

COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA CERA CUTICULAR DAS FOLHAS DO *PROTIUM* *HEBETATUM* DALY (BURSERACEAE)

D. D. MARQUES¹, C. E. G. DE CARVALHO², R. A. SARTORI³, T. L. G. DE LEMOS⁴, F. J. Q. MONTE⁵

Universidade Federal do Acre^{1,2,3}, Universidade Federal do Ceará^{4,5}

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-1534-0281>¹

delcio.marques@ufac.br¹

Submetido 01/04/2020 - Aceito 14/09/2021

DOI: 10.15628/holos.2021.9826

RESUMO

A investigação fitoquímica do extrato hexânico das folhas de *Protium hebebatum* Daly (PHB), coletadas na cidade de Cruzeiro do Sul, Acre, permitiu o isolamento de alguns constituintes químicos por métodos cromatográficos. O extrato foi adsorvido em sílica gel e filtrado sob pressão reduzida com 700 mL de éter de petróleo, seguido de clorofórmio. A partir da fração clorofórmio, os triterpenos α e β -amina foram isolados como uma mistura binária e suas estruturas estabelecidas pelos dados espectrais de ¹H e ¹³C RMN. Além disso, da fração

éter de petróleo, três hidrocarbonetos da classe alcano de cadeia longa foram isolados como uma mistura, sendo o hentriacontano (63,24%) o principal constituinte. Outros compostos também foram identificados como ésteres etílicos de ácidos graxos de cadeia longa identificados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM). Os ésteres hexadecanoato de etila (64,33%) e etil octadecanoato (17,87%) foram os principais constituintes.

PALAVRAS-CHAVE: Hentriacontano; β e α -amirina; Ésteres etílicos.

CHEMICAL COMPOSITION OF CUTICULAR WAX FROM LEAVES OF *PROTIUM* *HEBETATUM* DALY (BURSERACEAE)

ABSTRACT

Phytochemical investigation from the hexane extract of the leaves of *Protium hebebatum* Daly (PHB), collected in the city of Cruzeiro do Sul, Acre, allowed the isolation of some chemical constituents using chromatographic methods. Extract was adsorbed onto silica gel and filtered under reduced pressure with 700 mL of petroleum ether, followed by chloroform. From the chloroform fraction the triterpenes α and β -amyrin have been isolated as a binary mixture and their structures established by ¹H and

¹³C NMR spectral data. In addition, from the petroleum ether fraction, three hydrocarbons of the long chain alkane class were isolated as a mixture, with hentriacontane (63.24%) being the main constituent. Other compounds have also been identified as ethyl esters of long chain fatty acids identified by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC/MS). The esters ethyl hexadecanoate (64.33%) and ethyl octadecanoate (17.87%) were the main constituents.

KEYWORDS: Hentriacontane; β and α -Amyrin; Ethyl esters.



1. INTRODUÇÃO

A família Burseraceae, constituída de 700 espécies, está dividida em três tribos: *Protieae*, *Canarieae* e *Bursereae*. O gênero *Protium* Burm. f. (tribo Protieae) é um dos mais importantes membros da família, com 150 espécies, encontradas na África, Nordeste da Ásia, México, América Centra e do Sul, apresentando alta densidade no Hemisfério Sul (Weeks, Daly, & Simpson, 2005). Várias espécies do gênero *Protium* são amplamente distribuídas em todo o território nacional, especialmente na região Amazônica, onde em áreas de recuperação 80% de espécies pertencem à família Burseraceae (Citó et al., 2006). O estado do Acre, localizado no sudoeste da Amazônia brasileira, apresenta uma densa floresta com uma grande diversidade, principalmente, a região do Juruá-Envira (Alto Juruá), por apresentar uma das áreas mais ricas em diversidade de espécies, com vários táxons botânicos, principalmente as espécies de *Protium* (Lima, 2016).

As espécies do gênero *Protium*, na região do Alto Juruá, são conhecidas por vários nomes, tais como breu, breu-branco, almecequeira, breu-verdadeiro. A resina exsudada por essas espécies é rica em óleo essencial e triterpenos, principalmente da série oleanano e ursano (Marques et al., 2010). Essas espécies são utilizadas na medicina popular como um importante agente terapêutico, tendo propriedades anti-inflamatória, analgésica, expectorante e cicatrizante. Estudo farmacológico realizado com a espécie *P. heptaphyllum* revelou atividade anti-inflamatória, atividade gastroprotetora contra úlceras gástricas (Oliveira et al., 2004) e ação antidepressiva, mostrando significativo efeito sedativo (Aragão et al., 2006).

Apesar do grande número de trabalhos publicados na literatura científica com várias espécies do gênero, a grande maioria das pesquisas realizadas está relacionada com investigação fitoquímica e biológica da resina ou do óleo essencial exsudada por essas espécies, sendo raros os estudos fitoquímicos das folhas. Morfologicamente a superfície deste órgão das plantas é recoberta por uma camada de cera chamada de membrana cuticular ou cutícula, que consiste de uma cutina e cera (Bengston, Larsson, & Liljenberg, 1978). A cera cuticular representa uma complexa mistura de compostos de cadeia alifática como n-alcanos, ácidos graxos, álcoois, aldeídos e cetonas, ésteres de n-alquil (Cordeiro et al., 2011). Algumas espécies apresentam compostos com cadeias cíclicas tais como triterpenoides (Arroyo-Serralta et al., 2012). Compostos aromáticos e carotenoides podem estar presentes em pequena concentração, conforme estudos realizados por Yin et al. (2011).

A cera cutilar de origem de vegetais apresenta vasta aplicação econômica e em algumas regiões brasileiras tem um peso significativo na balança comercial (Costa, & Gomes, 2016). Além de sua importância econômica, este complexo de constituintes químicos desempenha funções essenciais de proteção contra estresse biótica e abiótica sofrida pelas espécies vegetais, está envolvido no controle de perdas de água por transpiração, bem como na regulação das trocas de gás e absorção de compostos lipofílicos (Dragota, & Riederar, 2007), na proteção contra a invasão de microrganismos, insetos e inibição na germinação de esporos de fungos (Yin et al., 2011).



A identificação da cera cuticular do gênero *Protium* foi registrada inicialmente na espécie *P. icicariba* (Siani et al., 2004), sendo realizada por cromatografia gasosa acoplado a espectrometria de massa (CG/EM). Contudo, conforme Martins et al. (2010), ainda são escassos os trabalhos na área de identificação da cera cuticular, que venha permitir elucidar questões medicinais, farmacológicas, quimiotaxonômicas, questões ambientais, bem como as adaptações ao ambiente hostil na defesa de parasitas ou herbívoros, em que se encontram as espécies vegetais.

Com o objetivo de contribuir para o conhecimento químico do gênero *Protium*, este trabalho reporta o estudo fitoquímico da cera cuticular da espécie *P. hebetatum* Daly, com o isolamento da mistura binária de triterpenos da série oleanano e ursano e a identificação de vários ésteres etílicos de cadeia longa.

2. MATERIAL E MÉTODOS

As folhas do *P. hebetatum* Daly (PHB) foram coletadas no Alto Juruá, município de Cruzeiro do Sul, estado do Acre, Brasil, na rodovia BR 307, (07° 29' 13,4" S, 72° 50' 09,8" W). A espécie foi identificada pelo PhD Douglas C. Daly, curador do Jardim Botânico de Nova Iorque, e uma exsicata (Nº. 18.374) foi depositada no herbário do Parque Zoobotânico da Universidade Federal do Acre (UFAC), Brasil.

As folhas (2,19Kg) foram secadas a temperatura ambiente e submetidas à extração a frio com hexano (Hex), obtendo o extrato hexânico (40g). O extrato foi adsorvido em sílica gel e filtrado sob pressão reduzida, utilizando 700 mL de éter de petróleo e, posteriormente, com 700 mL de clorofórmio. O extrato de éter de petróleo (8,8g), após cromatografia em coluna (CC) de gel de sílica, permitiu obter cinco frações: F1 (5,34g) eluída com Hex (100%), F2 (0,156g) Hex:CH₂Cl₂ (95:5), F3 (0,079g) Hex:CH₂Cl₂ (9:1), F4 (0,098g) CH₂Cl₂ e F5 (0,043g) com acetato de etila (AcOEt). A primeira fração (F1) apresentou um sólido branco, amorfo (5,34g), que foi analisado por: CG/EM e RMN¹H. A última fração (F5) forneceu um líquido amarelado, que foi analisado por CG/EM, IV e RMN¹H e as demais frações foram analisadas somente em CG/EM. A porção clorofórmica (17,0g) foi adsorvida em sílica gel (3,0g) e fracionada em CC permitindo o isolamento de uma mistura binária de triterpeno pentacíclico da série oleanano/ursano (0,92g Hex:AcOEt, 9:1), que foi identificada utilizando dados espectrais de RNM¹H e ¹³C.

Os cromatogramas (CG/EM) foram registrados em aparelho da Shimadzu, modelo HP-5971, acoplado a detector de massa com fonte de ionização de impacto eletrônico (70 eV), usando um cromatógrafo a gás modelo HP-5890, série II (CG/EM), com coluna capilar OV-5 (Dimetilsiloxisano: 30 m x 0,30 mm id. x 0,25 µm de espessura do filme) nas seguintes condições: gás hidrogênio como fase móvel com fluxo de 1 mL min⁻¹, no modo split, na razão de 1:48 e temperatura do injetor 250°C. A programação de temperatura foi de 4°C min⁻¹ de 40 a 180°C e 20°C min⁻¹ de 180 a 280°C, permanecendo a essa temperatura por 5 minutos.

O espectro na região do infravermelho foi registrado em aparelho da Perkin Elmer, modelo FT-IR Spectrum 1000 e os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono em espectrômetro da Bruker, modelo Avance DPX 300.



3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O isolamento de uma mistura binária de triterpenos pentacíclicos, da fração clorofórmica, que não puderam ser separados por CC, apresentou uma proporção relativa de 1:2, determinada pelo método de RMN ^1H . No espectro de RMN ^1H , vale ressaltar os sinais tripletes devidos aos hidrogênios olefínicos (=C12-H), que possibilitaram a quantificação da proporção, em δ_{H} 5,20 (t, $J = 5,8$ Hz) e 5,14 (t, $J = 5,9$ Hz), característicos de triterpenos da série oleanano (PH-1) e ursano (PH-2), respectivamente (Figura 1).

A análise do espectro de RMN ^{13}C (HBBDD), em combinação com o espectro de sequência de pulso DEPT (135°), além dos sinais na região de carbono sp^3 , característicos de triterpenos pentacíclicos, revelou também dois pares de sinais para carbono olefínicos, um par em $\delta_{\text{C}} = 121,94$ (CH) e 145,40 (C) e, outro par em $\delta_{\text{C}} = 124,63$ (CH) e 139,80 (C) (Tabela 1). Estes sinais característicos de duplas ligações típicas de triterpenos pentacíclicos corroboram com a mistura da série oleanano e ursano, respectivamente. Em comparação dos demais dados espectroscópicos da mistura binária isolada, com os descritos na literatura (Tamai et al., 1989), permitiu-se confirmar a identificação da mistura binária (PH-1/PH-2) como sendo os triterpenos 3 β -hidroxiolean-12-eno (β -amirina) e 3 β -hidroxiurs-12-eno (α -amirina), respectivamente. A ocorrência da mistura β e α -amirina é frequente nas resinas exsudadas pelas espécies do gênero *Protium*.

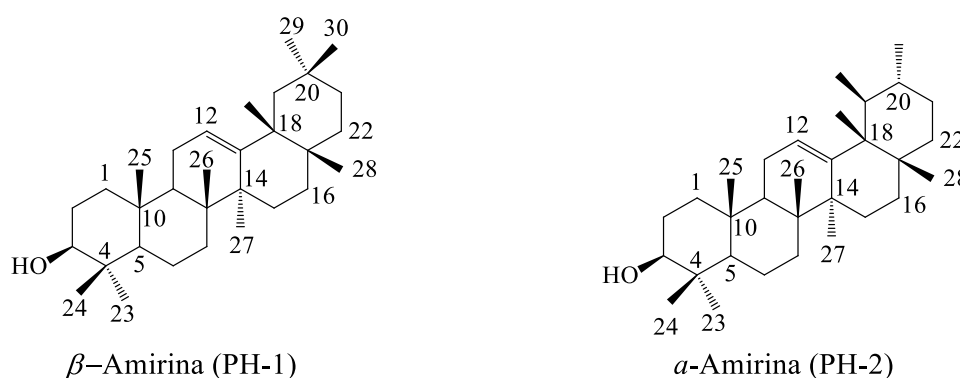


Figura 1: Estrutura dos triterpenos β -amirina e α -amirina.

Tabela 1: RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) da mistura de triterpeno PH-1/PH-2.

Sequência	β -Amirina		α -Amirina		Sequência	β -Amirina		α -Amirina	
	PH - 1	Lit.	PH -	Lit.*		PH - 1	Lit.*	PH - 2	Lit.*
1	38,80	38,58	39,00	38,76	16	26,82	26,93	28,31	28,09
2	27,14	27,23	27,43	27,26	17	32,70	32,48	33,96	33,74
3	79,22	79,01	79,25	79,03	18	47,92	47,22	59,21	59,04
4	38,98	38,77	38,99	38,76	19	47,04	46,82	39,81	39,60
5	55,39	55,17	55,39	55,17	20	31,29	31,07	39,87	39,60
6	18,57	18,37	18,57	18,35	21	34,94	34,72	31,46	31,25
7	32,86	32,64	33,15	32,92	22	37,35	37,13	41,74	41,53
8	40,00	39,78	40,22	39,99	23	28,34	28,10	28,34	28,12
9	47,84	47,62	47,43	47,70	24	15,71	15,57	15,88	15,62
10	37,11	36,94	37,11	36,88	25	15,83	15,49	15,83	15,68

11	23,57	23,52	23,57	23,36	26	17,07	16,80	17,62	16,88
12	121,94	121,72	124,63	124,40	27	26,36	25,98	23,48	23,27
13	145,40	145,19	139,80	139,57	28	28,61	28,39	28,61	28,75
14	42,29	41,71	42,29	42,06	29	33,55	33,33	15,71	17,47
15	28,31	26,14	26,36	26,61	30	23,48	23,68	21,61	21,40

* Tamai et al., (1989).

A análise dos espectros de massas originados pela análise do CG/EM da fração F-1, registrados a partir dos picos do cromatograma, permitiu identificar três hidrocarbonetos, representando 98,47% do total dos constituintes registrados (Tabela 2). Os hidrocarbonetos identificados foram: heptacosano (C27, 6,97%), hentriacontano (C31, 63,24%) e tritriacontano (C33, 28,36%). O espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN¹H) da mistura mostrou um tripleto em $\delta_H = 0,89$ ($J = 6,7$ Hz) e um singleto de alta intensidade em $\delta_H = 1,27$, típicos de absorção de hidrogênio de hidrocarbonetos lineares de cadeia longa, corroborando com a análise dos espectros e massas da amostra.

Os componentes registrados das frações F2 a F4, analisados através dos espectros de massas registrados a partir dos picos dos cromatogramas, revelaram a presença marcante dos hidrocarbonetos identificados na fração anterior (F1), sendo o hentriacontano o constituinte majoritário (60,75%) na fração F4. A fração F3 mostrou a presença de óleos essenciais e dois derivados benzênicos, além dos hidrocarbonetos C31 (49,34%) e C33 (26,59%) (Tabela 2).

Tabela 2 - Constituintes químicos da fração éter de petróleo do extrato hexânico das folhas do *P. hebetatum* Daly.

Constituintes	TR*	Porcentagem (%)				
		F1	F2	F3	F4	F5
Ciclo-hexilbenzeno	10,892			0,86		
α -Copaeno	12,433			3,79		
1-Ciclo-hexil-3-metilbenzeno	13,542			4,23		
β -Selineno	15,200			2,36		
α -Selineno	15,417			1,83		
Dodecanoato de etila	17,558					2,47
Tetradecanoato de etila	21,867					3,15
Pentadecanoato de etila	23,483					3,95
Hexadecanoato de etila	24,867				5,28	64,33
Heptadecanoato de etila	26,058					3,32
9-Hexadecenoato de etila	26,875					2,92
Octadecanoato de etila	27,142					17,87
Eicosonoato de etila	29,067					1,99
Heptacosano	33,283	6,97	8,03			
Hentriacontano	35,301	63,24	58,63	49,64	60,75	
Tritriacontano	37,947	28,26	30,04	26,59	27,52	
Total %		98,47	96,70	89,30	93,55	100,0

*TR = Tempo de Retenção.

A fração F5 apresentou uma diferença marcante em relação às frações anteriores. A partir dos espectros de massa, registrados por CG/EM, foi possível identificar a presença de oito ésteres



etílicos, representando 100% do total dos constituintes registrados (Tabela 2). O éster hexadecanoato de etila (64,33%) foi o constituinte majoritário, seguido do octadecanoato de etila (17,87%) e o eicosanoato de etila (1,99%), com a menor concentração. O espectro na região do infravermelho (IV) desta mistura revelou como destaque a absorção de deformação axial de carbonila de éster ($\nu_{C=O}$) 1733 cm^{-1} . Analisando também o espectro de RMN ^1H , este apresentou os sinais característicos de ésteres alifáticos, multipletto em $\delta_{\text{H}} = 4,14$ (m, $-\text{CH}_2\text{O}-$), triplete em 2,30 (t, $J = 7,6\text{ Hz}$, $-\text{CH}_2-$ alfa a $\text{C} = \text{O}$), multipletto em 1,65 (m, $-\text{CH}_2-$ beta a $\text{C} = \text{O}$), singletos em 1,29 (s, demais $(\text{CH}_2)_n$ da cadeia alifática) e outro triplete em 0,90 (t, CH_3). Estas absorções estão em acordo com a análise resultante a partir dos espectros de massa obtidos por CG/EM, confirmando a presença dos ésteres etílicos.

4. CONCLUSÃO

A análise de ceras cuticular em folhas do *Protium hebetatum* Daly permitiu o isolamento da mistura, em quantidade significativa, de β e α -amirina (0,92g). Além do isolamento desta mistura binária de triterpenos, que não puderam ser separados por CC, a análise dos espectros de massa registrados por CG/EM permitiu também identificar três hidrocarbonetos de cadeia linear: C27, C31 e C33 (5,34g) e de oito ésteres etílicos de cadeia longa (0,043g). O isolamento dos triterpenos e a identificação dos ésteres etílicos da cera cuticular das folhas de *P. hebetatum* Daly estão sendo registrado pela primeira vez na família Burseraceae.

5. 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 ao parque Zoobotânico da Universidade Federal do Acre, pelo apoio na coleta do material botânico.

6. REFERÊNCIAS

- Aragão, G. F., Carneiro, L. M. V., Junior, A. P. F., Vieira, L. C., Bandeira, P. N., Lemos, T. L. G., & Viana, G. S. de B. (2006). A possible mechanism for anxiolytic and antidepressant effects of alpha- and beta-amyrin from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 85, 827-834.
- Arroyo-Serralta, G. A., Zizumbo-Villareal, D., Erosa, F. E., & Rodríguez, L. M. P. (2012). Cuticular wax composition of coconut palms and their susceptibility to lethal yellowing disease. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 6(1), 67-71.
- Bengston, C., Larsson, S., & Liljenberg, C. (1978). Effect of water stress on cuticular transpiration rate and amount and composition of epicuticular wax in seedlings of six oat varieties. *Physiologia Plantarum*, 44(4), 319-324.



- Citó, A. G. M. L., Costa, F. B., Lopes, J. A. D., Oliveira, V. M. M., & Chaves, M. H. (2006). Identificação de constituintes voláteis de frutos e folhas de *Protium heptaphyllum* Aubl (March). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 8(4), 4-7.
- Cordeiro, S. Z., Simas, N. K., Arruda, R. C. O., & Sato, A. (2011). Composition of epicuticular wax layer of two species of *Mandevilla* (Apocynoideae, Apocynaceae) from Rio de Janeiro, Brazil. *Biochemical Systematics and Ecology*, 39, 198-202.
- Costa, V. L. S., & Gomes, J. M. A. (2016). Crédito e conservação ambiental no extrativismo da carnaúba (*Copernicia prunifera* (Mill.) H. E. Moore) no nordeste brasileiro no período de 2007 a 2012. *Interações*, 17(1), 4-14.
- Dragota, S., & Riederer, M. (2007). Epicuticular wax crystals of *Wollemia nobilis*: morphology and chemical composition. *Annals of Botany*, 100, 225-231.
- Martins, N. B. G., Caravante, A. L. C., Appezzato-da-Glória, B., Soares, M. K. M., Moreira, R. R. D., & Santos, L. E. (2010). Caracterização anatômica e fitoquímica de folhas e rizomas de *Hedychium coronarium* J. König (Zingiberaceae). *Revista Brasileira Plantas Mediciniais*, 12(2), 179-187.
- Lima, K. S. (2016). Contribuição ao conhecimento químico de espécies do gênero *Protium* (*Protium hebetatum* Daly e *Protium leptostachyum* Cuatrec.) Burseraceae. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Acre, Rio Branco, AC, Brasil.
- Marques, D. D., Sartori, R. A., Lemos, T. L. G., Machado, L. L., Souza, J. S. N., & Monte, F. J. Q. (2010). Chemical composition of the essential oils from two subspecies of *Protium heptaphyllum*. *Acta Amazonica*, 40(1), 227-230.
- Oliveira, F. A., Helena, C. M., Vieira-Junior, G. M., & Almeida, F. R. C. (2004). Gastroprotective and anti-inflammatory affects of resin from *Protium heptaphyllum* in mice and rats. *Pharmacologica Research*, 49(2), 105-111.
- Siani, A. C., Garrido, I. S., Monteiro, S. S., Carvalho, E. S., & Ramos, M. F. S. (2004). *Protium icicariba* as a source of volatile essences. *Biochemical Systematics and Ecology*, 32(5), 477-489.
- Tamai, W., Watanabe, N., Someya, M., Kondoh H., Omura, S., Ling, Z. P., Chang, R., & Ming, C. W. (1989). New hepatoprotective triterpenes from *Canarium album*. *Planta Medica*, 55, 44-47.
- Weeks, A., Daly, D. C., & Simpson, B. B. (2005). The phylogenetic history and biography of the frankincense and myrrh family (Burseraceae) based on nucleae and chloroplast sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 35, 85-101.
- Yin, Y., Bi, Y., Chen, S., Li, Y., Wang, Y., Ge, Y., Ding, B., Li, Y., & Zhong, Z. (2011). Chemical composition and antifungal activity of cuticular wax isolated from Asian pear fruit (cv. Pingguoli). *Scientia Horticulturae*, 129, 577-582.

COMO CITAR ESTE ARTIGO:

Marques, D. D., Carvalho, C. E. G de, Sartori, R. A., Lemos, T. L. G. de, Monte, F. J. Q. Composição química da cera cuticular das folhas do protium hebetatum daly (BURSERACEAE) (2021). *Holos*. 37(5), 1-8.

SOBRE OS AUTORES

D. D. MARQUES

Docente do Centro de Ciências Biológicas e da Natureza, Área de Química (CCBN/UFAC). E-mail: delcio.marques@ufac.br
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-1534-0281>

C. E. G. DE CARVALHO

Docente do Centro de Ciências Biológicas e da Natureza, Área de Química (CCBN/UFAC). E-mail: carlos.garcao@ufac.br
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-6089-4390>

R. A. SARTORI

Docente do Centro de Ciências Biológicas e da Natureza, Área de Química (CCBN/UFAC). E-mail: rogerio.sartori@ufac.br
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7262-3835>

T. L. G. DE LEMOS

Docente do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica (DQOI/UFC) e do Programa de Pós-graduação em Química da UFC. E-mail: tlemos@dqi.ufc.br
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7031-860X>

F. J. Q. MONTE

Docente do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica (DQOI/UFC) e do Programa de Pós-graduação em Química da UFC. E-mail: fmonte@dqi.ufc.br
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-1472-8396>

Editor(a) Responsável: Francinaide de Lima Silva Nascimento
Pareceristas *Ad Hoc*: LEANDRO CORREIAE SOFIA SUELY BRANDÃO

