

**Estudo químico e biológico da cera cuticular das folhas da espécie
Protium leptostachyum Cuatrec. (Burseraceae)**

**Chemical and biological study of cuticular wax from leaves of the species
Protium leptostachyum Cuatrec. (Burseraceae)**

Kennedy Lima da Silva¹, Delcio Dias Marques², Ludimila Klippel Aguiar³, Carlos Eduardo Garção de Carvalho^{4*}, Giulliano Scarante Cezarotto⁵, Daniele Alves Ferreira⁶, Rogerio Antonio Sartori⁷

¹Centro Universitário UniNorte, ²Centro de Ciências Biológicas e da Natureza – Universidade Federal do Acre, ³Centro Universitário UniNorte, ⁴Centro de Ciências Biológicas e da Natureza – Universidade Federal do Acre, ⁵Instituto de Análise Forense da Polícia Civil do Estado do Acre, ⁶Universidade Federal do Ceará, ⁷Centro de Ciências Biológicas e da Natureza – Universidade Federal do Acre. *carlosgarcao.ufac@gmail.com

Resumo

O estudo químico e biológico da espécie *Protium leptostachyum* Cuatrec (Burseraceae), coletada no município de Mâncio Lima, Acre, teve por objetivo realizar a prospecção fitoquímica dos bioativos, a caracterização do perfil químico da cera cuticular, usando espectroscopia no infravermelho (IV) e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG/EM), a quantificação de taninos e flavonoides totais, por espectroscopia na região do ultravioleta/visível (UV/VIS) e a análise biológica em cepas gram-negativas e gram-positivas. A prospecção fitoquímica possibilitou identificar as classes de taninos, esteroides, triterpenoides e flavonoides como os principais bioativos presentes na casca e no lenho da espécie. O efeito de polaridade do solvente na quantificação de taninos e flavonoides totais revelou o metanol com a maior eficiência extrativa para os fenólicos do lenho (201,571 mgEAG g⁻¹) e da casca (246,571 mgEAG g⁻¹). Entretanto, para os flavonoides os solventes metanol e etanol não revelaram grandes alterações na capacidade de extração. A média geral do rendimento da cera cuticular por área foliar foi de 97,59±5,00 µg cm⁻². A análise de CG/EM apresentou 54 compostos distribuídos principalmente em aldeídos (5,55%), hidrocarbonetos (11,11%), ésteres metílicos e etílicos (11,11%), esteroides (3,70%), triterpenos pentacíclicos (7,40%), óleo essencial (37,04%), outros compostos (5,55%) e os não identificados (18,52%). A análise biológica revelou que fração etanólica do extrato hexânico (FET) das folhas e o extrato etanólico da casca apresentaram eficácia bactericida gram-positiva para *Streptococcus pneumoniae* (SP).

Palavras-chave: *Protium leptostachyum*. Cera cuticular. *Streptococcus pneumoniae*.

Abstract

Chemical and biological study of the species *Protium leptostachyum* Cuatrec (Burseraceae), collected in the municipality of Cruzeiro do Sul, Acre, aimed to carry out the phytochemical prospecting of bioactives, the characterization of the chemical profile of cuticular wax, using infrared (IV) spectroscopy and gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC/MS), the quantification of total tannins and flavonoids, by spectroscopy in the ultraviolet/visible (UV/VIS) region and biological analysis in gram-negative and gram-positive strains. Phytochemical prospecting made it possible to identify the classes of tannic, steroids, triterpenoids and flavonoids as the main bioactive present in bark and wood of the specie. The polarity effect of the solvent in the quantification of total tannins and flavonoids revealed the

methanol with the highest extraction power for the phenolic compounds of wood (201.571 mgEAG g⁻¹) and bark (246.571 mgEAG g⁻¹). However, for flavonoids, methanol and ethanol solvents did not reveal major changes in the extraction power. The general average of cuticular wax yield per leaf area was 97.59 ± 5.00 µg cm⁻². The CG/EM analysis showed 54 compounds distributed mainly in aldehydes (5.55%), hydrocarbons (11,11%), methyl and ethyl esters (11,11%), steroids (3.70%), pentacyclic triterpenes (7.41%) and essential oil (37,04%), in addition to other compounds (5,55%) and unidentified (18,52%). The biological analysis revealed that the ethanolic fraction of the hexane extract (FET) of the leaves and the ethanolic extract of the bark showed gram-positive bactericidal efficacy for *Streptococcus pneumoniae* (SP).

Keywords: *Protium leptostachyum*. Cuticular wax. *Streptococcus pneumonia*.

Introdução

A estrutura primária do corpo dos vegetais é constituída por órgãos vegetativos como raiz, caule e folhas, que são formadas basicamente por sistema vascular e pelo sistema dérmico. Particularmente as partes aéreas das plantas superiores, como as folhas, são cobertas por uma estrutura chamada de cutícula, que representa uma camada hidrofóbica extracelular que cobre as células epidérmicas aéreas de todas as plantas terrestres, fornecendo proteção contra dessecação e estresses ambientais externos [1 e 2].

Do ponto de vista morfológico, a cutícula é constituída de uma fina camada mais externa chamada de cera epicuticular, formada de material lipofílico, cobrindo a camada inferior se encontra outra capa denominada de cutina, que se entrelaçam com substâncias formadoras da parede celular [3 e 4].

A constituição química da cera epicuticular é formada principalmente de séries homólogas de n-alcenos de cadeia longas, álcoois, cetonas e ésteres [5]. Além desses compostos, também estão presentes, embora em baixa concentração, esteroides e triterpenoides pentacíclicos [6], cicloartanos da classe de triterpenos tetracíclicos, lupeol [7], flavonoides [8] e outros grupos funcionais como aldeídos e derivados do ácido hidroxicinâmico [9 e 10].

Os estudos da composição química em cera cuticular, em plantas superiores, têm sido utilizados para marcadores quimiotaxonômicos, contribuindo na classificação botânica, como correlacionar a natureza e a composição química da cera, com a suscetibilidade do vegetal ao ataque de agentes químicos [11].

Apesar da grande quantidade de trabalhos publicados na literatura relacionada às atividades biológicas e estudo fitoquímico de espécies do gênero *Protium*, poucos abordaram a composição da cera cuticular e do caule dessas espécies. A identificação da cera cuticular do gênero *Protium* foi registrada inicialmente na espécie *P. icicariba* [12]. Em relação à parte do lenho, Zoghobi et al. (1993) [13] investigaram o caule da espécie *P. paniculatum* e Costa et al., (2012) [14] da espécie *P. hebetatum*.

Nesse contexto, o presente trabalho teve por objetivo a seleção do gênero *Protium* para investigação química e biológica, tendo como interesse a identificação dos constituintes da cera cuticular, a quantificação dos taninos e flavonoides totais da casca e do lenho da espécie *P. leptostachyum* Cuatrec.

(Burseraceae). A prospecção fitoquímica foi realizada com as folhas, casca do lenho e o lenho da espécie. Foram também realizados testes antimicrobianos com os extratos das folhas, casca do lenho e o lenho em cepas do *Staphylococcus aureus* (ATCC 12598), *Escherichia coli* (ATCC 10536), *Klebsiella pneumonia* (ATCC 700603) e *Streptococcus pneumoniae* (ATCC 11733).

Material e métodos

Coleta e Processamento da Amostra Botânica

A coleta da espécie *P. leptostachyum* Cuatrec. foi realizada no município de Mâncio Lima, Acre, em propriedade particular, BR 307 (7° 28' 51'' S, 72° 53' 58'' W). A exsicata (n° 6.648) foi registrada no Laboratório de Botânica e Ecologia Vegetal da Universidade Federal do Acre (UFAC), sendo identificada pelo Prof. PhD. Douglas C. Daly. Foram coletadas amostras de folhas (1,3 kg), cascas (1,28 kg) e lenho (1,23 kg) que foram secadas em estufa de circulação de ar forçado, por 72 horas a 40°C, e trituradas em moinho de aço inox. Três grupos de amostra de folhas, totalizando dezoito, foram separados e fotografados individualmente, com a finalidade de se determinar a área foliar, calculada através do software *Image J* 1.49, extraída conforme metodologia estabelecida por Cordeiro et al., (2011) [15].

Prospecção Fitoquímica Qualitativa

A prospecção fitoquímica qualitativa foi realizada com os extratos etanólicos da casca (EEC) e do lenho (EEL), conforme Matos (1997) e Barbosa (2004) [16 e 17].

Quantificação de Fenóis e Flavonoides Totais

As amostras da casca e do lenho foram refinadas em liquidificador doméstico e passadas em peneira de granulometria de 48 mesh. Cada amostra, 50 g, foi desengordurada com hexano por maceração à temperatura ambiente, por 24 horas. Após a separação do extrato hexânico, as amostras desengorduradas foram secadas em estufa de circulação de ar forçado, por 24 horas, a 40°C.

Para a extração e quantificação dos bioativos, foram utilizados três solventes de polaridade crescente: acetona, etanol e metanol. A extração foi realizada usando um grama de cada amostra desengordurada (casca e lenho) com 20 mL de cada solvente. As misturas (total de 6) foram agitadas durante 30 minutos e filtradas em funil filtro de placa porosa número 3. As soluções resultantes foram concentradas em banho-maria e secadas em estufa de circulação de ar forçado, a 40°C, por 24 horas.

A quantificação dos compostos fenólicos foi determinada utilizando o reativo de Folin-Ciocalteu, e o branco foi água e os reagentes [18]. Inicialmente, foram preparadas soluções aquosas dos extratos (acetona, etanol e metanol) na concentração de 100 ppm. Foi adicionado em um tubo de ensaio alíquota de 5,0 mL da solução aquosa (100 ppm) e depois 0,25 mL do reativo de Folin-Ciocalteu. Após

três minutos, foi adicionado 1,0 mL de solução de carbonato de sódio a 30% (m/v). A mistura reacional foi deixada em repouso por uma hora, na ausência de luz, antes da leitura da absorbância realizada a 760 nm. A curva de calibração foi construída com soluções-padrão de ácido gálico (AG) a 25, 50, 100 e 200 ppm, e o resultado foi expressado em mgEAG g⁻¹ (miligrama equivalente de ácido gálico por grama de amostra desengordurada).

A quantificação de flavonoides total foi determinada utilizando solução de cloreto de alumínio, conforme Do et al., (2014) [18]. Inicialmente, foram preparadas soluções metanólicas dos extratos secos (acetona, etanol e metanol) na concentração de 100 ppm. Foram adicionados 5,0 mL da solução metanólica (100 ppm) em tubo de ensaio e depois 0,2 mL da solução de cloreto de alumínio 10% (m/v) e 0,2 mL da solução acetato de potássio 0,1 mol L⁻¹. A mistura foi mantida a temperatura ambiente durante 30 minutos, na ausência de luz, antes da leitura da absorbância realizada a 415 nm. Foi construída uma curva de calibração com soluções-padrão de quercetina (Q), nas concentrações de 25, 50, 100, 200 e 300 ppm. O teor de flavonoides totais foi expressado em mgEQ g⁻¹ (miligrama equivalente de quercetina por grama de amostra desengordurada). Todas as análises quantitativas foram realizadas em triplicatas e analisadas em espectrofotômetro monocromático UV/Vis, marca SHIMADZU, modelo UV-1650PC.

Análise Cromatográfica e Espectroscópica

As amostras trituradas (folhas, casca e lenho) foram submetidas à extração inicialmente com hexano (folhas = 18,9 g, casca = 20,5 g, lenho = 0,94 g) e depois em etanol (folhas = 34,4 g, casca = 86,0 g, lenho = 10,70 g). O extrato hexânico das folhas foi submetido à cromatografia filtrante, em sílica gel 60 (230 mesh), obtendo as frações: éter de petróleo - FEP (4,27 g), diclorometano - FDM (7,69 g) e etanol - FET (3,11 g). A fração FEP foi recromatografada em coluna empacotada com sílica gel 60 (35-70 mesh), obtendo-se duas frações: FEP-1 (2,5g, Hex) e FEP-2 (0,065g, 9:1 de Hex:CH₂Cl₂). A fração FDM permitiu reunir em: FDM-1 (0,081 g Hex) e FDM-2 (0,156 g Hex); FDM-3 (0,674 g, 9:1 de Hex:CH₂Cl₂); FDM-4 (1,638 g, 8:2 de Hex:CH₂Cl₂) e FDM-5 (0,361 g, 6:4 de Hex:CH₂Cl₂). As frações foram comparadas através da cromatografia de camada delgada (CCD); também submetidas à análise em cromatógrafo gasoso acoplada a espectrômetro de massa (CG/EM) e espectroscopia na região do infravermelho (IV).

As análises de CG/EM e IV foram realizadas no Instituto de Análise Forense da Polícia Civil do Estado do Acre. O CG/EM utilizado foi da marca Agilent Technologies, modelo 5975C, com coluna capilar HP-5MS (30 m x 0,25 mm d.i. x 0,25 µm de filme), operando com as condições: gás de arraste hélio, fluxo 1 mL min⁻¹, modo Split 1:50. A temperatura do injetor foi de 290°C, gradiente inicial 80°C, por 5 minutos, aumentando 4°C min⁻¹ até 285°C, permanecendo por 40 minutos. A temperatura do detector e da interface de 290°C, por impacto eletrônico (70 eV). Os espectros de infravermelho foram obtidos em espectrômetro por transformada de Fourier, marca Perkin Elmer, modelo FT-IR Spectrum

100S, versão 10.4.2, na faixa de 4000 a 400 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} , com acessório de reflectância atenuada total universal (UATR), empregando cristal de seleneto de zinco.

Atividade Microbiológica

A atividade microbiológica foi realizada com as frações oriundas da cromatografia filtrante do extrato hexânico das folhas (FEP, FDM e FET); com os extratos hexânicos e etanólicos da casca (EHC e EEC) e do lenho (EHL e EEL), utilizando a técnica de difusão em disco [19].

As cepas das bactérias patogênicas utilizadas foram: *Staphylococcus aureus*, (ATCC 25923), *Streptococcus pneumoniae* (ATCC 49619), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603). As mesmas foram crescidas a 37°C, por 4 a 6 horas, sendo a turbidez ajustada para escala 0,5 de McFarland. Em seguida, as bactérias foram inoculadas em placas de Petri contendo meio Muller-Hinton. Sobre o meio de cultura foram depositados discos de papel e sobre estes 20 μL das amostras a serem analisadas, sendo incubados a 37°C, por 24 horas. Os halos de inibição produzidos foram medidos com paquímetro digital.

Resultados e discussão

Prospecção Fitoquímica Qualitativa

A pesquisa qualitativa realizada com os extratos etanólico do lenho (EEL) e da casca (EEC) possibilitou identificar as principais classes de bioativo presente na espécie. Os resultados revelaram a mesma constituição de classe de metabólitos presentes em ambos os extratos do lenho e da casca (Tabela 1). Todos os ensaios positivos no lenho foram também identificados na casca, não apresentando grandes variações de intensidade de coloração. O mesmo princípio foi observado em relação à ausência dos constituintes. Foram identificados taninos, ácidos orgânicos livres, açúcares redutores, triterpenos, flavonoides e saponinas.

A prospecção qualitativa indicou a presença de alcaloides na espécie em estudo, contudo não existe na literatura registro de alcaloides no gênero *Protium*. O ensaio foi realizado somente com o reagente Dragendorff. As cumarinas também podem apresentar uma coloração fraca e não específica, devido à estrutura da lactona insaturada, com o reagente de Dragendorff [20].

As espécies do gênero *Protium* têm sido objeto de pesquisa no campo da fitoquímica, com o intuito da identificação de constituintes voláteis da resina, exsudado característico da família Burseraceae, como também das folhas e frutos [21, 12 e 22]. Além da identificação dos constituintes voláteis, a grande maioria dos trabalhos publicados na literatura está relacionada ao isolamento e identificação dos constituintes fixos da resina. Em relação aos estudos fitoquímicos do lenho e da casca, são raros os registros na literatura especializada [13 e 14] e ainda mais raros para a cera cuticular.

Tabela 1: Resultados da prospecção fitoquímica qualitativa do lenho e da casca da espécie *P. leptostachyum* Cuatrec (Burseraceae).

ENSAIOS QUALITATIVOS	LENHO (EEL)	CASCA (EEC)
Taninos Condensados (FeCl ₃)	+++	+++
Proteínas (Ninhidrina)	-	-
Ácidos Orgânicos (Pascová)	+	+
Polissacarídeos (Lugol)	-	-
Açúcares Redutores (Fehling)	+	+
Glicosídeos Cardiotônicos (Kedde)	-	-
Esteróide e Triterpenos (Liebermann-Burchard)	++	++
Glicosídeos Cardiotônicos (Nitroprussiato de Sódio)	+	+
Quinonas (Bornträge)	-	-
Sesquiterpenolactonas (Cloridrato de hidroxilamina)	-	-
Flavonoide Geral (Shinoda)	++	++
Carotenóides (Tricloreto de antimônio)	-	-
Saponinas (Teste de espuma)	+	+
Alcalóides (Dragendorff)	+	+
Depsídeos e Depsidonas (FeCl ₃)	-	-

+++ = Coloração intensa; ++ = Coloração moderada; + = Coloração fraca.

Quantificação da Cera Cuticular e Análise de CG/EM

A determinação da área foliar e a concentração da cera cuticular foram realizadas com os três lotes de folhas, coletados aleatoriamente. O primeiro lote (L1) apresentou área adaxial que variou de 12,19 a 51,48 cm², apresentando a menor média de área superficial de 50,42 cm², resultando o rendimento de 99,17 µg cm⁻² de cera cuticular (Tabela 2).

O segundo lote (L2) apresentou mínimo de 15,20 cm² e máximo de 51,21 cm², média de 58,06 cm², resultando o maior rendimento de cera cuticular de 101,62 µg cm⁻² e o último (L3) apresentou área de 17,29 cm² a 62,58 cm², média de 58,70 cm² e rendimento de 91,99 µg cm⁻².

Apesar do terceiro lote (L3) ter apresentado a maior média de área superficial (58,70 cm²), não resultou em maior quantidade de cera cuticular extraída (5400 µg). Esta diferença pode estar relacionada com a perda de massa ocorrido durante o processo de extração. A média geral do rendimento por área da cera cuticular das folhas da espécie em estudo foi de 97,59 µg cm⁻². Conforme Monquero et al., (2004) [23] a quantidade da cera epicuticular pode variar de 10 a 200 µg cm⁻².

Tabela 2: Determinação do rendimento da cera cuticular da folha do *P. leptostachyum* Cuatrec.

Lotes	Área Adaxial (cm ²)	Área Superficial Média (cm ²)	Cera Cuticular (µg)	Cera/Área Foliar (µg cm ⁻²)
L1.1	51,48	50,42	5000	99,17
L1.2	29,67			
L1.3	14,84			
L1.4	22,55			
L1.5	20,52			
L1.6	12,19			
L2.1	15,20	58,06	5900	101,62
L2.2	27,49			
L2.3	20,03			
L2.4	51,21			
L2.5	30,62			
L2.6	29,64			
L3.1	62,58	58,70	5400	91,99
L3.2	26,06			
L3.3	19,86			
L3.4	30,48			
L3.5	19,87			
L3.6	17,29			

A análise realizada em cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massa (CG/EM) das frações do éter de petróleo (FEP) e do diclorometano (FDM) do extrato hexânico das folhas, registrou um total de 56 (cinquenta e seis) compostos, sendo que 13 (treze) compostos não foram identificados (Tabela 3).

Tabela 3: Constituintes químicos das frações FEP e FDM do extrato hexânico das folhas do *P. leptostachyum* Cuatrec.

Constituintes	TR	Amostras (%)							
		FEP 1	FEP 2	FEP 3	FDM 1	FDM 2	FDM 3	FDM 4	FDM 5
α-Copaeno	10,774				1,07				
E-Cariofileno	11,852				1,28				
α-Guaieno	12,276				1,31				
α-Humuleno	12,674				0,56				
γ-Muuroleno	13,207				0,36				
β-Silinenos	13,473				4,18				
α-Silinenos	13,681				0,69				
α-Muuroleno	13,779				0,40				
γ-Cadineno	14,122				0,85				
δ-Cadineno	14,331				2,40				
Espatuleno	15,656							3,33	
Tetradecanal	16,352					1,83			
Carvacrol	18,158			1,11					
Octadecanal	18,658					6,04			
Hexadecanoato de metila	23,138					7,71			
Hexadecanoato de etila	24,492					11,61			
epi-Cubebol	24,640			1,44					

δ -Candineno	25,494	1,24	2,11	2,23					
Ledeno	26,205			1,10					
Nerolidol	26,749	1,63	2,37	9,13					
Octadecanoato de metila	27,035					1,89			
Óxido de Cariofileno	27,454	34,52	24,44	32,30			19,73	0,62	
Não identificado	28,159	7,83	2,36	7,63			5,56		
γ -Cadino-1,4-dieno	28,256	1,87	11,2	1,70					
Octadecanoato de etila	28,260					3,10			
σ -Copaeno	28,282			3,37					
Não identificado	28,631			1,75					
Não identificado	29,485		1,41						
Jatamol A	29,860		1,35						
Pentadecanal	30,811	2,83	2,35						
Hexadecanoato de cicloexila	31,477					48,47			
Não identificado	33,353			1,19			0,93		8,77
Ácido octadec-9-enóico	34,315					2,87			
Octadecatri-9,12,15-enoato	34,418						1,43		
2-Cicloexila-undecano	34,715					11,99			
Pentacosano (C25)	39,330				13,62				
Heptacosano (C27)	40,605				1,29				
Nonacosano (C29)	41,640				58,45	4,49			
Triacotano (C30)	42,645				2,27				
Estigmasterol	43,746								8,14
Hentriacontano (C31)	43,835		1,85		11,27				
γ -Sitosterol	44,555								83,09
Ftalato de di-(2-etilhexil)	49,673			1,26					
Não identificado	56,491			1,02					
Não identificado	57,992			1,32					
α -Tocoferol	60,651	38,37	38,95	1,40			25,78		
Não identificado	63,128			1,20			11,10		
β -Amirina	65,871	1,76		1,72				32,92	
α -Amirina	66,628			2,59				63,13	
Lupenona	67,385	6,42	8,07	8,06			35,47		
Não identificado	68,251			6,80					
Não identificado	68,594			2,45					
Não identificado	69,991			1,03					
Friedooleanan-3-ona	73,374	3,53	3,50	8,21					
TOTAL %		92,17	96,23	82,50	100	100	82,41	100	91,23

TR = Tempo de retenção; FEP = Fração éter de petróleo do extrato hexânico das folhas; FDM = Fração diclorometano do extrato hexânico das folhas.

A análise dos espectros de massas oriundos dos cromatogramas das frações FEP analisadas permitiu registrar um total de 27 (vinte e sete) compostos, 10 (dez) não identificados; 7 (sete) compostos voláteis mono e sesquiterpenos, sendo o óxido de cariofileno o constituinte em maior concentração (FEP-1=34,52%); 4 (quatro) triterpenos: β -amirina (FEP-1=1,76%), α -amirina (FEP-2=2,59%), lupenona (FEP-2=8,07%) e o friedooleanan-3-ona (FEP-1=3,53%); 1 (um) aldeído, pentadecanal (FEP-2=2,35%); 1 (um) hidrocarboneto de cadeia linear longa, hentriacontano (FEP-2=1,85%); 1 (um) éster aromático, ftalato de di-(2-etilhexil) (FEP-3=1,26%) e o α -tocoferol (FEP-2=38,95%), sendo este o mais abundante

na fração. As frações FDM registraram um total de 32 (trinta e dois) compostos, sendo que 3 (três) não identificados. Os compostos identificados foram classificados em 12 (doze) constituintes voláteis, como principal o óxido de cariofileno (FDM-3=19,73%); 6 (seis) ésteres de cadeia longa, com maior concentração o hexadecanoato de etila (FDM-3=11,61%); 6 (seis) hidrocarboneto de cadeia longa como o pentacosano (FDM-1=13,62%), nonacosano (FDM-1=58,45%) e 2-Cicloexila-undecano (FDM-2=11,99%) como principais; 2 (dois) aldeídos: tetradecanal (FDM-2=1,83%) e o octadecanal (FDM-3=6,04%); 3 (três) triterpenos pentacíclicos: a lupenona (FDM-3=35,47%), β e α -amirina (FDM-4=32,92 e 63,13%, respectivamente); 1 (um) ácido insaturado: octadec-9-enóico (FDM-2=2,85%); 2 (dois) esteroides: o estigmasterol e γ -sitosterol (FDM-5=8,14 e 83,09%, respectivamente), além do α -tocoferol (FDM-3=25,78%).

O espectro na região do infravermelho da fração FDM-1 apresentou duas bandas em 1462 e 1377 cm^{-1} , características da deformação angular dos grupos metileno (CH_2) e metila (CH_3), respectivamente; dois sinais em 729 e 719 cm^{-1} , característico da absorção do grupo metileno (CH_2) associado a cadeia longa de hidrocarboneto com quatro ou mais grupos metilenos; além de outras absorções características de hidrocarbonetos lineares. Esta fração se caracterizou como uma mistura de óleo essencial em baixa concentração e de hidrocarbonetos de cadeia longa (C25, C27, C29, C30 e C31), com 100% de identificação, através da análise de CG/EM.

A fração FDM-4 se caracterizou por uma mistura binária dos triterpenos pentacíclicos da série ursano e oleanano, β e α -amirina (96,03%). Os espectros de massas do β -amirina e do α -amirina apresentam uma grande semelhança, como esperado, diferenciando apenas a intensidade dos fragmentos. O espectro do β -amirina apresentou baixa intensidade dos fragmentos entre 20-175 m/z , em relação ao espectro do α -amirina. Outra diferença observada diz respeito aos fragmentos $m/z = 203$ e $m/z = 189$, que no espectro da α -amirina este último fragmento é mais intenso, ocorrendo de forma inversa no espectro do β -amirina [24]. O espectro de IV dessa amostra destacou banda em 3276 cm^{-1} , característica de estiramento de hidroxila. Para confirmação dos compostos, estes foram também comparados em CCD com amostras puras.

A fração FDM-5 registrou três compostos, sendo dois fitoesteroides identificados como sendo o estigmasterol (8,14%) e o γ -sitosterol (83,09%) como principais constituintes.

Quantificação de Fenóis e Flavonoides Totais

O teor de fenóis totais dos extratos da casca foi superior aos valores obtidos para os extratos do lenho (Tabela 4). Este fato pode ser justificado em função da casca exercer maior interação com o meio externo, onde os compostos fenólicos atuam como protetores da radiação ultravioleta e também na defesa contra patógenos. Em relação aos flavonoides totais, estes apresentaram valores inferiores aos compostos

fenólicos totais, como plenamente previsto e justificável, pois a metodologia de quantificação de fenóis totais inclui também os flavonoides.

Tabela 4: Teores de fenóis e flavonoides totais dos extratos do lenho e da casca da espécie *P. leptostachyum* Cuatrec.

Amostras/Extratos		Fenóis Totais (mg EAG g ⁻¹)	Flavonoides Totais (mg EQ g ⁻¹)
Lenho	Metanol	201,571 ±0,51	25,50 ±0,48
	Etanol	176,428 ±3,03	28,75 ±3,25
	Acetona	80,571 ±0,84	15,81 ±0,46
Casca	Metanol	246,571 ±1,00	25,75 ±0,48
	Etanol	224,714 ±4,78	25,25 ±1,81
	Acetona	202,857 ±2,38	23,75 ±0,21

mgEAG g⁻¹ = miligrama equivalente de ácido gálico em grama de amostra desengordurada. mgEQ g⁻¹ = miligrama equivalente de quercetina em grama de amostra desengordurada.

Em relação ao poder de extração dos solventes analisados, o metanol, em todas as amostras, apresentou maior poder de extração para os compostos fenólicos, induzindo à presença de compostos fenólicos de alta polaridade na casca. O efeito da polaridade dos solventes extratores, para os metabólitos fenóis e flavonoides totais, pode ser observado na ordem crescente do percentual de fenóis totais extraídos, exceto para os flavonoides, onde ocorreu uma inversão, onde o solvente etanol se mostrou mais eficiente na extração desta classe de metabólitos.

Atividade Microbiológica

A atividade microbiológica foi realizada com as amostras oriundas do extrato hexânico das folhas: FEP, FDM e FET, dos extratos hexânico e etanólico da casca e do lenho da espécie *P. leptostachyum* (Tabela 5).

Tabela 5: Atividade microbiológica dos extratos hexânicos das folhas, hexânico e etanólico da casca do *P. leptostachyum*.

Amostras		EC (mm)	KP (mm)	SA (mm)	SP (mm)
Folha <i>P. leptostachyum</i>	FEP	-	-	-	8,67
	FDM	-	-	-	-
	FET	-	-	-	-
Casca <i>P. leptostachyum</i>	Hexânico	-	-	-	-
	Etanólico	-	-	-	11,67

EC = *Escherichia coli*; KP = *Klebsiella pneumonia*; SA = *Staphylococcus aureus*; SP = *Streptococcus pneumoniae*; FEP = Fração éter de petróleo do extrato hexânico; FDM = Fração diclorometano do extrato hexânico; FET = Fração etanólica do extrato hexânico.

Na análise microbiológica do *P. leptostachyum*, somente a FEP do extrato hexânico das folhas e do extrato etanólico da casca apresentaram atividade bactericida para *Streptococcus pneumoniae* (SP), gram-positiva. A atividade bactericida dessa amostra pode estar relacionada com a presença dos constituintes majoritários: óxido de cariofileno, dos esteroides, α -tocoferol, como também dos triterpenos lupano e friedooleanan-3-ona, embora estes se encontrem em menor concentração na amostra ativa. Em relação à eficácia contra *Streptococcus pneumoniae* (SP), para o extrato etanólico da casca, este revelou alta concentração de fenóis totais (224,714 mgEAG g⁻¹) e flavonoides (25,25 mgEQ g⁻¹), classe de bioativos que podem justificar a atividade bactericida do extrato etanólico da casca do *P. leptostachyum*.

Conclusão

A prospecção qualitativa dos extratos etanólicos da casca e do lenho do *P. leptostachyum* Cuatrec., revelou a presença de metabólitos como: taninos condensados, ácidos orgânicos, açúcares redutores, esteroides, triterpenoides, flavonoides e saponinas. A análise quantitativa de fenóis totais dos extratos metanólico, etanólico e acetônico, do lenho e da casca, apresentou teores de fenóis totais, sendo o metanol com o maior poder de extração, 201,571 e 246,571 mgEAG g⁻¹, respectivamente. A quantificação de flavonoides não apresentou variação na concentração deste bioativo.

A média geral do rendimento por área foliar da cera cuticular espécie em estudo foi de 97,59 $\mu\text{g cm}^{-2}$. A análise de CG/EM da cera cuticular do *P. leptostachyum* apresentou 54 compostos, 20 compostos voláteis (37,04%), 3 aldeídos de cadeia longa (5,55%): 6 hidrocarbonetos de cadeias longas (11,11%), 6 ésteres metílicos, etílicos e cicloexila (11,11%), 4 triterpenos pentacíclicos (7,41%), 2 esteroides (3,70%) além de outros constituintes (5,55%) e 10 não identificados (18,52%).

A fração etanólica do extrato hexânico (FET) das folhas e o extrato etanólico da casca do *P. leptostachyum* apresentaram eficácia bactericida gram-positiva para *Streptococcus pneumoniae* (SP), sendo o extrato com maior eficácia.

Este primeiro estudo fitoquímico na literatura sobre a espécie *Protium leptostachyum*, vem contribuir para o conhecimento químico da espécie, revelando a eficácia bactericida de extrato polar da casca e lenho.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Prof. PhD Douglas C. Daly, curador do Jardim Botânico de Nova Iorque, pela identificação da espécie; ao Departamento de Química da Universidade Federal do Ceará, pelos registros dos espectros e a CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

Referências

- [1] T. H. Yeats, J. K. C. Rose, The formation and function of plant cuticles, *Plant Physiology*, 163 (2013), 5-20.
- [2] G. D. Napal, M. C. Carpinella, S. M. Palacios, Insecticidal properties of a highly potent wax isolated from *Dolichandra cynanchoides* Cham, *Molecules*, 21 (2016), 1-11.
- [3] J. C. Tafolla-arellano, A. González-león, A. E. Tiznado-Hernández, L. Z. Garcia; R. Báez-Sañudo, Composición, fisiología y biosíntesis de la cutícula en plantas, *Revista Fitotecnia Mexicana*, 36, n.1 (2013), 3-12.
- [4] X. Zhao, L. Huang, L. Kanga, R. Jetterb, L. Yaoa, Y. Lia, Y. Xiaoa, D. Wanga, Q. Xiaoa, Y. Nia, Y. Guo, Comparative analyses of cuticular waxes on various organs of faba bean (*Vicia faba* L.), *Plant Physiology and Biochemistry*, 139 (2019), 102–112.
- [5] G. Cheng, H. Huang, L. Zhou, S. He, Y. Zhang, S. Cheng, Chemical composition and water permeability of the cuticular wax barrier in rose leaf and petal: a comparative investigation, *Plant Physiology and Biochemistry*, 135 (2019), 404–410.
- [6] R. Becker, S. Dashbaldan, C. Pączkowski, T. Golis, A. Szakiel, Comparison of steroids and triterpenoids in leaf cuticular waxes of selected Polish and Russian cultivars and genotypes of edible honeysuckle, *Phytochemistry Letters*, 30 (2019), 238–244.
- [7] G. A. Arroyo-Serralta, D. Zizumbo-Villareal, F. E. Erosa, L. M. Peña-Rodríguez, Cuticular wax composition of coconut palms and their susceptibility to lethal yellowing disease., *Journal of the Mexican Chemical Society*, 56, n.1 (2012), 67-71.
- [8] Y. Yin, B. Yang, C. Songjiang, L. Yongcai, W. Yi, G. Yonghong, D. Bo, L. Yingchao, Z. Zhong, Chemical composition and antifungal activity of cuticular wax isolated from Asian pear fruit (cv. Pingguoli), *Scientia Horticulturae*, 129 (2011), 577-582.
- [9] V. Vrkoslav, K. Urbanova, J. Cvacka, Analysis of wax ester molecular species by high performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1217 (2010), 4184–4194.
- [10] A. B. Cerón-Carpio, B. Pérez-García, J. L. M. Villanueva, A. L. Kiel-Martínez, S. Espinosa-Matias, J. A. Guerrero-Analco, K. Mehltreter, Chemical composition and micromorphological structure of cuticular leaf waxes of eight tropical fern species of Mexico, *Biochemical Systematics and Ecology*, 85 (2019), 13–20.
- [11] R. M. Alves, E. M. Inacio, P. A. Monquero, S. P. Meneghin, A. C. S. Hirata, Leaf-surface characterization and the effects of the herbicide saflufenacil on the leaves of weeds, *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, 9, n.4 (2014), 550-555.
- [12] A. C. Siani, I. S. Garrido, S. S. Monmteiro, E. S. Carvalho, M. F. S. Ramos, *Protium icicariba* as a source of volatile essences, *Biochemical Systematics and Ecology*, 32, n.5 (2004), 477-489.
- [13] M. G. B. Zoghobi, J. B. G. Siqueira, E. L. A. Wolter, O. L. P. Juniiior, Constituintes químicos de *Protium paniculatum* (Burseraceae), *Acta Amazonica*, 23, n.2-3 (1993), 187-189.
- [14] T. O. G. Costa, R. A. Almeida, H. H. F. Koolen, F. M. A. Silva, A. C. Pinto, Constituintes químicos do caule de *Protium hebetatum* (Burseraceae), *Acta Amazonica*, 42, n.4 (2012), 557-560.

- [15] S. Z. Cordeiro, N. K. Simas, R. C. O. Arruda, A. Sato, Composition of epicuticular wax layer of two species of *Mandevilla* (Apocynoideae, Apocynaceae) from Rio de Janeiro, Brasil, *Biochemical Systematics and Ecology*, 39 (2011), 198-202.
- [16] F. J. A. MATOS, “Introdução a fitoquímica experimental”, UFC, Fortaleza, 1997.
- [17] W. L. R. Barbosa, E. Quinard, I. C. C. Tavares, L. N. Pinto, F. Q. Oliveira, R. M. Oliveira, “Manual para análise fitoquímica e cromatográfica de extratos vegetais”, v.4, ed. Revisada, Revista Científica da Universidade Federal do Pará, Belém, 2004.
- [18] Q. D. Do, A. E. Angkawikaya, P. L. Tran-Nguyen, L. H. Huynh, F. E. Soetaredjo, S. Ismadji, Y. Ju, Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*, *Journal of Food and Drug Analysis*, 22, n.3 (2014), 296–302.
- [19] NCCLS, “Padronização dos Testes de sensibilidade a antimicrobianos por disco-difusão: norma aprovada”, v.23, n.1, 8.ed., NCCLS, Pensilvânia, 2003.
- [20] H. Wagner, S. Bladt, “Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas”, 2.ed., Springer, New York, 1996.
- [21] A. L. Rudiger, A. C. Siane, V. F. Veiga-Junior, The chemistry and pharmacology of the South America genus *Protium burm. F.* (Burseraceae), *Pharmacognosy Reviews*, 1, n.1 (2007), 93-104.
- [22] D. D. Marques, R. A. Sartori, T. L. G. Lemos, L. L. Machado, J. S. N. Souza, F. J. Q. Monte, Chemical composition of the essential oils from two subspecies of *Protium heptaphyllum*, *Acta Amazonica*, 40, n.1 (2010), 227-230.
- [23] P. A. Monquero, P. J. Christoffoleti, J. A. Matas, A. Heredia, Caracterização da superfície foliar e das ceras epicuticulares em *Commelina benghalensis*, *Ipomoea grandifolia* e *Amaranthus hybridus*, *Planta Daninha*, 22, n.2 (2004), 203-210.
- [24] W. Tamai, N. Watanabe, M. Someya, H. Kondoh, S. Omura, P. L. Zhang, R. Chang, W. M. Chen, New hepatoprotective triterpenes from *Canarium album*, *Planta Medica*, 55 (1989), 44-47.