aquático, foram preparados extratos orgânicos (hexânico, clorofórmico, acetato-etílico e etanólico) e aquoso. Estes extratos foram submetidos a testes *in vitro* utilizando como bioindicadores *Daphnia similis* e *D. laevis* (Anomopoda: Daphniidae) para os extratos mais polares e *Chironomus xanthus* (Díptera: Chironomidae) para os menos polares. Os testes confirmaram a presença de atividade tóxica em todos os extratos e indicaram o potencial ecotoxicológico das folhas de *E. urograndis* para ambientes aquáticos. Os resultados dos testes demonstraram a necessidade da adoção de novas tecnologias sustentáveis que possibilitem a preservação de ambientes aquáticos localizados na vizinhança das plantações de *Eucalyptus sp.*

Paralelamente aos estudos ecotoxicológicos, os extratos hexânico e clorofórmico das folhas da serapilheira foram submetidos a estudo fitoquímico levando ao isolamento de 5-hidroxi-4',7-dimetoxi-6,8-dimetilflavona (eucaliptina), nonacosanoato de 2-(4'-hidroxifenil)etila e um álcool graxo. Estes dois extratos, juntamente com o extrato aquoso, foram submetidos à reação de derivatização com BSTFA e depois, analisados por CG-EM, sendo possível detectar 25 compostos orgânicos. As principais classes de constituintes observados nestes extratos por CG-EM foram ácidos graxos, hidrocarbonetos de cadeia longa, esteróides, carboidratos e alcoóis graxos.

Palavras-chave: *Eucalyptus urograndis*, flavona, eucaliptina, fenil-etil éster, efeito ecotoxicológico

Abstract

Artificial forests of *Eucalyptus* produce large amounts of litterbag that by the action of wind and rainwater are dragged into aquatic environment, with consequent alteration of the aquatic ecosystems. For evaluate the ecotoxicological effect of *Eucalyptus urograndis* litterbag in the aquatic environment; there were prepared organic extracts (hexane, chloroform, ethyl acetate and ethanol), besides an aqueous extract. These polar extracts were tested *in vitro* against *Daphnia similis* and *D. laevis* (Anomopoda: Daphniidae) as the biological indicators while *Chironomus xanthus* (Diptera: Chironomidae) was used as bio-indicators for the less polar ones. The testing confirmed the presence of toxic activity in all extracts and indicated the ecotoxicological potential of the *E. urograndis* leaves in aquatic environments. The test results pointed to the need of new sustainable technologies allow the preservation of aquatic environments located in the vicinity of *Eucalyptus sp.* fields. Concomitantly to the ecotoxicological studies, hexane and chloroform extracts of litterbag leaves were subjected to phytochemical study, leading to the isolation of 5-hydroxy-4',7-dimethoxy-6,8-dimethylflavone (eucalyptin), 2-(4'-hydroxyphenyl)ethyl nonacosanoate and long chain alcohol. These two extracts, along with the aqueous extract were derivatized with BSTFA and then analyzed by GC-MS, allowing to detect 25 organic compounds, mainly fatty acids, long chain hydrocarbons, steroids, carbohydrates and long chain alcohols.

Keywords: *Eucalyptus urograndis*, eucalyptin, flavone, phenyl-ethyl ester, ecotoxicological effect.

Introdução

O gênero *Eucalyptus* (Myrtaceae) é nativo da Austrália e apresentou uma excelente adaptação em terras brasileiras. Atualmente, o Brasil possui a maior área plantada de eucaliptos do mundo, com cerca de três milhões de hectares [1]. Esta árvore é cultivada principalmente para as indústrias de papel, farmacêutica e de cosméticos [2]. Na medicina popular, diversas espécies de *Eucalyptus* são usadas como antissépticos, contra o resfriado comum, gripe e congestão nasal [3,4]. *Eucalyptus urograndis*, um híbrido de *E. grandis* com *E. urophylla*, representa a espécie de *Eucalyptus* mais utilizada e cultivada, no Brasil, para produção de celulose [5].

Boas práticas de manejo florestal recomendam que ao reflorestar áreas com *Eucalyptus* sejam preservadas as veredas e os cursos d'água. Entretanto, observando os plantios de eucaliptos, verifica-se que cerca de 2 a 3 toneladas de folhas/hectare/ano caem e ficam depositadas na superfície do solo. Estas folhas secam e muitas vezes são carregadas para cursos d'água que desembocam em pequenos lagos. Ainda são escassos os conhecimentos sobre o potencial de toxicidade das substâncias existentes nas folhas de *Eucalyptus* sobre a biota aquática e terrestre. Assim, estudos ecotoxicológicos com esta abordagem são extremamente importantes para a avaliação da qualidade da água e da estrutura e funcionamento de ambientes aquáticos e terrestres. Dados dessa natureza contribuem para verificar o grau de toxicidade de substâncias presentes nestes ambientes, podendo, mediante monitoramento, direcionar uma intervenção com o objetivo de preservar ou recuperar a biota local.

Este trabalho descreve os estudos fitoquímico e ecotoxicológico realizados utilizando extratos das folhas de *E. urograndis*, coletadas da serapilheira do viveiro de mudas da Celulose Nipo-Brasileira (Cenibra), situada no Município de Dionísio, região do médio Rio Doce, próximo ao Parque Estadual do Rio Doce. Os extratos hexânico, clorofórmico e aquoso, após derivatização, foram analisados por CG-EM, sendo identificados, como constituintes químicos, ácidos graxos, hidrocarbonetos, esteróides, carboidratos e alcoóis graxos. A partir de estudo fitoquímico clássico foram obtidos, do extrato hexânico, mistura de hidrocarbonetos, sendo o nonacosano o principal constituinte, a flavona eucaliptina (1), o feniletil éster nonacosanoato de 2-(4'-hidroxifenil)etila (2), e do extrato clorofórmico um álcool graxo (3) além de misturas de hidrocarbonetos.

Nos testes ecotoxicológicos, utilizando extratos de folhas de *E. urograndis*, foram determinados os valores da concentração efetiva (CE-50), para duas espécies de *Daphnia* e concentração letal mediana

(DL-50), para *Chironomus xanthus*. Nos testes com os extratos mais polares foram utilizados *Daphnia similis* e *D. laevis* (Anomopoda: Daphniidae) por serem organismos representantes da coluna d'água, e com os extratos menos polares, misturados ao substrato, foi utilizado *Chironomus xanthus* (Díptera: Chironomidae), organismo representante do sedimento.

Por meio dos testes realizados, foi possível evidenciar o efeito tóxico de todos os extratos de *E. urograndis* sobre os organismos aquáticos. Efeito de toxicidade também foi observado para *D. laevis*, sendo esta, nativa de lagos do Vale do Rio Doce. Os resultados obtidos mostraram que as folhas senescentes dos plantios de *E. urograndis* têm potencial para afetar a biota aquática.

Materiais e métodos

Procedimentos gerais

Espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C foram obtidos utilizando espectrômetro Bruker AVANCE DRX 400 ou Bruker DPX 200. As amostras foram dissolvidas em CDCl_3 e TMS foi usado como referencial ($\delta_{\text{H}} = \delta_{\text{C}} = 0$). Os espectros no IV (1% em KBr , cm^{-1}) foram obtidos em aparelho Perkin Elmer Spectrum One SN 74759. A identificação dos hidrocarbonetos foi feita por cromatografia gasosa de alta resolução (CGAR) utilizando aparelho HP5890, com injetor automático HP5989A, equipado com detector FID e coluna HP-5, utilizando H_2 como gás de arraste. Condições de análise: temp. injetor 280°C , temp. coluna, inicial de 50°C e aumento de $5^\circ\text{C}/\text{min}$ até 290°C ; temp. detector 290°C . Os resultados encontrados foram comparados com dados de padrão de hidrocarbonetos de cadeia longa (HC-22 a HC-33). As análises dos extratos vegetais foram realizadas em aparelho GC-MS QP5050A da marca Shimadzu, equipado com coluna capilar de sílica fundida ELITE 5 e hélio como gás de arraste. As condições cromatográficas foram: temperatura do injetor 290°C ; da coluna, 80°C por 5 minutos, aumentando de 80°C a 285°C na razão de $4^\circ\text{C}/\text{min}$, permanecendo na temperatura final (285°C) por 70 minutos. A temperatura do detector (interface) do sistema CG-EM foi de 290°C . O detector de massas operou com ionização por impacto de elétrons de 70 eV e varredura na faixa m/z 30 a 600. A identificação dos componentes dos extratos foi realizada por comparação dos espectros de massas do banco de dados do aparelho (Wiley 330.000) com dados da literatura e também através de injeção de amostras de substâncias padrão. As temperaturas de fusão foram determinadas em aparelho Mettler FP 80 HT e não foram corrigidos. Para as cromatografias em coluna (CC) foram empregadas sílica gel 60 (70-230 Mesh).

Preparação dos extratos

Folhas de *E. urograndis* foram coletadas em janeiro de 2007, da serapilheira do viveiro de mudas da Celulose Nipo-Brasileira (Cenibra). A monocultura dessa espécie, situada no talhão 170 (CAF0011, 2004) na propriedade da Companhia Agro Florestal, está localizada no Município de Dionísio, região do médio Rio Doce, nas proximidades do Parque Estadual do Rio Doce, em Minas Gerais.

Folhas secas ($152,0\text{ g}$) de *E. urograndis* foram moídas e submetidas à extração em aparelho Soxhlet utilizando sequencialmente 500 mL de hexano, clorofórmio, acetato de etila e etanol como solvente extrator, por 72 horas cada. Após preparação dos extratos orgânicos e secagem à temperatura ambiente (t.a.), a torta foi submetida à agitação magnética com água destilada, em t.a. durante aproximadamente 3 horas. Após filtração e liofilização obteve-se o extrato aquoso. Durante a remoção parcial do hexano observou-se a formação de um sólido, que foi filtrado e recristalizado com metanol/água (1:1), levando a obtenção do composto **1** ($35,0\text{ mg}$). O extrato hexânico ($4,85\text{ g}$) foi submetido à cromatografia em coluna utilizando como eluente hexano, clorofórmio, acetato de etila puros ou em mistura de polaridade crescente, fornecendo 40 frações de 50 mL cada. As frações foram agrupadas de acordo com o perfil obtido por cromatografia em camada delgada (CCD). Após lavagens com acetona, das

frações F20-22, F24-25, e F26 foram obtidas misturas de hidrocarbonetos de cadeia longa (HC), sendo o de 29 carbonos (nonacosano, 80%), o principal constituinte em todas elas. A fração F29 (605,0 mg) foi recromatografada por CC em sílica, eluída com hexano/EtOAc (9:1), hexano/EtOAc (8:2), hexano/EtOAc (1:1) e metanol puro, levando a obtenção de 94 frações de 10 mL cada. As frações foram analisadas por CCD e agrupadas de acordo com o perfil cromatográfico. No grupo de frações 16-20 foi identificada mistura de hidrocarboneto (nonacosano, 70%). Após lavagens das frações 32-54, com metanol obteve-se o composto **1** (48,5 mg). A fração F33 foi lavada com éter etílico e após secagem foi identificada como composto **2** (6,1 mg).

O extrato clorofórmico (9,33 g) foi submetido à CC utilizando como eluente hexano, clorofórmio, acetato de etila puros ou em mistura de polaridade crescente, obtendo-se 90 frações de 150 mL cada. Do grupo de frações 20-28 deste extrato, foi obtida mistura de hidrocarbonetos (112,5 mg) e do grupo de frações 45-46 isolou-se a substância **1** (23,5 mg), após recristalização da fração 44 com metanol/CHCl₃, obteve-se o composto **3** (9,3 mg).

Do extrato em acetato de etila (1,92 g) não foi possível isolar nenhuma substância em grau de pureza adequado para identificação. Os extratos etanólico (21,82 g) e aquoso (1,32 g) ainda não foram submetidos a estudos fitoquímicos.

Derivatização dos extratos

Alíquotas de aproximadamente 2,0 mg dos extratos hexânico, clorofórmico e aquoso, foram pesadas em um vidro internamente cônico e, em seguida, dissolvida em 60 µL de piridina e 100 µL de BSTFA (*N,O*-bis(trimetilsilil)-trifluoroacetamida) contendo 1,0% de clorotrimetilsilano. A mistura reacional foi aquecida a 70 °C por 30 min. Da solução obtida, apenas 1 µL foi injetado no CG-EM.

Ensaio ecotoxicológicos

Preparo dos extratos de baixa e média polaridade: hexânico, clorofórmico e acetato-etílico

Após pesagens, as amostras dos extratos (10,0; 40,0 e 75,0 mg) foram colocadas em béqueres e solubilizadas com solvente adequado, em seguida foram adicionados 5,0 g de substrato à solução. Após a completa evaporação do solvente, o substrato foi colocado em recipiente de plástico e foram adicionados 20,0 mL de água de cultivo mais 0,02 mL de alimento (solução preparada a partir da ração para peixes (Tetramin), batida no liquidificador com água destilada na proporção 5 mg/100 mL), e em seguida uma larva de *Chironomus xanthus* na fase III de desenvolvimento. Como controle foi usado: a) recipiente + substrato + solvente, e b) recipiente + substrato. Ao final do experimento, após 96 horas, verificou-se a mortalidade dos organismos.

Preparo dos extratos mais polares: etanólicos e aquosos

Preparo das soluções-estoque

Foram pesados 4,0 mg dos extratos etanólico e aquoso, em tubo *eppendorf* e completou-se o volume nos *eppendorfs* para 2 mL com a água de cultivo e água destilada.

Montagem do experimento

As soluções-estoque, tanto etanólicas como aquosas foram medidas em micropipetas manuais de 500,0 e 1000,0 µL. Os volumes desejados foram transferidos para recipientes plásticos, diluindo-os em 100 mL de água de cultivo. Após a homogeneização da nova solução, esta foi distribuída em recipientes plásticos menores, de 20 mL cada. Os experimentos foram montados com réplica tanto para *D. laevis* quanto para *D. similis*. Ao final dos experimentos, após 48 horas da montagem, os resultados obtidos foram processados utilizando o programa GW Basic, e o método estatístico Trimmed Spearman-Kärber, determinando assim, o valor de CE-50 para cada espécie.

Resultados e discussão

Os extratos hexânico, clorofórmico e aquoso, após derivatização com BSTFA, foram analisados por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas. Através dos cromatogramas das amostras foi possível identificar um grande número de compostos (Tabela 1). As principais classes de compostos detectadas foram ácidos graxos, hidrocarbonetos de cadeia longa, esteróides, carboidratos e alcoóis graxos. No extrato hexânico foram identificados 14 compostos, no clorofórmico 7 e no aquoso 4 constituintes. Alguns compostos não foram identificados, por apresentarem baixa área relativa nos cromatogramas ou não pertencerem a nenhuma das classes químicas acima citadas, visto que o espectro de massas foi completamente diferente.

Tabela 1: Classes ou compostos detectados nos extratos hexânico (EH), clorofórmico (EC) e aquoso (EAQ) de *Eucalyptus urograndis* por meio de CG-EM

TR	composto identificado	% área relativa		
		EH	EC	EAQ
13,25	derivado do reagente de derivatização			11,7
14,86	glicerol		9,2	14,2
16,37	2-isopropil-5-metilfenol		0,6	
26,34	carboidrato		0,4	
27,26	carboidrato		0,5	
27,49	carboidrato		0,5	
27,93	carboidrato		0,4	
28,34	carboidrato		2,4	
28,81	carboidrato		0,9	
30,27	carboidrato		1,4	
30,65	carboidrato		0,4	
31,72	carboidrato		1,3	
31,94	carboidrato		0,8	
32,03	carboidrato		0,3	6,6
32,18	carboidrato		0,6	
32,23	ácido tetradecanóico	2,2	0,6	
33,99	carboidrato		1,8	3,1
34,12	carboidrato		0,7	
34,32	carboidrato		0,5	
35,45	ácido 3,4,5-triidroxibenzóico			11,1
36,38	carboidrato		2,1	4,4
37,18	ácido hexadecanóico	2,3	2,2	2,3
38,79	carboidrato (inositol)			4,0
41,04	ácido octadec-9.12-dienóico	0,4		
41,14	ácido octadec-9-enóico	0,5		
45,68	glicopirranose		1,7	
46,51	carboidrato		16,0	
50,60	carboidrato			2,5
50,82	hidrocarboneto	0,2		
51,73	tetracosan-1-ol	0,6		
52,94	carboidrato		0,3	
53,07	carboidrato			4,6
54,05	carboidrato		0,5	
54,19	carboidrato		0,9	
54,76	carboidrato		0,2	
55,20	carboidrato		0,8	
55,29	hexacosan-1-ol	9,1	0,5	

55,35	carboidrato		0,2	5,9
55,71	carboidrato	0,3	0,7	
55,88	carboidrato		0,7	
56,45	carboidrato	0,5	2,2	
56,82	ácido heptacosanóico	1,6		
56,90	heptacosan-1-ol	0,6		
57,62	carboidrato			6,5
58,78	octacosan-1-ol	8,5		
59,88	carboidrato		0,6	
60,29	carboidrato			4,1
60,86	ácido octacosanóico	3,8	0,4	
62,85	estigmasterol	0,8		
63,56	triacontan-1-ol	3,7		
64,46	estigmast-5-en-3-ol	2,0	0,6	5,2
66,73	ácido triacontanóico	1,4		
68,41	carboidrato			1,0
69,98	esteróide	2,9		
70,74	esteróide	0,9		
71,63	esteróide	8,3		
71,95	esteróide	1,1	4,6	
72,32	esteróide	3,1		
72,47	esteróide	1,0		
72,98	esteróide	2,8		
73,63	esteróide	1,9		
74,70	esteróide		1,0	
75,14	esteróide		4,7	
75,32	esteróide		10,7	
75,49	esteróide	12,3		
75,94	esteróide	4,3		
78,53	carboidrato			4,2
80,46	esteróide	1,2		
80,81	esteróide	0,9		
81,44	esteróide		2,6	
83,41	esteróide		2,7	
83,55	esteróide		5,3	
87,94	esteróide		2,6	
		79,0	87,8	91,3

Para alguns compostos foi possível apenas classificá-los, de acordo com o padrão de fragmentação, em classes químicas, não sendo possível sua identificação.

As misturas de hidrocarbonetos, obtidas dos extratos hexânico e clorofórmico, apresentaram perfis similares quando analisadas por CGAR. Como exemplo, a análise do grupo de frações 16 a 20 do extrato hexânico apresentou como constituintes: 69,95% de HC-29, 21,59% de HC-21 e 7,72% de HC-27.

O composto **1** foi obtido como um sólido cristalino amarelo (195-6 °C), e seu espectro no IV mostrou bandas de absorção relacionadas a grupo hidroxila (3436 cm⁻¹) e carbonila conjugada (1654 cm⁻¹). O espectro de RMN de ¹H apresentou dois dupletos em δ 7,01 e 7,84 (*J* = 8,8 Hz) com integração de 2 hidrogênios indicando a presença de hidrogênios *orto* em sistema aromático. Apresentou ainda simpletos relativos a hidrogênios de duas metoxilas (δ 3,80 e 3,89) e de duas metilas (δ 2,20 e 2,38). O espectro de RMN de ¹³C e DEPT-135 mostrou a presença de 18 sinais de carbonos, sendo 4 metílicos, 5 metínicos e 9 não hidrogenados. Análise minuciosa dos espectros HMBC, HSQC e NOESY permitiu identificar o composto **1** como sendo o 5-hidroxi-4',7-dimetoxi-6,8-dimetilflavona. Este composto já foi isolado de folhas de *E. saligna* [6].

O composto **2** foi isolado como um sólido branco. O espectro no IV mostrou bandas de grupo hidroxila (3311 cm^{-1}) e grupo éster (1733 cm^{-1}). O seu espectro de RMN de ^1H apresentou sinais de hidrogênios aromáticos em δ 6,84 e 7,30 ($J = 8,4\text{ Hz}$) sugerindo a presença de um anel aromático 1,4-dissubstituído. Apresentou também 4 tripletos localizados em δ 0,88 (3H); δ 2,28 (2H); δ 2,85 (2H) e δ 4,23 (2H) que foram atribuídos a grupo metila terminal em cadeia longa, grupo metilênico vizinho a grupo carbonila, grupo metilênico benzílico e grupo metilênico de um éster. Baseado na análise dos espectros HMBC, HSQC bem como utilizando a integração dos sinais de hidrogênio e de carbono-13 foi possível sugerir para o composto **2** a estrutura do nonacosanoato de 2-(4'-hidroxifenil)etila, composto anteriormente isolado dos troncos de *Stereospermum personatum* [7].

O composto **3** foi isolado como um sólido branco e seu espectro no IV indicou presença de hidroxila (3384 cm^{-1}) e cadeia alifática graxa devido as bandas de absorção em 730 e 720 cm^{-1} . O espectro de RMN de ^1H apresentou um tripleto em δ 3,64 ($J = 8,3\text{ Hz}$) que foi atribuído a grupo metilênico de álcool. A análise dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C permitiu sugerir para o composto **3** a estrutura de um álcool de cadeia longa, este tipo de composto já foi detectada em madeira de *E. globulus* [8].

Baseando-se no fato que as espécies do gênero *Eucalyptus* apresentam elevadas concentrações de metabólitos secundários e que lagoas próximas aos plantios florestais de eucaliptos recebem considerável quantidade de material alóctone da serapilheira, foram realizados testes ecotoxicológicos com extratos de *E. urograndis*, utilizando para os extratos mais polares *Daphnia similis* e *D. laevis*, e para os extratos menos polares *Chironomus xanthus*.

Todos os extratos avaliados apresentaram efeito tóxico sobre os organismos submetidos aos testes. Foram encontrados os valores de DL-50 $7,5\text{ mg/5 g}$, $4,0\text{ mg/5 g}$ e $10,0\text{ mg/5 g}$ para os extratos hexânico, clorofórmico e acetato de etila, respectivamente. Para o extrato etanólico verificaram-se as CE-50 de $2,49\text{ mg/100 mL}$ e $2,57\text{ mg/100 mL}$ para *D. laevis* e *D. similis* respectivamente, já para o extrato aquoso encontraram-se as CE-50 de $996,6\text{ }\mu\text{L/100 mL}$ ($1,99\text{ mg/100 mL}$) e $884,8\text{ }\mu\text{L/100 mL}$ ($1,68\text{ mg/100 mL}$) para *D. laevis* e *D. similis* respectivamente.

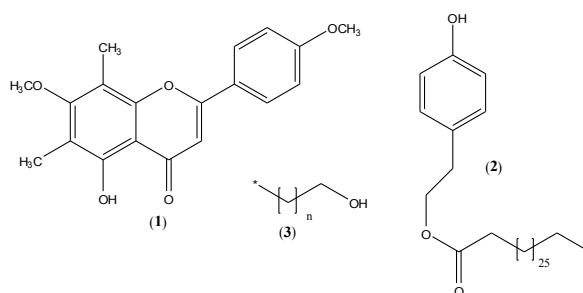


Figura 1: Estrutura química dos constituintes **1**, **2** e **3** isolados de folhas de *E. Urograndis*.

Os resultados dos testes com os extratos de *E. urograndis* nos organismos-teste (*C. xanthus* e *Daphnia* sp) mostraram a existência de efeito tóxico de seus compostos químicos em comunidades de macro e micro-invertebrados aquáticos. Como muitas espécies desses organismos servem de fonte alimentar para peixes e pássaros, conclui-se que níveis tróficos superiores também podem ser afetados pela presença de folhas de *E. urograndis*. Assim, estudos ecológicos sobre o efeito da serapilheira de *E. urograndis* e outras espécies de eucaliptos, na teia e cadeia alimentar existente em ambientes aquáticos, indiretamente impactados pelas plantações, são essenciais para a preservação das espécies animais existentes na região.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro. Ao professor Luiz Claudio A. Barbosa, UFV, pelas análises de CG-EM.

Referências

- [1] F. O. Silvério, Caracterização de extrativos de madeira de *Eucalyptus* e depósitos de pitch envolvidos na fabricação de celulose e papel, 180p, Tese de Doutorado, UFMG, 2008.
- [2] S. Benyahia, S. Benayache, F. Benayache, F. León, J. Quintana, M. López, J. C. Hernández, F. Estévez, J. Bermejo, Cladocalol, a pentacyclic 28-nor-triterpene from *Eucalyptus cladocalyx* with cytotoxic activity, *Phytochemistry*, 66 (2005) 627–632.
- [3] J. Silva, W. Abebe, S. M. Sousa, V. G. Duarte, M. I. L. Machado, F. J. A. Matos, Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of *Eucalyptus*. *J. Ethnopharmacol.*, 89 (2003) 277–283.
- [4] L. R. Williams, J. K. Stockley, W. Yan, V. N. Home, Essential oils with high antimicrobial activity for therapeutic use. *Int. J. Aromatherapy*, 8 (1998) 30–40.
- [5] F. O. Silvério, L. C. A. Barbosa, C. R. A. Maltha, A. J. D. Silvestre, D. Piló-Veloso, J. L. Gomide, Characterization of lipophilic Wood extractives from clones of *Eucalyptus urograndis* cultivate in Brazil. *Bioresources*, 2 (2007) 157-168.
- [6] A. C. Mitaine-Offet, J. D. Djoukeng, L. A. Tapondjou, H. Bouda, H. Lerche, D. Lontsid, M. A. Lacaille-Dubois, Constituents of the leaves of *Eucalyptus saligna*, *Biochem. Syst. Ecology*, 31 (2003) 1457-1460.
- [7] U. S. Kumar, A. K. Tiwari, S. V. Reddy, P. Aparna, R. J. Rao, A. Z. Ali, J. M. Rao, Free-Radical-Scavenging and Xanthine Oxidase Inhibitory Constituents from *Stereospermum personatum*, *J. Nat. Prod.*, 68 (2005) 1615-1621.
- [8] A. Gutiérrez, J. C. Río, J. Rencoret, D. Ibarra, Á. T. Martínez, Main lipophilic extractives in different paper pulp types can be removed using the laccase–mediator system, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 72 (2006) 845-851.