

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FUNDAMENTAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

TESE DE DOUTORADO

**ESTUDO QUÍMICO, ANTIMICROBIANO, LARVICIDA E
ANTITERMÍTICO DO CERNE DA MADEIRA DE LEI
Hymenaea stigonocarpa Mart. ex Hayne**

CLÁUDIA DE ALBUQUERQUE MARANHÃO

Recife, 2009

CLÁUDIA DE ALBUQUERQUE MARANHÃO

**ESTUDO QUÍMICO, ANTIMICROBIANO, LARVICIDA E ANTITERMÍTICO DO
CERNE DA MADEIRA DE LEI *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne**

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Química da Universidade
Federal de Pernambuco como requisito final à
obtenção do título de Doutor em Química.
Área de concentração: Química de Produtos
Naturais.

ORIENTADOR: PROF. DR. LOTHAR BIEBER

CO-ORIENTADORA: PROF^a DR^a MÁRCIA SILVA DO NASCIMENTO

Recife, 2009

Tese submetida ao Corpo Docente do Programa de Pós-Graduação em Química do Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de Doutor em Química.

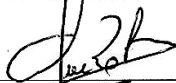
Aprovada:



Prof. Lothar Wilhelm Bieber

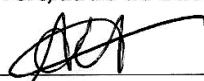
(Orientador)

Departamento de Química Fundamental
Universidade Federal de Pernambuco



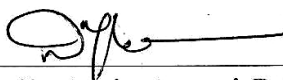
Prof. George Jackson de Moraes Rocha

Escola de Engenharia de Lorena
Universidade de São Paulo



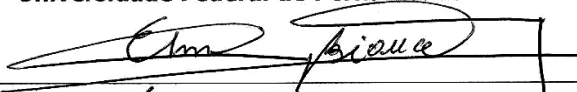
Profa. Auristela Correia de Albuquerque

Departamento de Biologia, Entomologia
Universidade Federal Rural de Pernambuco



Profa. Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro

Departamento de Química Fundamental
Universidade Federal de Pernambuco



Prof. Éverson Miguel Bianco

Departamento de Química Fundamental
Universidade Federal de Pernambuco

"Estudo Químico Antimicrobiano, Larvicida e Antitermítico do Cerne da Madeira de *Lei Hymenaea Stigonocarpa* Mart. Ex. Hayne."

por

CLÁUDIA DE ALBUQUERQUE MARANHÃO

Departamento de Química Fundamental
Centro de Ciências Exatas e da Natureza
Universidade Federal de Pernambuco
Recife-PE-Brasil

31 de Agosto de 2009

Maranhão, Cláudia de Albuquerque
Estudo químico, antimicrobiano, larvicida e
antitermítico do cerne da madeira de lei *Hymenaea*
stigonocarpa Mart. ex Hayne / Cláudia de
Albuquerque Maranhão. - Recife : O Autor, 2009.
xx, 111 folhas: il. fig. tab.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de
Pernambuco. CCEN. Química, 2009.

Inclui bibliografia e anexo.

1. Produtos naturais. 2. Jatobá. 3. *Aedes aegypti*.
4. Cupins. I. Título.

Dedico este trabalho à minha tia Maria
José, dedicada e sempre presente em
mais uma etapa de minha vida e a
grande amiga (irmã) Silvânia Oliveira
(*em memória*)

AGRADECIMENTOS

Ao professor Lothar Bieber por ter me aceitado como sua orientanda, por ter me ensinado e ajudado para meu crescimento profissional.

À professora Márcia Nascimento pela orientação, compreensão, paciência, amizade, apoio e dedicação profissional.

Ao professor Gonçalo Conceição pela identificação botânica da madeira.

À professora Daniela Navarro por disponibilizar seu laboratório para realização dos testes antitermítico e larvícida.

Ao Dr. Luiz Roberto Fontes por identificar os térmitas.

À professora Auristela Albuquerque por orientar nos bioensaios com os térmitas.

Aos pesquisadores do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães (FIOCRUZ) Luiz Alves e Fábio Brayner por disponibilizarem material para o teste antitermítico.

As professoras Norma Gusmão e Janete Magali por disponibilizarem seus laboratórios para realização do teste antimicrobiano.

Aos professores do Departamento de Química Fundamental que ajudaram no crescimento intelectual.

Aos técnicos da Central Analítica do Departamento de Química Fundamental: Ricardo Oliveira, Eliete, Conceição, Lúcio, Priscila. Aos secretários da Pós-Graduação, Maurílio e Patrícia.

Ao Franklin Magliano por ensinar-me o manipulação com os térmitas.

Às amigas Janaína Versiani, Andréa Santana e Luciana Oliveira pela amizade, companheirismo e disponibilidade para ajudar nas dificuldades, principalmente no laboratório.

Aos amigos do doutorado e colegas da UFRPE, Ana Paula Texeira, Jefferson Cunha, Joacy Ferreira, José Carlos Freitas e Silvânia Oliveira (*em memória*), sempre alegres, otimistas e guerreiros.

Aos amigos que compartilharam dos momentos de tristeza, alegria e conquistas.

À minha família pelos ensinamentos que ajudaram em minha caminhada. E à CAPES pela bolsa concedida.

“A mente que se abre
a uma nova idéia jamais
voltará ao seu tamanho
original”.

(ALBERT EINSTEIN)

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS	X
LISTA DE FIGURAS	XII
LISTA DE TABELAS	XVI
RESUMO	XVIII
ABSTRACT	XX
1 – INTRODUÇÃO	1
1.1 – Definição de Madeira	5
1.2 – Anatomia da Madeira	6
1.3 – Composição química da Madeira	7
1.4 – Biodeterioração da Madeira	7
1.5 – Defesa das plantas	8
1.5.1 – Fitoalexinas	9
2 – REVISÃO DE LITERATURA	10
2.1 – A família Leguminosae	10
2.2 – <i>Hymenaea stigonocarpa</i>	10
2.3 – Espécies de <i>Hymenaea</i> estudadas	11
2.4 – Flavonóides	16
2.4.1 – Flavonóides como fitoalexinas	20
2.4.2 – Biossíntese dos flavonóides	22
2.5 – Ácidos graxos	24
2.5.1 – Biossíntese dos ácidos graxos	24
3 – OBJETIVOS	26
4 – MATERIAL	27
4.1 – Material botânico	27
4.2 – Microrganismos	27
4.2.1 – Meios de cultura	28
4.3 – Larvas do mosquito <i>Aedes aegypti</i>	28
4.4 – Térmitas da espécie <i>Nasutitermes corniger</i>	28
4.5 – Material cromatográfico	29
5 – MÉTODOS	29
5.1 – Abordagem fitoquímica	29

5.1.1 – Alcalóides	30
5.1.2 – Esteróides e terpenos	30
5.1.3 – Flavonóides	31
5.1.4 – Saponinas	31
5.1.5 – Taninos	31
5.2 – Extração	32
5.3 – Teste de atividade antimicrobiana	33
5.3.1 – Preparação dos inóculos	33
5.3.1.1 – Inóculos nas placas de Petri	33
5.3.1.2 – Leitura e interpretação	33
5.4 – Fungo de podridão-branca	33
5.4.1 – Preparação das amostras para inóculo	34
5.5 – Teste de atividade larvícida	34
5.6 – Teste de atividade antitermítica	35
5.7 – Teor de umidade de <i>Hymenaea stigonocarpa</i>	36
5.8 – Determinação de lignina insolúvel	36
5.9 – Análise quantitativa de lignina solúvel	37
5.10 – Determinação de fenóis totais	38
5.11 – Fracionamento do extrato C ₆ H ₁₂ de <i>Hymenaea stigonocarpa</i>	38
5.12 – Fracionamento do extrato AcOEt de <i>Hymenaea stigonocarpa</i>	39
5.13 – Métodos espectroscópicos	41
6 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
6.1 – Abordagem fitoquímica	42
6.2 – Rendimento dos extrativos	42
6.3 - Fracionamento e identificação dos constituintes químicos do extrato cicloexano.	43
6.3.1 – Identificação da substância HS-C1	44
6.3.2 – Identificação da substância HS-C2	46
6.3.3 – Identificação da substância HS-C3	48
6.3.4 – Identificação da substância HS-C4	50
6.4 - Fracionamento e identificação dos constituintes químicos do extrato acetato de etila	53
6.5 - Análise espectrométrica das substâncias isoladas	54

6.5.1 – Identificação da substância S1	54
6.5.2 – Identificação da substância S2	67
6.5-3 – Identificação da substância S3	73
6.5-4 – Identificação da substância S4	78
6.6 – Teste de atividade antimicrobiana	90
6.7 – Teste de atividade larvicida	91
6.8 – Teste de atividade antitermítica	92
6.9 – Teste de biodegradação da madeira pelo fungo de podridão-branca	94
6.10 – Determinação de fenóis totais	95
6.11 – Determinação de Lignina Insolúvel e Solúvel	96
6.12 – Teor de umidade de <i>Hymenaea stigonocarpa</i>	97
7 – CONCLUSÕES	98
8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99
ANEXOS	111

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

δ - deslocamento químico

Acetil-CoA - acetilcoenzima A

ADP – adenosina difosfato

ATP – adenosina trifosfato

CG–MS – cromatografia à gás acoplada a espectrometria de massas

CMI – concentração mínima inibitória

COSY – correlação espectroscópica homonuclear ^1H - ^1H

d - duplete

DAUFPE – departamento de Antibiótico da Universidade Federal de Pernambuco

DEPT – intensificação do sinal sem distorção por transferência de polarização

dd – duplo duplete

DL₅₀ – dose letal que promove a morte de 50% de um grupo de indivíduos da mesma espécie

DMSO – dimetilsulfóxido

DQF – departamento de Química Fundamental

HABIT – herbário Professor Aluizio Bittencourt

HETCOR – correlação espectroscópica heteronuclear ^{13}C - ^1H

HMBC – correlação espectroscópica heteronuclear a longa distância

HPLC – cromatografia líquida de alta eficiência

J – constante de acoplamento

m – mutiplete

Malonil-CoA – malonilcoenzima A

NADP – nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato

NADPH – forma reduzida da nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato

PPi - pirofosfato

ppm – parte por milhão

RMN – ressonância magnética nuclear

s - simpleto

UEMA – Universidade Estadual do Maranhão

UFC – unidade formadora de colônia

UV - ultravioleta

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 – Substâncias de origem natural usadas na terapêutica.	1
Figura 2 – Estrutura da Azadirachtina.	2
Figura 3 – Estrutura da rotenona.	2
Figura 4 – Estrutura do α -toxicarol.	3
Figura 5 – Estrutura da taxifolina e quercetina.	4
Figura 6 – Árvore <i>Hymenaea stigonocarpa</i> .	5
Figura 7 – Seção transversal do tronco de uma árvore.	6
Figura 8 – Estruturas de fitoalexinas.	9
Figura 9 – Estruturas das cumarinas isoladas das sementes de <i>H. courbaril</i> .	12
Figura 10 – Estruturas dos flavonóides isolados do cerne de <i>H. courbaril</i> .	12
Figura 11 – Estruturas dos diterpenos isolados das folhas e galhos de <i>H. courbaril</i> .	13
Figura 12 – Estruturas dos diterpenos isolados das sementes de <i>H. coubaril</i> .	13
Figura 13 – Estruturas dos sesquiterpenos isolados das folhas de <i>H. courbaril</i> .	14
Figura 14 – Estruturas dos diidroflavonóis ramnosídeos isolados das cascas do caule de <i>H. parvifolia</i> .	14
Figura 15 – Estruturas de alguns flavonóides isolados das folhas de <i>H. palustris</i> .	15
Figura 16 – Esqueletos estruturais do tipo labdano e abietano e pimarano.	16
Figura 17 – Estruturas dos sesquiterpenos isolados das folhas de <i>H. stigonocarpa</i> .	16
Figura 18 – Núcleo fundamental dos flavonóides e sua numeração.	17
Figura 19 – Isoflavonoides como fitoalexinas da família leguminosae.	21
Figura 20 – Flavana como fitoalexina da família leguminosae.	21
Figura 21 – Flavana como fitoalexina da família Amaryllidaceae.	21
Figura 22 – Biossíntese de flavonóides.	23

Figura 23 - Estruturas dos ácidos graxos, mirístico e palmitoléico.	24
Figura 23 – Reação global da síntese dos ácidos graxos.	25
Figura 24 – Obtenção dos extratos brutos do cerne de <i>Hymenaea stigonocarpa</i> .	32
Figura 25 – Larvas do mosquito <i>Aedes aegypti</i> .	34
Figura 26 – Térmitas da espécie <i>Nasutitermes corniger</i> (Motschulsky).	35
Figura 27 – Fracionamento do extrato AcOEt do cerne de <i>H. stigonocarpa</i> .	40
Figura 28 – Comparação entre os espectros de massas do composto HS-C1 (A) e o composto da biblioteca (B).	45
Figura 30 – Rearranjo de McLafferty.	45
Figura 31 – Alguns fragmentos do composto HS-C1.	46
Figura 32 – Estrutura do ácido palmítico.	46
Figura 33 – Comparação entre os espectros de massas do composto HS-C2 (A) e o composto da biblioteca (B).	47
Figura 34 – Alguns fragmentos do composto HS-C2.	48
Figura 35 – Estrutura do ácido oléico.	48
Figura 36 – Espectro de massas do composto HS-C3 (A) e o espectro de massas da biblioteca (B).	49
Figura 37 – Estrutura do ácido mirístico.	50
Figura 38 – Espectro de massas do composto HS-C4 (A) com o espectro da biblioteca (B).	51
Figura 39 – Alguns fragmentos do composto HS-C4.	52
Figura 40 – Estrutura do ácido linoléico.	52
Figura 41 – Espectro de RMN de ^1H da substância S1 em DMSO- d_6 .	54
Figura 42 – Expansão do espectro de RMN de ^1H da substância S1 em	56

DMSO-d₆.

Figura 43 – Expansão do espectro de RMN de ¹ H da substância S1 em DMSO-d ₆ .	56
Figura 44 – Espectro de RMN de ¹³ C da substância S1 em DMSO-d ₆ .	58
Figura 45 – Espectro de ¹³ C- DEPT (135) da substância S1 em DMSO-d ₆ .	59
Figura 46 – Estrutura da taxifolina (flavanona).	60
Figura 47 – Estrutura da (2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)-3,5,6-trimetoxi-[2'',3'',7,8,]-furanoflavanonol.	61
Figura 48 – Espectro de ¹ H- ¹ H (COSY) da substância S1 em DMSO-d ₆ .	62
Figura 49 – Espectro de ¹ H x ¹³ C (HETCOR) da substância S1 em DMSO-d ₆ .	63
Figura 50 – Espectro de (¹ H x ¹³ C-HMBC) da substância S1 em DMSO-d ₆ .	64
Figura 51 - Estrutura da substância S1 (3-metóxi-3',4',5,7-tetraidróxiflavanona) - hultenina.	66
Figura 52 – Espectro de RMN de ¹ H da substância S2 em acetona-d ₆ .	68
Figura 53 – Expansão do espectro de RMN de ¹ H da substância S2 em acetona-d ₆ .	69
Figura 54 – Expansão do espectro de de RMN de ¹ H da substância S2 em acetona-d ₆ .	69
Figura 55 – Espectro de espectro de RMN de ¹³ C da substância S2 em acetona-d ₆ .	70
Figura 56 – Estrutura da substância S2 – taxifolina.	72
Figura 57 – Espectro de RMN de ¹ H da substância S3 em acetona-d ₆ .	74
Figura 58 – Expansão do espectro de RMN de ¹ H da substância S3 em acetona-d ₆ .	74

Figura 59 – Espectro de RMN de ^{13}C da substância S3 em acetona- d_6 .	75
Figura 60 – Estrutura da substância S3 – quercetina.	77
Figura 61 – Espectro de RMN de ^1H da substância S4 em DMSO- d_6 .	79
Figura 62 – Expansão do espectro RMN de ^1H da substância S4 em DMSO- d_6 .	80
Figura 63 – Estrutura da 7-metóxi-(+)-catequina.	81
Figura 64 – Espectro de ^{13}C - (APT) da substância S4 em DMSO- d_6 .	82
Figura 65 – Espectro de RMN de ^{13}C da substância S4 em DMSO- d_6 .	83
Figura 66 – Espectro de ^1H - ^1H (COSY) da substância S4 em DMSO- d_6 .	85
Figura 67 – Espectro de ^{13}C - ^1H (HETCOR) da substância S4 em DMSO- d_6 .	86
Figura 68 – Espectro ^1H x ^{13}C (HMBC) da substância S4 em DMSO- d_6 .	87
Figura 69 – Estrutura da 7-metóxi-(+)-catequina.	89
Figura 70 – Efeito antifúngico do extrato C_6H_{12} frente ao <i>F. moniliforme</i> .	91
Figura 71 – Curva dose x resposta do extrato cicloexano frente ao <i>A. aegypti</i> .	92
Figura 72 – Curva dose x resposta da substância S1 frente ao <i>A. aegypti</i> .	92
Figura 73 – Efeito dos extratos da Madeira de <i>H. stigonocarpa</i> frente ao <i>N. corniger</i> .	93
Figura 74 - Gráfico da curva padrão do ácido gálico.	95

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 – Principais classes de flavonóides e algumas de suas propriedades.	18
Tabela 2 – Microorganismos que foram utilizados nos testes de atividade antimicrobiana.	27
Tabela 3 – Testes que identificam as classes de compostos presentes na <i>H. stigonocarpa</i> .	30
Tabela 4 – Resultados da abordagem fitoquímica do cerne de <i>H. stigonocarpa</i> .	42
Tabela 5 – Resultado dos rendimentos dos extratos brutos de <i>Hymenaea stigonocarpa</i> .	43
Tabela 6 – Principais fragmentos no espectro de massas da substância HS-C1.	44
Tabela 7 – Principais fragmentos no espectro de massas do composto HS-C2.	47
Tabela 8 – Principais fragmentos no espectro de massas do composto HS-C3.	50
Tabela 9 – Principais fragmentos do espectro de massas do composto HS-C4.	51
Tabela 10 – Deslocamento químico (δ) em ppm e constante de acoplamento (J) em Hz do composto S1 em DMSO- d_6 .	55
Tabela 11 – Comparação dos espectros de RMN de 1H da substância S1 com a taxifolina.	57
Tabela 12 – Deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C da taxifolina com a substância S1.	60
Tabela 13 – Dados de RMN de 1H x ^{13}C (HETCOR) da substância S1.	63
Tabela 14 – Dados de RMN de 1H e ^{13}C e suas correlações (1H x ^{13}C – HMBC)	65
Tabela 15 – Deslocamento químico (δ) em ppm e constante de acoplamento (J) em Hz da substância S2 em acetona- d_6 .	67
Tabela 16 – Comparação do espectro de RMN de ^{13}C da taxifolina com a substância S2 ambos em acetona- d_6 .	71

Tabela 17 – Comparação dos espectros de RMN de ^1H da substância S2 com o da taxifolina, ambos em acetona- d_6 .	72
Tabela 18 – Deslocamento químico (δ) em ppm e constante de acoplamento (J) em Hz dos sinais de próton da substância S3 em acetona- d_6 .	73
Tabela 19 – Comparação do espectro de RMN de ^{13}C da quercetina em CD_3OD com a substância S3 em acetona- d_6 .	76
Tabela 20 – Comparação dos espectros de ^1H -RMN da substância S3 em acetona- d_6 com o da quercetina em CD_3OD .	77
Tabela 21 – Deslocamento químico (δ) em ppm e constante de acoplamento (J) em Hz dos sinais de prótons da substância S4 em $\text{DMSO}-\text{d}_6$.	78
Tabela 22 – Comparação dos espectros de RMN de ^1H da literatura com os encontrados na substância S4.	81
Tabela 23 – Comparação dos espectros de ^{13}C -RMN da literatura do flavanol em CD_3OD com a substância S4 em $\text{DMSO}-\text{d}_6$.	84
Tabela 24 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C obtido da substância S4 em $\text{DMSO}-\text{d}_6$.	88
Tabela 25 – Atividade antimicrobiana dos extratos brutos de <i>H. stigonocarpa</i> com halos de inibição em milímetros (mm) nas concentrações de 100 e 300 $\mu\text{g/mL}$.	90
Tabela 26 – Quantificação de fenóis totais em equivalente de ácido gálico.	96
Tabela 27 – Percentual de lignina total.	96
Tabela 28 - Percentual de umidade das madeiras.	97

RESUMO

Hymenaea stigonocarpa é conhecida popularmente como jatobá-do-cerrado, jataíba ou jitaí. É tradicionalmente utilizada no tratamento de bronquites e como antiinflamatório, contudo, é mais conhecida por sua madeira ser resistente ao apodrecimento e ao ataque de térmitas, sobressaindo-se entre as chamadas “madeiras de lei”. Este estudo visa contribuir para o conhecimento fitoquímico e biológico do cerne obtido do tronco de *H. stigonocarpa*. Para a realização deste estudo, o espécime foi coletado em Caxias/MA. Com o cerne deste espécime foram preparados três extratos utilizando-se três solventes de diferentes polaridades: cicloexano, acetato de etila e metanol. Estes extratos foram utilizados para a realização dos estudos fitoquímico e biológico desta madeira de lei. Do extrato em cicloexano foram separados e identificados diversos ácidos: palmítico, mirístico, oléico e linoléico, através do uso de cromatografia clássica e gasosa acoplada ao espectrômetro de massas. O extrato obtido com o solvente acetato de etila foi fracionado através de cromatografia em coluna, utilizando como fases estacionárias sílica e sephadex, obtendo-se quatro flavonóides: 7-metóxi-catequina, quercetina, taxifolina e 3-metóxi-3',4',5,7-tetraidróxiflavanona. A identificação estrutural destes flavonóides foi realizada através de RMN de ^1H e de ^{13}C (uni e bidimensionais) e pela comparação dos dados aqui obtidos com dados espectrais disponibilizados na literatura. Foram realizados ensaios para a avaliação do potencial biológico dos três extratos da madeira de lei estudada. Primeiramente, os extratos da madeira de *H. stigonocarpa* foram avaliados quanto à sua atividade antitermítica e, neste ensaio, todos os extratos apresentaram atividade contra *Nasutitermes corniger*. Em seguida, foram avaliadas as atividades antimicrobiana e larvicida para larvas de *Aedes aegypti* dos três extratos e de dois flavonóides isolados (3-metóxi-3',4',5,7-tetraidróxiflavanona e 7-metóxi-catequina). Os extratos obtidos com os solventes acetato de etila e metanol apresentaram atividade significativa frente aos microorganismos *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Mycobacterium smegmatis*. Dois flavonóides isolados apresentaram atividade frente a *S. aureus*. Nos ensaios biológicos para a verificação da atividade larvicida,

apenas o extrato em cicloexano e a 3-metóxi-3',4',5,7-tetraidróxiflavanona tiveram potencial larvicida estatisticamente significativo. Em seguida, os extratos da madeira de *H. stigonocarpa* foram avaliados frente ao crescimento do fitopatógeno *Fusarium moniliforme*, apenas o extrato em cicloexano apresentou atividade. Finalmente, foram realizados estudos frente ao crescimento do fungo apodrecedor de madeira *Phanerochaete chrysosporium*. O pó da madeira de lei estudada mostrou-se resistente à proliferação deste microorganismo.

Palavras-chave: madeira de lei; *Hymenaea stigonocarpa*; *Aedes aegypti*; *Nasutitermes corniger*; flavonóides.

ABSTRACT

Hymenaea stigonocarpa is popularly known as jatobá-do-cerrado, jataíba or jitaí. This plant is used in the bronchitis treatment and as an anti-inflammatory agent. However, *H. stigonocarpa* is famous not because of its biological properties, but because of the wood resistance to rottenness and termite attack. This work aims to contribute to the scientific knowledge concerning this species. The specimen used in this study was collected in Caxias/MA. Using the *H. stigonocarpa* heartwood, three different extracts were prepared, using the following solvents: cyclohexane, ethyl acetate and methanol. These extracts were used in the phytochemical and biological studies carried by us. Some fatty acids (palmitic, myristic, oleic and linoleic) were separated and identified in the cyclohexane extract, using chromatographic methods. Four flavonoids (7-methoxy-catechin, quercetin, taxifolin and 3-methoxy-3',4',5,7-tetrahydroxyflavanone) were isolated from the ethyl acetate extract, using column chromatography. The identification of these latter substances was possible due to uni and bidimensional ^1H and ^{13}C NMR techniques. Next, we evaluated the biological activity of the three extracts and of two isolated flavonoids. Firstly, the antitermitic activity was tested against *Nasutitermes corniger*. In this essay, the three extracts had significant activity against this termite. The antimicrobial and larvicide (against *Aedes aegypti* larvae) activities of the extracts and of two isolated flavonoids (3-methoxy-3',4',5,7-tetrahydroxyflavanone and 7-methoxy-catechin) were also evaluated. The ethyl acetate and methanol extracts presented pronounced activity against *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* and *Mycobacterium smegmatis*. On the other hand, the two isolated flavonoids presented antimicrobial activity only against *S. aureus*. In the larvicidal tests, the cyclohexane extract and 3-methoxy-3',4',5,7-tetrahydroxyflavanone presented significant activity. The extracts were tested against the phytopathogen microorganism *Fusarium moniliforme* growth inhibition. Only the cyclohexane extract presented significant activity. Finally, we tested the wood powder against *Phanerochaete chrysosporium*, a wood rot fungus. In this essay, the *H. stigonocarpa* wood powder was able to inhibit the microorganism proliferation.

Keywords: hardwood; *Hymenaea stigonocarpa*; *Aedes aegypti*; *Nasutitermes corniger*; flavonoids.

1 – INTRODUÇÃO

Historicamente, o desenvolvimento da química orgânica ocorreu paralelamente ao estudo de plantas, principalmente a partir do século XIX, quando foram registrados os primeiros estudos sobre plantas, com base científica. Isso resultou no isolamento de alguns princípios ativos de plantas, já então conhecidos como medicinais. Desses estudos foram obtidas algumas substâncias que se consagraram como princípios ativos eficazes, e que, até hoje, ainda são empregadas no tratamento de certas doenças, a exemplo de morfina (**1**), um alcalóide utilizado como hipnoanalgésico; quinina (**2**), um alcalóide antimalárico; e cânfora (**3**), uma cetona usada como antipruriginoso (Figura 1) (MONTANARI & BOLZANI, 2001).

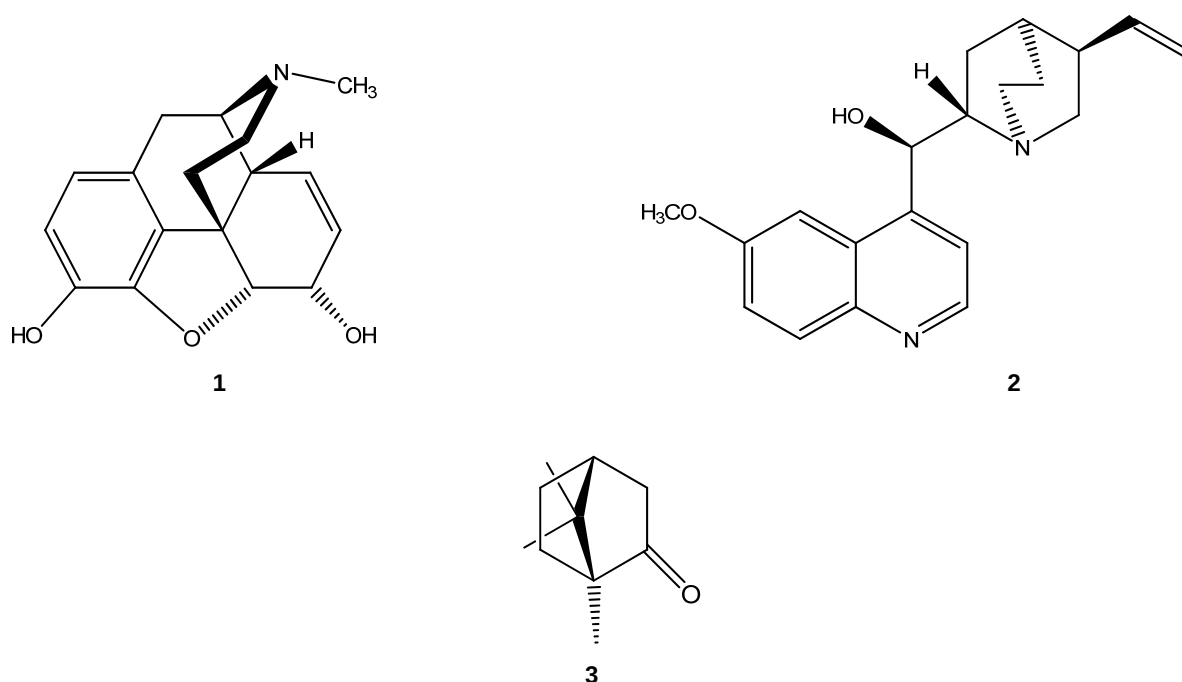


Figura 1 - Substâncias de origem natural usadas na terapêutica.

O interesse pelos produtos naturais cresce não apenas na indústria farmacêutica. A grande preocupação com o meio ambiente tem levado inúmeros pesquisadores a buscarem alternativas viáveis, efetivas e seguras nas plantas.

O uso de plantas como uma alternativa para o controle de insetos, vetores de doenças, fitopatógenos e larvas, são motivados pela quase ausência de toxicidade destes produtos naturais a animais e plantas, e pelo fato deles serem biodegradáveis, o que evita a contaminação do meio ambiente. Em contraste, os

inseticidas sintéticos, aos quais os insetos se tornam cada vez mais resistentes (SANTIAGO *et al.*, 2005), são tóxicos e poluentes.

A espécie *Azadirachta indica* (Meliaceae), conhecida popularmente como neem, possui substâncias com ação citotóxica, antiviral, antihelmítica, fungicida e inseticida eficaz no combate de pragas, fitopatógenos (*Fusarium* sp.) e doenças que atacam as plantas (SOARES *et al.*, 2006). A azadirachtina (**4**) (Figura 2) tem se apresentado como a mais promissora no controle de pragas, pelo seu largo espectro de ação (PASSINI *et al.*, 2003).

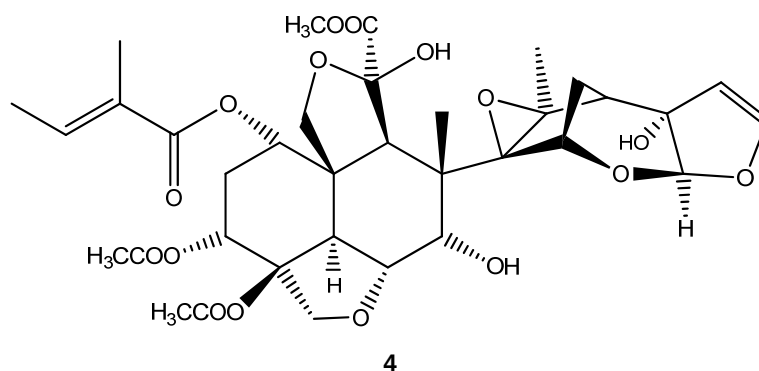


Figura 2 – Estrutura da Azadirachtina.

A rotenona (**5**), isolada de *Tephrosia spp* (Leguminosae-Papilionoideae), é utilizada no combate a insetos (Figura 3) (VIEGAS JR., 2003).

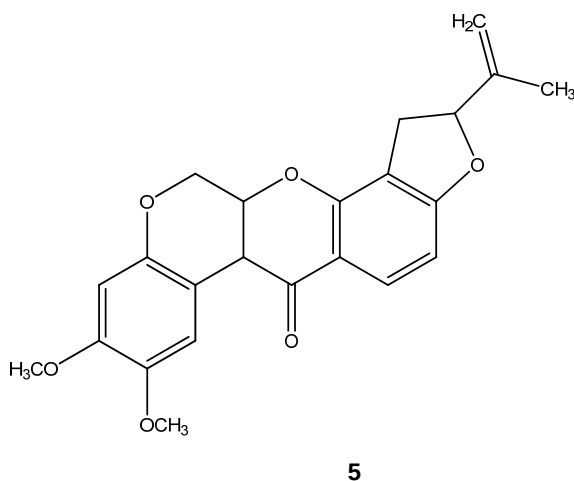
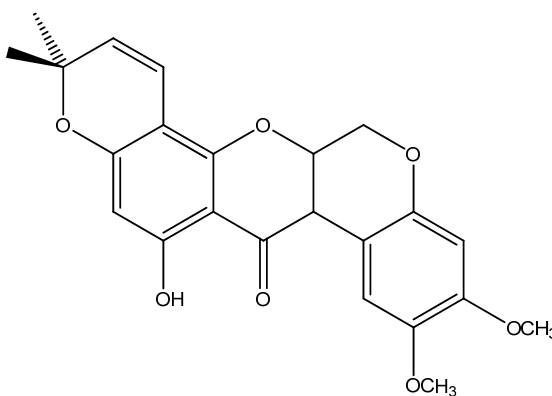


Figura 3 – Estrutura da rotenona.

Já a resina oleosa extraída da espécie *Copaifera reticulata* (Leguminosae-Caesalpinoideae) possui atividade larvicida contra a larva do mosquito *Aedes*

aegypti, agente transmissor da dengue. De acordo com a Organização Mundial de Saúde, aproximadamente 2,5 bilhões de pessoas estariam em risco de serem infectadas pelo *A. aegypti* (SILVA *et al.*, 2007b). O desenvolvimento de resistência do vetor da dengue aos inseticidas químicos (SANTIAGO *et al.*, 2005) e sua toxicidade levam à busca de novos inseticidas naturais.

Das espécies *Citrullus colocynthis* (Cucurbitaceae) e *Dirca palustris* (Thymelaeaceae) foram isolados ácidos graxos, oléico e linoléico, com atividade larvica contra o *A. aegypti* (RAHUMAN *et al.*, 2008 & RAMSEWAK *et al.*, 2001) Da espécie *Tephrosia toxicaria* (Leguminosae-Papilionoideae), Vasconcelos e colaboradores (2009) isolaram flavonóides; o α -toxicarol (**6**) foi o que apresentou significativa atividade larvica (Figura 4).



6

Figura 4 – Estrutura do α -toxicarol.

O Brasil possui uma flora muito rica, onde 22% das espécies de plantas superiores do planeta são encontradas (ELISABETSKY & COSTA-CAMPOS, 1996). Dentre as diversas árvores que compõem a flora brasileira destacam-se as chamadas “madeiras de lei” que têm grande utilidade devida sua resistência física e resistência à ataques de insetos e organismos xilófagos.

Insetos que causam grandes estragos às madeiras são os cupins ou térmitas. Estão distribuídos quase em todo globo terrestre e estima-se que os prejuízos causados anualmente são de 50 bilhões de dólares (KORB, 2007). Apenas na cidade de São Paulo, no período de 20 anos, obteve-se um prejuízo de 3,5 bilhões de dólares em 240 edificações (LELIS, 1994). Serpa (1986) constatou a presença de térmitas destruindo obras sacras, molduras de quadros, altares, vigas, caipos e ripas e constituintes do madeiramento das coberturas das edificações da cidade histórica

de Olinda, Pernambuco. Diversos fatores estimulam as pesquisas sobre controle de cupins, especialmente aquelas que visam minimizar a utilização de inseticidas sintéticos. Cheng e colaboradores (2007) extraíram óleos essenciais de *Calocedrus macrolepis* (Cupressaceae) e *Cryptomeria japonica* (Taxodiaceae) com atividade antitermítica. Em 2000, Ohmura e colaboradores testaram e constataram a inibição alimentar de vários flavonóides, inclusive da taxifolina (7) e quercetina (8) (Figura 5).

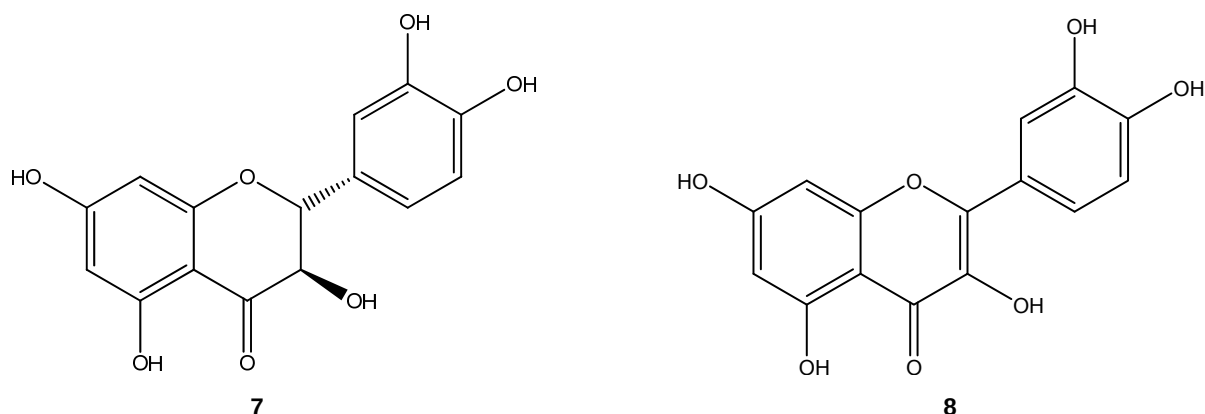


Figura 5 – Estrutura da taxifolina e quercetina.

Entre os organismos xilófagos causadores pelo apodrecimento da madeira, destacam-se a classe dos basidiomicetos, na qual se encontram os fungos responsáveis pela podridão-parda, podridão-mole e podridão-branca, este ataca tanto os polissacarídeos quanto a lignina. Dentre os fungos responsáveis pela podridão-branca destaca-se *Phanerochaete chrysosporium*, um basidiomiceto (reprodução sexuada) também conhecido popularmente como orelhas-de-pau, tipo cogumelo (FURTADO, 2001). A madeira sob ataques de fungos apresenta alterações na composição química, modificação da cor natural, aumento da permeabilidade, maior propensão ao ataque de insetos, comprometendo a sua qualidade e inviabilizando a sua utilização (OLIVEIRA *et al.*, 2005).

Devido à elevada durabilidade natural das “madeiras de lei” a ataques de insetos e fungos xilófagos, durabilidade que está intimamente associada à sua composição química, escolheu-se para estudo científico a espécie *Hymenaea stigonocarpa* (Leguminosae-Cesalpinoideae) (Figura 6), por ser considerada madeira de boa qualidade e não existir relatos de estudos científicos com o seu cerne. Outra espécie desse gênero que também é considerada como “madeira de lei” é a *Hymenaea courbaril*. Estas plantas são utilizadas na medicina popular no tratamento de ferimento, bronquites e problemas estomacais como analgésicos e

antiinflamatórios (MARSAIOLI *et al.*, 1975). E também são utilizadas na construção civil, fabricação de móveis, artigos esportivos, entre outros (CARVALHO, 2004).



Figura 6 – Árvore *Hymenaea stigonocarpa*.

Fonte: <<http://www.arvores.brasil.nom.br/cerrd/jatobc.htm>>. Acesso em 08/10/2008.

Segundo Paes e colaboradores (2003), o conhecimento da resistência natural da madeira é de suma importância para a recomendação de empregos adequados e para evitar gastos desnecessários com a reposição de peças deterioradas e reduzir os impactos sobre as florestas. E também existe a possibilidade de isolar e identificar substâncias de interesse sócio-econômico.

1.1 – Definição de Madeira

A madeira é um material produzido a partir do tecido formado pelas plantas lenhosas, constituído de fibras e vasos condutores de seiva bruta, responsável pela sustentação mecânica e transporte de alimentos. Sendo um material naturalmente resistente e leve, é frequentemente utilizado para fins estruturais e de sustentação de construções. É um material orgânico, sólido, de composição complexa, onde predominam as fibras de celulose e hemicelulose e lignina (BARRICHELO & BRITTO, 1989).

1.2 - Anatomia da Madeira

O tronco de uma árvore produtora de madeira pode ser descrito como uma pilha de cilindros superpostos. Cortado transversalmente, o tronco apresenta um desenho de círculos concêntricos, chamados anéis de crescimento. Um anel típico apresenta duas faixas: lenho inicial e lenho tardio. O tronco apenas amplia seu diâmetro a cada ano, ganhando mais dois anéis (GONZAGA, 2006). Conforme mostra a Figura 7, a madeira pode ser dividida em duas regiões, a casca e o lenho. A casca protege a árvore contra agentes externos e é dividida em duas partes: camada externa (camada cortical), composta de células mortas, e camada interna, formada por tecidos vivos moles úmidos (CHIMELO, 1989).

O lenho, a região resistente do tronco, apresenta as seguintes partes:

alburno ou
borne e cerne.

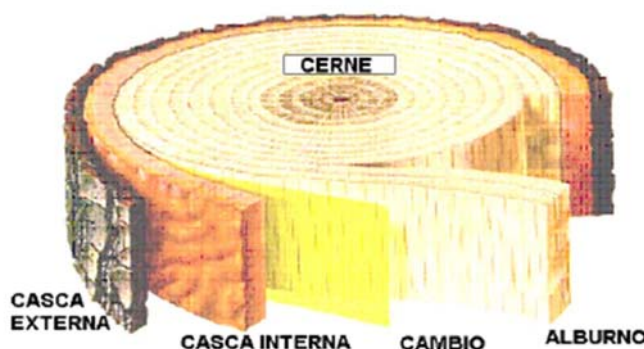


Figura 7 - Seção transversal do tronco de uma árvore.

O cerne é a parte central da madeira, frequentemente mais escura, é considerado um tecido morto, sem nenhuma atividade vegetativa. Normalmente apresenta maior durabilidade natural, devido à ausência de material nutritivo e, principalmente, à presença de extrativos (OLIVEIRA, 1986). O cerne não armazena alimento nem faz condução de seiva e funciona somente como suporte. A parte mais clara é denominada de alburno. O alburno é a parte da madeira que apresenta material nutritivo armazenado, o que o torna mais suscetível ao ataque de agentes biológicos. A transformação do alburno em cerne é iniciada internamente e não por condições externas. Dentro de uma árvore, o alburno fornece suporte ao tronco, conduz a seiva bruta até as folhas e armazena alimentos (SILVA, 2002).

1.3 – Composição química da madeira

Os constituintes químicos da madeira estão diretamente relacionados com as suas propriedades. A madeira, segundo Lepage (1986), é um biopolímero tridimensional, composto, principalmente, de celulose, hemiceluloses e lignina, também conhecidos como metabólitos primários, que são responsáveis pela formação da parede celular e pela maioria de suas propriedades. Os componentes minoritários de baixo peso molecular são os extrativos ou metabólitos secundários (saponinas, taninos, alcalóides, flavonóides, graxas, terpenos e esteróides) e as substâncias minerais, que constituem o material inorgânico. Os extrativos presentes nas madeiras, além de conterem substâncias tóxicas a insetos e microrganismos, possuem outros componentes que podem servir como fonte nutricional para organismos xilófagos, como os açúcares solúveis e os açúcares álcoois. Os constituintes químicos variam dependendo da espécie. Quanto à celulose: 30-50%; hemicelulose: 20-30%; lignina: 20-40%; metabólitos secundários: 3-10% e material inorgânico: 0,3-5% (RICHTER & BURGER, 1978).

O conhecimento da natureza química da madeira possibilita o entendimento de seu comportamento como matéria-prima para diversos usos. A madeira, em virtude da sua estrutura e constituição química, é passível de sofrer o ataque de vários organismos como térmitas (cupins) e fungos xilófagos, sendo estes os organismos responsáveis pelas maiores perdas causadas em estrutura de madeira (PAES *et al.*, 2005).

1.4 - Biodeterioração da madeira

A deterioração da madeira é um processo em que ocorrem mudanças significativas nas propriedades físico-químicas da mesma, que podem ser causadas por agentes físicos, químicos ou biológicos (SILVA, 2007a). A resistência natural da madeira é medida pela sua capacidade de resistir à deterioração (PAES, *et al.*, 2002). Umidade e temperatura são os principais fatores que afetam a velocidade da deterioração. A madeira é mais rapidamente degradada em áreas quentes e úmidas que favorecem a deterioração biológica (SILVA, 2007a).

A constituição química, variável entre as espécies e até mesmo entre as células da mesma madeira, é um fator determinante da sua resistência natural ao ataque dos

microrganismos (PAES *et al.* 2002, 2005). Os ataques mais comuns e destrutivos são ocasionados por fungos (ISTEK *et al.*, 2005), que são os responsáveis por alterações nas propriedades físicas e mecânicas da madeira, uma vez que degradam progressivamente o material que compõe a parede celular. Os polissacarídeos presentes na parede celular da madeira servem de fonte de energia (alimento) para os microrganismos (LELIS *et al.*, 2001). No processo de deterioração por fungos, a lignificação é conhecida por ser um fator de resistência à degradação da parede celular. Usualmente, a habilidade de fungos em deteriorar a madeira não é a mesma para todas as espécies, sendo observada especificidade de alguns fungos a algumas madeiras (FERRAZ *et al.*, 2001).

Os cupins são os principais insetos xilófagos, destruidores de madeiras, mesmo quando em colônias com poucos indivíduos (SILVA *et al.*, 2004). Diferenciam-se em castas, nas quais muitos operários alimentam-se da madeira por possuírem protozoários no intestino, o que lhes possibilita digerir a celulose. O tempo de sobrevivência dos cupins é variável e depende das condições ambientais (STUMPP *et al.*, 2006).

1.5 - Defesa das plantas

Para sobreviver, as plantas desenvolveram mecanismos de resposta a danos e doenças, acionados assim que reconhecem a agressão. Os vegetais sofrem constantes agressões por agentes bióticos e abióticos. Vírus, bactérias, fungos, insetos e outros organismos podem causar doenças, cada um por um mecanismo próprio, ou danos físicos. Em geral, agentes não-biológicos como radiação ultravioleta, temperatura, umidade e outros danificam os tecidos (MARGIS-PINHEIRO *et al.*, 1993).

As plantas podem desenvolver mecanismos físicos de defesa, suas partes mais atraentes ou mais expostas com defesas físicas, como pêlos ou espinhos que irritam ou cortam a pele e produzem dor.

As defesas químicas, como exemplo os fenilpropanóides, são importantes no crescimento vegetal, mas também atuam na proteção contra estresses ambientais. Seu metabolismo em plantas superiores tem sido associado à regulação do crescimento, à resistência a doenças e raios ultravioleta, à ativação de bactérias e à síntese de componentes da parede celular vegetal. A enzima fenilalanina-amônia-liase (PAL) provoca a primeira de uma série de reações metabólicas que gera

inúmeros produtos naturais, muitos deles têm atividade antifúngica (MARGIS-PINHEIRO *et al.*, 1993). Algumas destas substâncias são encontradas em plantas saudáveis na forma biologicamente ativa. Os glicosídeos cianogênicos e glucosinolatos são precursores inativos e são ativados em reação de tecido danificado ou ataque patogênico (MANSFIELD, 1996).

Outras formas de defesa química vegetal são os agentes alelopáticos e a síntese de fitoalexinas.

1.5.1 - Fitoalexinas

São substâncias quimicamente derivadas dos fenilpropanóides e sesquiterpenos com ampla ação antimicrobiana. Podem se acumular até níveis suficientes para limitar o crescimento do patógeno e são tóxicas para protoplastos (células vegetais sem parede celular), células animais, bactérias e fungos. É provável que as fitoalexinas atuem de forma direta sobre o agressor e também causem a morte do tecido infectado. Tais substâncias só são produzidas em áreas próximas do local de infecção, em resposta ao ataque de todos os patógenos que induzem necrose e de agentes abióticos como metais pesados, congelamento parcial, alguns reguladores de crescimento, certas moléculas orgânicas, luz ultravioleta e estresses químicos e mecânicos (VANETTEN *et al.*, 1996).

Na Figura 8 observam-se estruturas representativas de fitoalexinas, pisatina (**9**) e capsidiol (**10**).

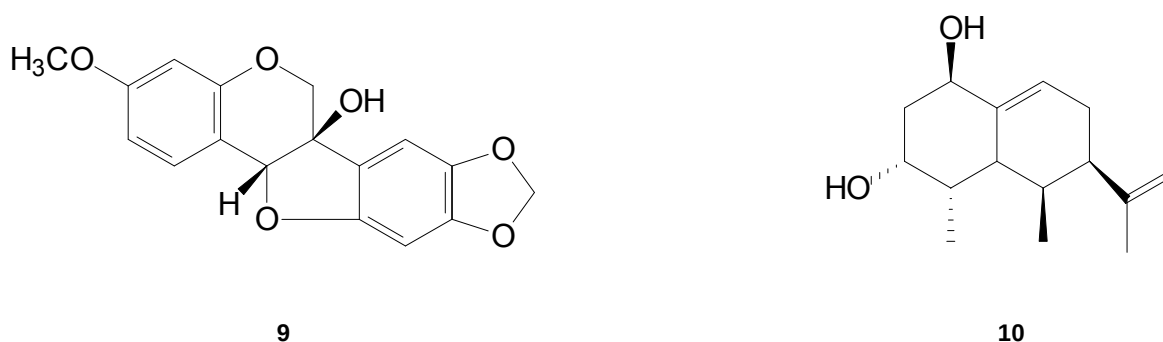


Figura 8 – Estruturas de fitoalexinas.

As fitoalexinas são derivados biossintéticos de uma ou várias rotas primárias: ácido chiquímico, acetato malonato e acetato mevalonato. Embora exista tanta diversidade nas estruturas químicas, muitas famílias de plantas produzem fitoalexinas da mesma classe química. Assim, as fitoalexinas têm sido usadas na investigação quimiotaxonômica (SENEVIRANTE & HARBONE, 1999).

2 – REVISÃO DE LITERATURA

2.1 – A família Leguminosae

A nomenclatura botânica segue como norma, os nomes mais antigos dados às famílias das plantas. Fabaceae que dá lugar a Leguminosae, uma das mais importantes famílias botânicas. A classificação mais moderna da família Leguminosae divide-se em três sub-famílias: Caesalpinoideae, Mimosoideae e Papilionoideae. Por esta classificação, o gênero *Hymenaea* pertence à família Leguminosae, sub-família Caesalpinoideae (JUDD *et al.*, 2002).

2.2 – *Hymenaea stigonocarpa*

A espécie *Hymenaea stigonocarpa* é conhecida popularmente como jitaí, jutaí, jutaí-açú, jatobeiro, jatobá-mirim, jataí, jatobá-do-cerrado, jataí-peba, jataíba, burandã e farinheira. Ocorre do Piauí até o norte do Paraná na floresta semidecídua, tanto em solos de alta quanto de média fertilidade. São árvores de tamanhos variáveis, crescem em média, de 8 a 15 metros de altura, mas podem alcançar até 20 metros (CARVALHO, 2004).

Como madeira, jatobá é pesada, densidade 0,96 g/cm³ e 15% de umidade. Possui alburno espesso, claro ligeiramente amarelado. Cerne variável quanto à cor, do castanho-claro-rosado ao castanho-avermelhado, com tonalidades mais ou menos intensas. A superfície é pouco lustrosa e ligeiramente áspera com textura média e uniforme; grã de regular a irregular. Quanto à durabilidade natural, possui resistência média alta ao ataque de organismos xilófagos. Estacas de cerne dessa espécie mostraram alta resistência a fungos e a cupins. Contudo, a vida média da madeira, em contato com o solo é inferior a nove anos. É uma madeira pouco permeável às soluções preservantes, quando submetida à impregnação sob

pressão. Apresenta resistência para tornear e faquear. O acabamento é agradável. Aceita pintura, verniz, lustro e emassamento. A madeira de jatobá pode ser usada na construção civil e em carpintaria, em geral, em acabamentos internos, como vigas, caibros, ripas, batentes de portas, tacos para assoalho, artigos de esporte, cabos de ferramentas e de implementos agrícolas. Também para construções externas como obras hidráulicas, postes dormentes, cruzetas e esquadrias. Para energia não produz lenha de boa qualidade. É adequada para a fabricação de papel e celulose. As resinas naturais de Jatobá são empregadas em obras de arte para fins variados, mas principalmente como componentes de vernizes. As resinas terpênicas têm sido bastante utilizadas, principalmente a resina de damar que, devido ao seu alto índice de refração e baixo peso molecular proporciona um filme de verniz com alta saturação de cores (CARVALHO, 2004).

Posição taxonômica

REINO: Plantae

DIVISÃO (FITO): Magnoliophyta

CLASSE: Magnoliopsida

ORDEM: Fabales

FAMÍLIA: Leguminosae

SUB-FAMÍLIA: Caesalpinaceae

GÊNERO: *Hymenaea*

ESPÉCIE: *Hymenaea stigonocarpa*

2.3 – Espécies de *Hymenaea* estudadas

Hymenaea courbaril

É também conhecida como jatobá e seus frutos são bom alimento para o suíno e a polpa doce e mucilagínosa que envolve as sementes é comestível e laxativa; a sua abundante resina, conhecida como copal, também é medicinal (CÔRREA, 1984).

Simões e colaboradores, em 2009, isolaram duas cumarinas, a ipomopsina (**11**) e hymenaina (**12**) (Figura 9), das sementes de *H. courbaril* com atividade antifúngica.

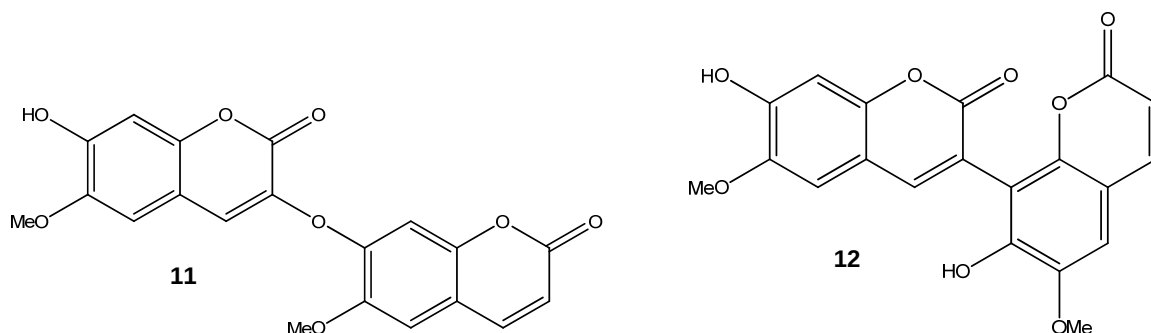


Figura 9 - Estruturas das cumarinas isoladas das sementes de *H. courbaril*.

Imai e colaboradores (2008) isolaram dois flavonóides do cerne de *H. courbaril*, a taxifolina (**13**) e o fisetinidol (**14**), ambos com atividade antioxidante (Figura 10).

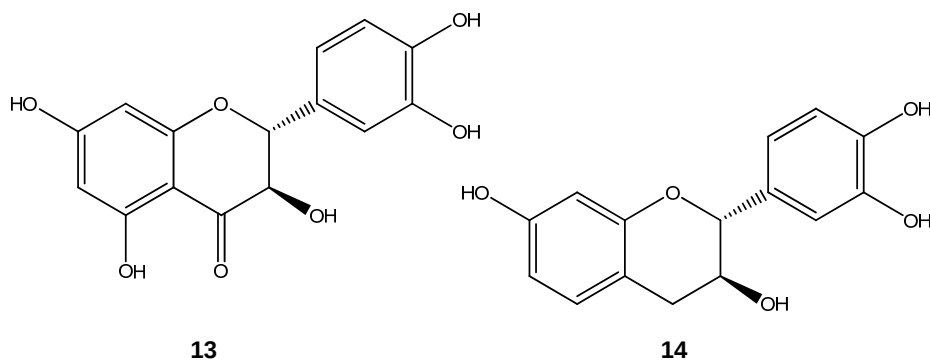


Figura 10 Estruturas dos flavonóides isolados do cerne de *H. courbaril*.

Lima e colaboradores em 1995 isolaram oligossacarídeos das sementes desta planta, e das folhas foram isolados polissacarídeos (BUSATO *et al.*, 2001; REICHER *et al.*, 2001).

Abdel-Kader e colaboradores (2002) isolaram das folhas e galhos diterpenos do tipo halimadieno, ácido (13*R*)-13-hidroxi-1(10),14-*ent*-halimadien-18-oico (**15**), ácido (2*S*,13*R*)-2,13-dihidroxi-1(10),-14-*ent*-halimadien-18-oico (**16**), e ácido (13*R*)-2-oxo-13-hidroxi-1(10),14-*ent*-halimadien-18-oico (**17**) (Figura 11) com atividade citotóxica.

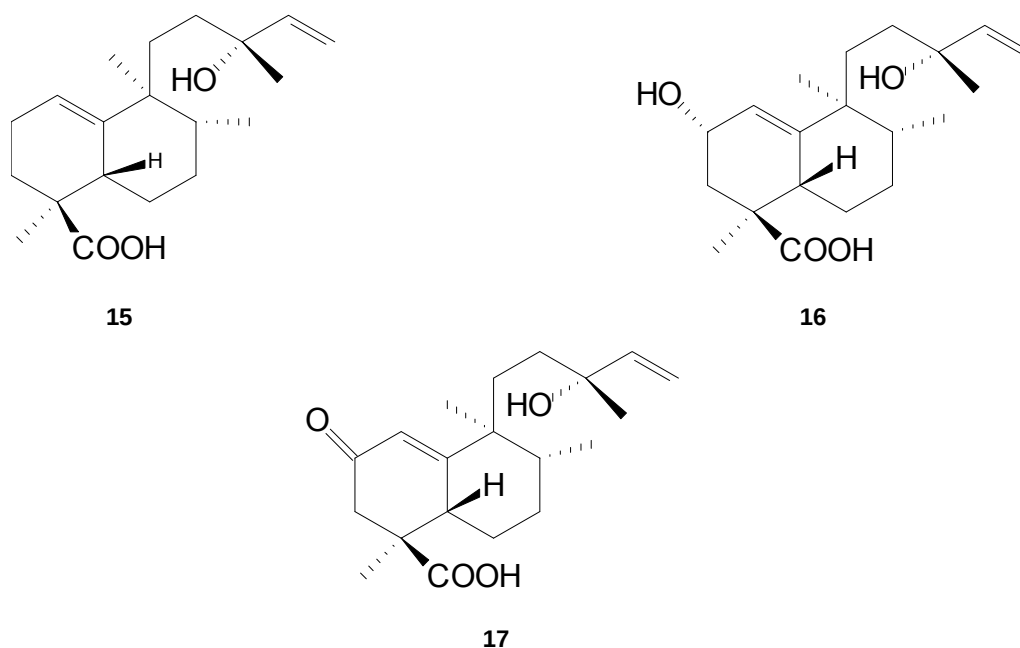


Figura 11 – Estruturas dos diterpenos isolados das folhas e galhos de *H. courbaril*.

Em 2001, Nogueira e colaboradores isolaram das sementes diterpenos e entre eles dois novos clerodanos, ácido (5*R*,8*S*,9*S*,10*R*)-cleroda-3,13*E*-dien-15-oico (**18**) e ácido (5*S*,8*S*,9*S*,10*R*)-cleroda-3,13*E*-dien-15-oico (**19**) (Figura 12).

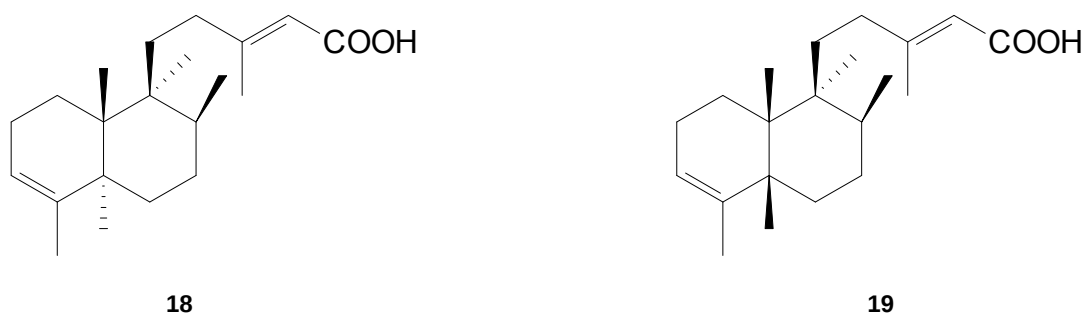


Figura 12 – Estruturas dos diterpenos isolados das sementes de *H. coubaril*.

Em 1972, Martin e colaboradores isolaram das folhas os sesquiterpenos α -copaeno (**20**) e α -cubebeno (**21**) (Figura 13), com atividade antimicrobiana.

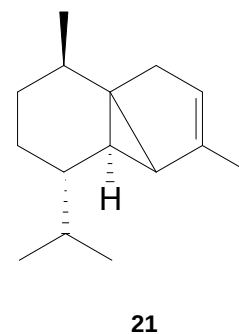
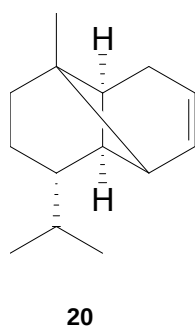
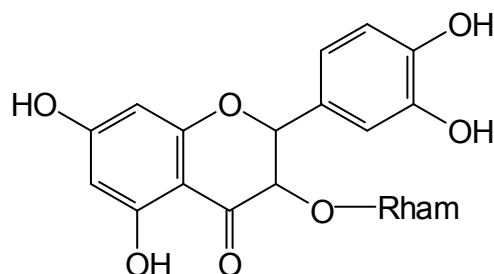


Figura 13 – Estruturas dos sesquiterpenos isolados das folhas de *H. courbaril*.

Hymenaea parvifolia

Ishibashi e colaboradores, em 1999, isolaram dihidroflavonóis α , β -ramnosídeos, a neoastilbina (**22**) e astilbina (**23**), das cascas de *H. parvifolia* com atividade de inibir a enzima caseína quinase II (Figura 14).



$2\alpha - H, 3\beta - H$ (2S, 3S)

22

$2\beta - H, 3\alpha - H$ (2R, 3R)

23

Figura 14 – Estruturas dos dihidroflavonóis ramnosídeos isolados das cascas do caule de *H. parvifolia*.

Hymenaea palustris

Pettit e colaboradores, em 2003, isolaram das folhas de *H. palustris* flavonóides do tipo luteolina (**24**), crisoeriol (**25**), palstatina (**26**), entre outros (Figura 15). A palstatina, um dos flavonóides isolados, inibe o crescimento de célula leucêmica linfótica tipo P388.

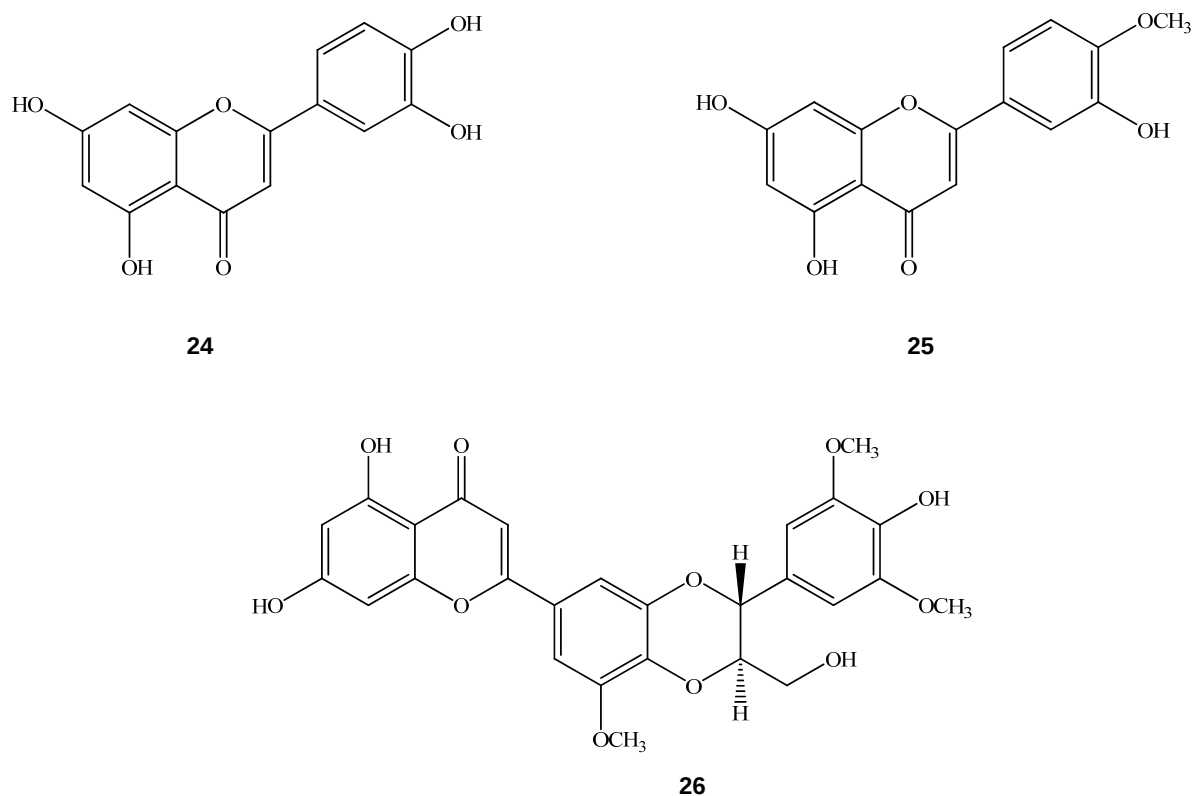


Figura 15 – Estruturas de alguns flavonóides isolados das folhas de *H. palustris*.

Hymenaea stigonocarpa

Silva e colaboradores (1998) analisaram a polpa do fruto de *Hymenaea stigonocarpa* a fim de determinar a composição química da farinha de jatobá e investigar seu potencial de utilização na produção de biscoitos tipo cookie empregando-se testes sensoriais univariados e multivariados para otimizar a formulação do produto final.

A resina extraída das sementes desta planta contém diterpenóides que possuem esqueletos estruturais do tipo labdano (**27**), abietano (**28**) e pimarano (**29**) (Figura 16) (FARIAS, *et al.*, 2004).



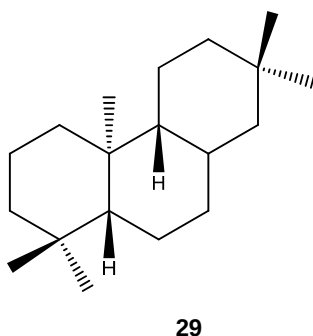


Figura 16 – Esqueletos estruturais do tipo labdano e abietano e pimarano.

Também foram isolados sesquiterpenos das folhas desta espécie o β -cariofileno (**30**) e γ -muroleno (**31**), com atividade antifúngica e ação deterrente contra insetos (Figura 17) (LANGENHEIM *et al.*, 1986).

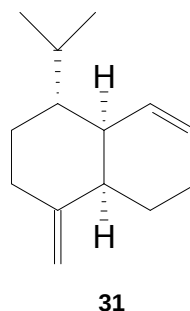
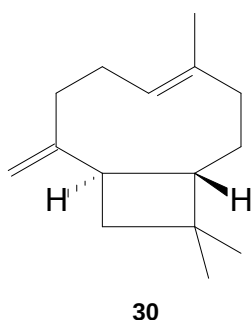


Figura 17 – Estruturas dos sesquiterpenos isolados das folhas de *H. stigonocarpa*.

Das espécies de *Hymenaea* estudadas, verifica-se que entre as classes de compostos isoladas predominam os terpenóides e flavonóides. Os flavonóides destacam-se como fitoalexinas que atuam como defesa das plantas (INGHAM, 1982).

2.4 – Flavonóides

Os flavonóides são estruturas polifenólicas de baixo peso molecular encontradas naturalmente nas plantas. Esses metabólitos secundários apresentam interesse econômico devido as suas diferentes propriedades, por exemplo, as cores

que esses pigmentos possuem, sua importância para nutrição e sabor dos alimentos. Também possuem importância farmacológica como: anticarcinogênico, antiinflamatório, antialérgico, antiulcerogênico, antiviral entre outros. Pode-se encontrar flavonóides em diversas formas estruturais. Entretanto, a maioria dos representantes dessa classe possui 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental, constituído de duas fenilas ligadas por uma cadeia de três carbonos entre elas. Nos compostos tricíclicos, as unidades são chamadas núcleos A, B e C e os átomos de carbono recebem a numeração com números ordinários para os núcleos A e C e os mesmos números seguidos de uma linha (') para o núcleo B (Figura 18). Alguns autores substituem a numeração 9 e 10 nos flavonóides por 8a e 4a , respectivamente (ZUANAZZI, 2001).

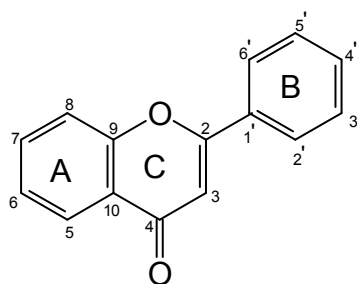
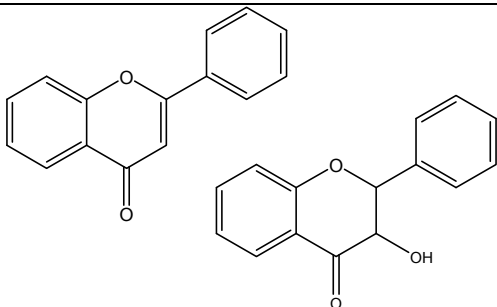
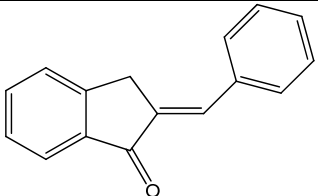
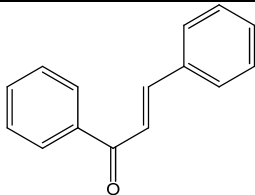
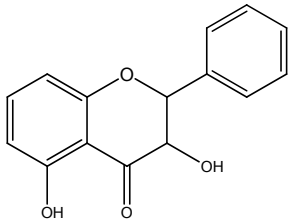
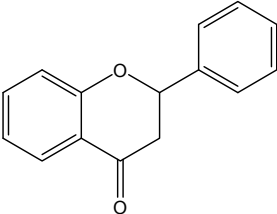
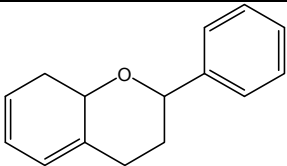
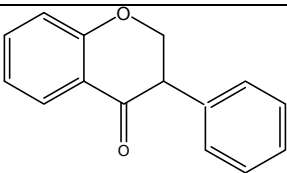
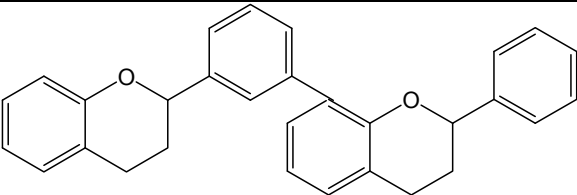


Figura 18 - Núcleo fundamental dos flavonóides e sua numeração.

Os flavonóides apresentam-se freqüentemente oxigenados e um grande número ocorre conjugado com açúcares. Na Tabela 1 estão apresentadas as principais classes de flavonóides e suas propriedades mais importantes (ZUANAZZI, 2001).

Tabela 1 – Principais classes de flavonóides e algumas de suas propriedades.

Classes	Núcleo fundamental	Características
Flavonas, flavonóis		Copigmentação em flores; protetores contra raios UV nas folhas
Auronas		Pigmentação amarela; Propriedade antibacteriana; antifúngica
Chalconas		Pigmentação amarela; Propriedade antibacteriana; antifúngica
Diidro-flavonóis		Estão presentes frequentemente em tecidos de madeiras Propriedade antifúngica

Flavanonas		Podem apresentar sabor amargo; Propriedade antifúngica
Flavanas		Substâncias adstringentes com propriedades tanantes
isoflavonóides		Propriedades estrogênicas e/ou antifúngica
biflavonóides		Propriedades antifúngica

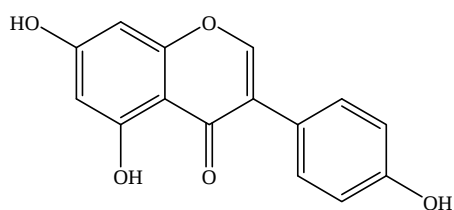
Nas plantas os flavonóides têm as seguintes funções:

- ❖ Proteção dos vegetais contra a incidência de raios ultravioleta e visível;
- ❖ Proteção contra insetos, fungos, vírus e bactérias;
- ❖ Atração de animais com finalidade de polinização;
- ❖ Ação antioxidante;
- ❖ Controle da ação de hormônios vegetais;
- ❖ Agentes alelopáticos;
- ❖ Inibição de enzimas.

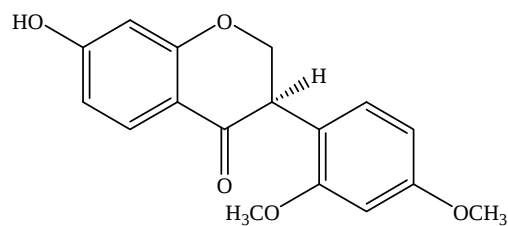
Nos últimos anos tem-se observado um interesse crescente no estudo da atividade biológica de plantas que contém flavonóides. Neste sentido tem-se desenvolvido trabalhos sobre ação dos flavonóides na biologia das plantas, bioquímica ecológica, quimiotaxônomia, tecnologia de alimentos e farmacologia. Levando em consideração estes fatores, são relevantes os conhecimentos sobre as fontes naturais de flavonóides (BUCKINGHAM, 1993).

2.4.1 - Flavonóides como fitoalexinas

Existe muito estudo envolvendo fitoalexinas da família Leguminosae. As fitoalexinas mais encontradas nesta família são isoflavonóides, daidzeína (**32**), vestitona (**33**) e pterocarpanos, demetilmedicarpina (**34**) (Figura 19) (INGHAM, 1982).



32



33

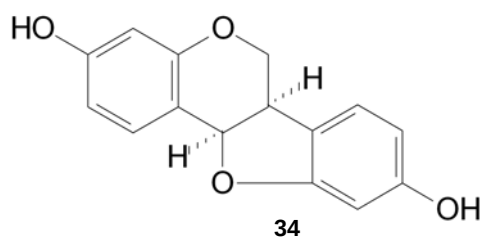


Figura 19 – Isoflavonoides como fitoalexinas da familia Leguminosae.

Das raízes de *Lonchocarpus latifolius*, leguminosae, Magalhães e colaboradores (2000) isolaram uma flavana do tipo (2,3-trans-3,4-trans)-3,4-dimetoxi-(2'',3'':7,8)-furanoflavana (**35**), também uma fitoalexina (Figura 20).

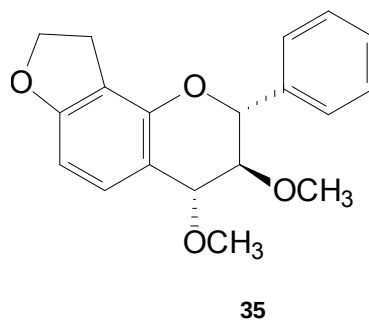


Figura 20 – Flavana como fitoalexina da familia Leguminosae.

Outras famílias apresentam flavanas como fitoalexinas, por exemplo, na família Amaryllidaceae, foi encontrado a 7-hidroxiflavana (**36**) (COXON, 1982) (Figura 21).

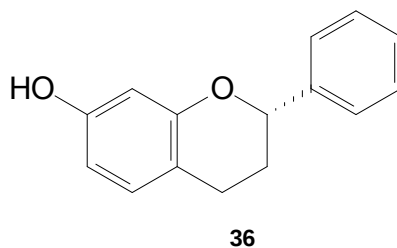


Figura 21 – Flavana como fitoalexina da familia Amaryllidaceae.

2.4.2 – Biossíntese dos flavonóides

Nas plantas, a rota do ácido chiquímico é a precursora dos compostos aromáticos, dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano e alcalóides derivados da quinoleína e processa-se no citosol da célula vegetal.

A biossíntese inicia-se (Figura 22) pela hidroxilação na posição 4 do ácido cinâmico, dando origem ao ácido *p*-cumárico. O ácido *p*-cumárico condensa com uma cadeia policetônica resultante da condensação de 3 unidade de malonil-CoA, originando uma chalcona por ação da enzima chalcona sintase. Esta cicliza originando flavanonas ou isoflavanonas, a partir das quais se formam os demais flavonóides (DEWICK, 1997).

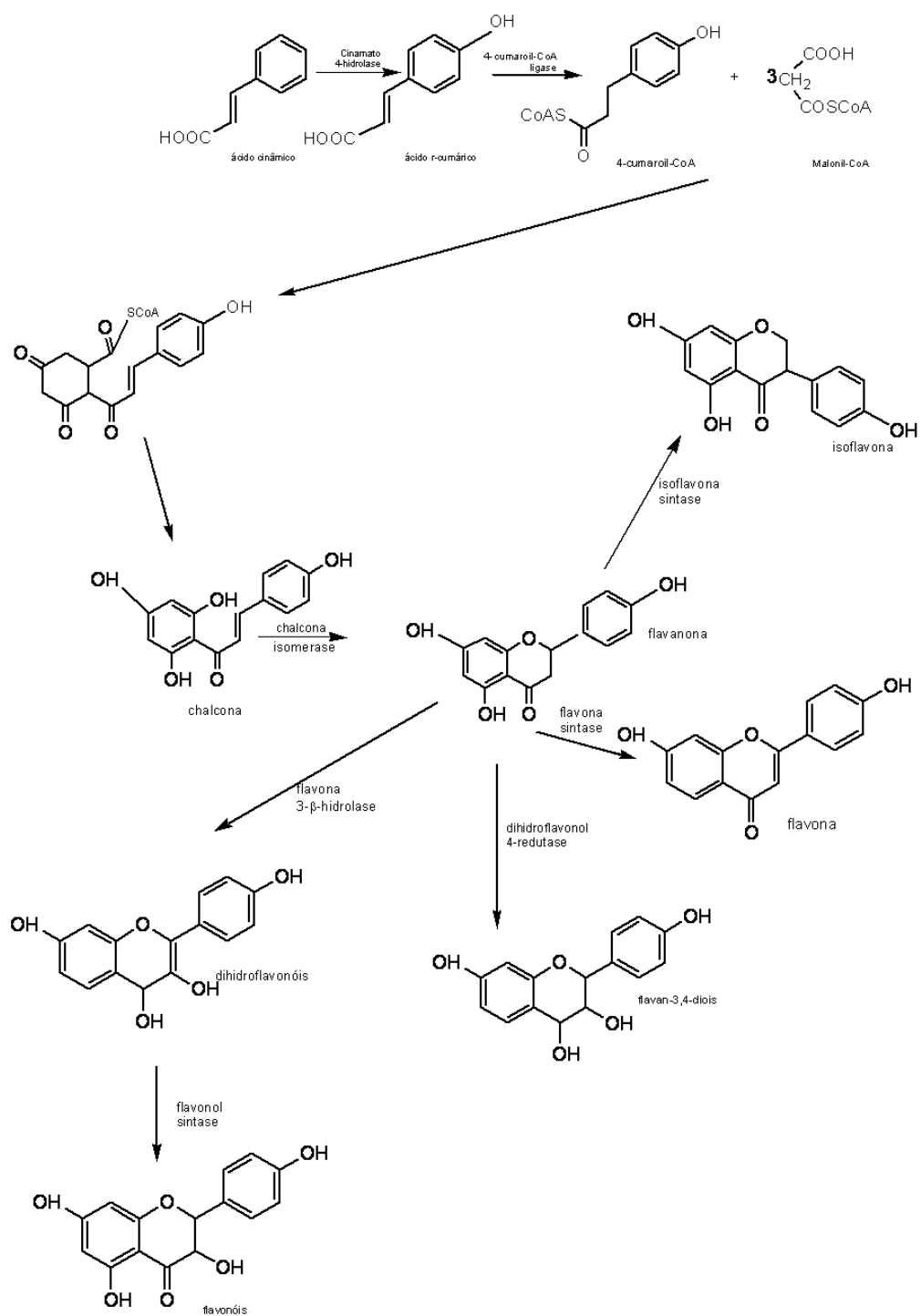


Figura 22– Biossíntese de flavonóides (DEWICK, 1997).

2.5 - Ácidos graxos

Os ácidos graxos são derivados lipídicos que apresentam saturação e insaturação. São considerados ácidos carboxílicos de cadeia longa. A maioria dos ácidos graxos naturais saturados tem cadeia não ramificada e número par de átomos de carbono e os insaturados têm duas ou três duplas ligações; a primeira dupla ligação geralmente ocorre entre C₉ e C₁₀, e as outras duplas a partir do C₁₂ ou C₁₅, não são conjugadas. Pode-se citar como exemplo de saturação o ácido mirístico (**37**) e insaturação, o ácido palmitoléico (**38**) (Figura 23) (SOLOMONS, 1996).

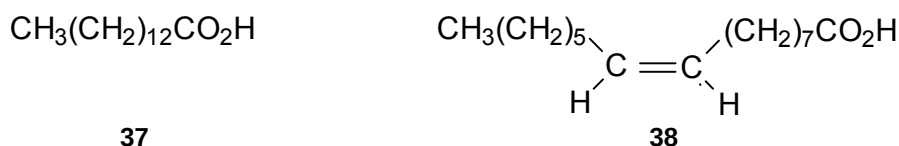
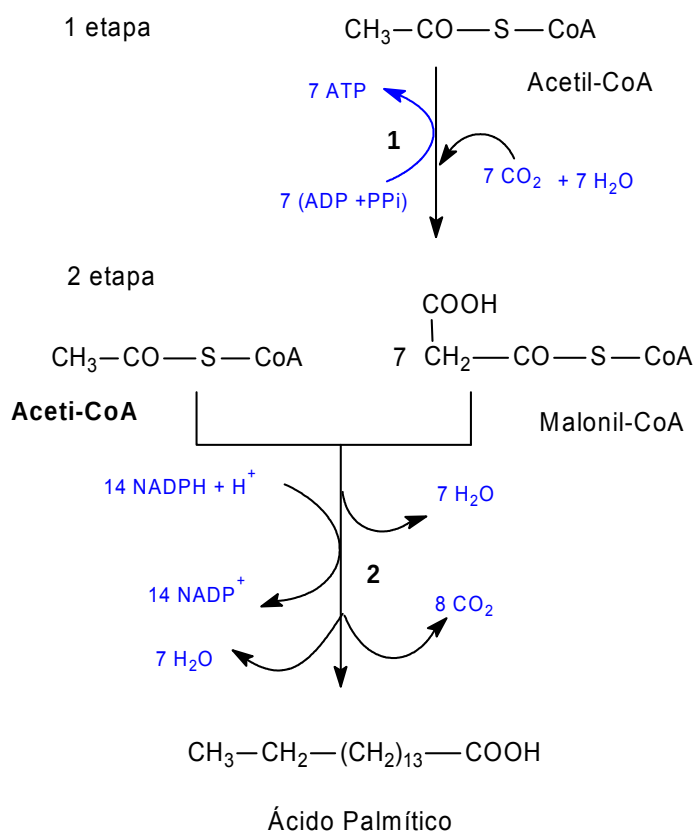


Figura 23 – Estruturas dos ácidos graxos, mirístico e palmitoléico.

2.5.1 - Biossíntese de ácidos graxos

O precursor fundamental de todos os átomos de carbono da cadeia do ácido graxo é a acetil-CoA derivada das fontes de carboidratos ou aminoácidos. Na reação global de síntese dos ácidos graxos é catalisada por um aglomerado de sete proteínas do citosol, o complexo da ácido graxo-sintetase. Das oito unidades acetílicas requeridas para a biossíntese do ácido palmítico, somente uma é fornecida diretamente pela acetil-CoA; as outras sete surgem na forma de malonil-CoA, formada a partir de acetil-CoA e HCO₃⁻ em uma reação de carboxilação. Um resíduo acetílico e sete resíduos malonílicos sofrem sucessivas etapas de condensação, com a liberação de sete moléculas de CO₂, formando o ácido palmítico; os equivalentes de redução são fornecidos pelo NADPH demonstrados na Figura 24 (THIELE, 1979).

A única molécula de acetil-CoA requerida no processo serve como um desencadeador; os dois átomos de carbono de seu grupo acetílico tornam-se os dois átomos de carbono terminais (15 e 16) do ácido palmítico formado. A cadeia cresce durante a síntese do ácido graxo, iniciando-se, assim, no grupo carboxílico da acetil-CoA e processando-se por adições sucessivas de resíduos acetílicos na extremidade carboxílica da cadeia crescente. Cada resíduo acetílico sucessivo deriva de dois dos três átomos de carbono de um resíduo do ácido malônico que entra no sistema na forma de malonil-CoA; o terceiro átomo de carbono do ácido malônico, isto é, o do grupo carboxílico não-esterificado, perde-se como CO₂. O produto final é uma molécula de ácido palmítico (LEHNINGER,1988).



Enzimas

1- Acetil-CoA-Carboxilase

2- Complexo Enzimático Ácido graxo Sintase

Figura 24 - Reação global da síntese dos ácidos graxos (THIELE,1979).

3 - OBJETIVOS

- Contribuir para a química de produtos naturais na busca de constituintes químicos biologicamente ativos extraídos de madeiras de lei.
- Identificar os extratos que apresentarem atividade biológica frente a microorganismos, cupins e larvas do mosquito da dengue.
- Identificar as classes químicas presentes no cerne de *Hymenaea stigonocarpa*.
- Extrair e identificar os principais constituintes químicos do cerne de *Hymenaea stigonocarpa*.
- Testar a atividade antimicrobiana, larvicida e antitermítica dos extratos e dos constituintes isolados e purificados.
- Identificar por métodos espectroscópicos os compostos purificados (biologicamente ativos e inativos).

4 - MATERIAL

4.1- Material botânico – *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne foi coletada no município de Caxias, Maranhão em fevereiro de 2003. Identificada pelo Prof. Gonçalo Moreira Conceição da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA) e catalogada no herbário Prof. Aluizio Bittencourt (HABIT) da UEMA sob o nº 055. Parte do tronco da planta foi cortado em discos e secos à temperatura ambiente. A parte da planta utilizada nesta pesquisa foi o cerne que foi separado do alburno e triturado.

4.2- Microorganismos – Os microorganismos utilizados nos testes de atividade antimicrobiana pertencem à coleção de cultura do Departamento de Antibióticos – UFPE (Tabela 2).

Tabela 2 – Microorganismos que foram utilizados nos testes de atividade antimicrobiana.

Grupo microbiano	Microorganismos	Nº de registro
Bactérias Gram-positivas ^a	<i>Staphylococcus aureus</i>	DAUFPE 02
	<i>Bacillus subtilis</i>	DAUFPE 16
Bactérias Gram-negativas ^a	<i>Escherichia coli</i>	DAUFPE 224
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	DAUFPE 55
Álcool-ácido-resistente ^a	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	DAUFPE 71
Fungo da podridão-branca ^b	<i>Phanerochaete chrysosporum</i>	Fundação André Torselo
Fungos fitopatogênicos ^c	<i>Fusarium oxysporum</i>	DAUFPE 2031
	<i>Fusarium moniliforme</i>	DAUFPE 2456 / 2291

^a Agar Mueller-Hinton; ^b Agar Extrato de Malte; ^c Agar Sabouraud.

4.2.1- Meios de cultura

Os meios de cultura utilizados nos testes de atividade antimicrobiana foram:

Agar Mueller-Hinton – para as bactérias

Infusão de carne	300,0g
Caseína hidrolisada	17,5g
Amido	1,5g
Agar	17,0g
Água destilada	1000 mL
pH=7,4	

Agar Sabouraud - para os fitopatógenos

Peptona	10,0g
Maltose	40,0g
Agar	15,0g
Água destilada	1000 mL
pH= 5,6	

Agar Extrato de Malte – para fungo da podridão-branca

Digestão péptica do tecido animal	0,78g
Maltose	12,7g
Dextran	2,7g
Agar	150g
Água destilada	1000 mL
pH=4.7	

4.3 - Larvas do mosquito *Aedes aegypti* – foram utilizadas larvas do mosquito em estágio L4, que corresponde à última fase da larva. Os experimentos foram conduzidos no laboratório de ecologia química – DQF/UFPE.

4.4 – Térmitas da espécie *Nasutitermes corniger* – A colônia de termitas utilizadas foram adquiridas na Universidade Federal Rural de Pernambuco

(UFRPE). Os térmitas foram identificados pelo Dr. Luiz Roberto Fontes e os bioensaios orientados pela Prof^a Auristela Albuquerque do Departamento de Biologia, desta mesma universidade. Os experimentos foram conduzidos no laboratório de Ecologia Química – DQF/UFPE.

4.5 - Material cromatográfico

- Colunas cromatográficas tendo como suporte: Sílica gel 60 G (70-230 mesh) e Sephadex LH-20.
- Placas cromatográficas em camada delgada de sílica gel com revelador fluorescente UV₂₅₄ Macherey-Nagel.
- Cubas cromatográficas e reveladoras.
- Revelador para cromatografia em camada delgada: iodo sublimado (I₂).
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC) Modelo HP-1100
- Cromatógrafo gasoso GC-17A (Shimadzu), temperatura de 175-280°C, coluna DB-5 (30m X 0,25mm), gás N₂, acoplado ao espectrômetro de massa MS-QP5050 (Shimadzu).

5 – MÉTODOS

5.1 - Abordagem fitoquímica

Com o cerne de *H. stigonocarpa*, seco à temperatura ambiente e triturado, foram analisadas as principais classes de substâncias (Tabela 3), através da metodologia descrita por Costa (1982).

Tabela 3 – Testes que identificam as classes de substâncias presentes na *H. stigonocarpa*.

Classes de substâncias	Testes
Alcalóides	Dragendorff, Mayer
Esteróides e Terpenos	Liebermann-Buchard
Taninos	Cloreto férrico
Saponinas	Espuma
Flavonóides	Shinoda, oxalo-bórica

5.1.1- Alcalóides

Para identificar a presença de alcalóides foi adicionada a 1g de cerne seco e triturado 10 mL de H_2SO_4 a 1%; em seguida, esta mistura foi aquecida em banho-maria a $100^\circ C$ por 2 minutos e filtrada. Foram utilizadas alíquotas do filtrado para determinar a presença de alcalóides com os reagentes de Dragendorff e Mayer.

O teste de Dragendorff é considerado positivo com o surgimento de um precipitado vermelho alaranjado.

O teste de Mayer é positivo com o aparecimento de um precipitado de cor branca.

5.1.2 - Esteróides e terpenóides

A presença de esteróides e terpenos foi detectada pelo teste de Liebermann-Buchard. Foi acrescentada aproximadamente 1g de cerne seco e triturado a 3 mL de clorofórmio. Em seguida esta solução foi filtrada e adicionado ao filtrado 2 mL de anidrido acético e agitado manualmente. Foi adicionada a solução obtida 5 gotas de H_2SO_4 concentrado. O aparecimento sucessivo de cores do rosa ao azul e verde caracteriza a presença de esteróides e terpenóides.

5.1.3 - Flavonóides

Para verificar a presença de flavonóides foram utilizados os seguintes testes:

Teste de Shinoda - Foi adicionado 5 mL de MeOH a 1g de cerne seco e triturado; a solução obtida foi filtrada e em seguida, adicionado 1mL de HCl concentrado. Esta solução foi deixada reagir com 1 cm de fita de magnésio. O aparecimento de uma coloração rosa caracteriza a presença de flavonóides.

Reação oxalo-bórica - Foi adicionada 5 mL de acetona a 1g de cerne seco e triturado, a solução obtida foi filtrada e concentrada em banho-maria até 0,5mL. Foi adicionado ao concentrado 0,05mg de ácido oxálico e a mesma quantidade de ácido bórico; esta solução foi então aquecida em banho-maria durante 5 minutos e adicionada a ela 10mL de éter etílico. O aparecimento de fluorescência na luz UV indica a presença de flavonóides.

5.1.4- Saponinas

Foi utilizado o teste de espuma para verificar a presença de saponinas. Foi adicionada 5 mL de água destilada a 1g de cerne seco e triturado. Em seguida esta mistura foi agitada vigorosamente por cerca de 5 minutos. A formação de espuma persistente por 30 minutos evidencia a presença de saponinas.

5.1.5- Taninos

Para determinar a presença de taninos foi adicionado 10 mL de água à 1g de cerne seco e triturado, agitou-se manualmente e em seguida a solução foi filtrada. Ao filtrado foi adicionado 5 gotas aproximadamente de uma solução de cloreto férrico a 1%. O surgimento de uma coloração ou precipitado verde ou azul indica reação positiva para taninos.

5.2- Extração

O cerne de *H. stigonocarpa* (200g) foi submetido a extrações sucessivas com C_6H_{12} , AcOEt, MeOH. Primeiro a extração foi realizada com 1L de C_6H_{12} durante 48h com agitação manual ocasional. Filtrou-se e evaporou-se o solvente. O resíduo foi submetido por mais duas vezes à extração com o mesmo solvente. Este processo foi repetido três vezes com o AcOEt e MeOH. Os extratos foram concentrados em evaporador rotativo e com eles foram realizados testes de atividade antimicrobiana, antitérmica e larvica, conforme descrito na Figura 25.

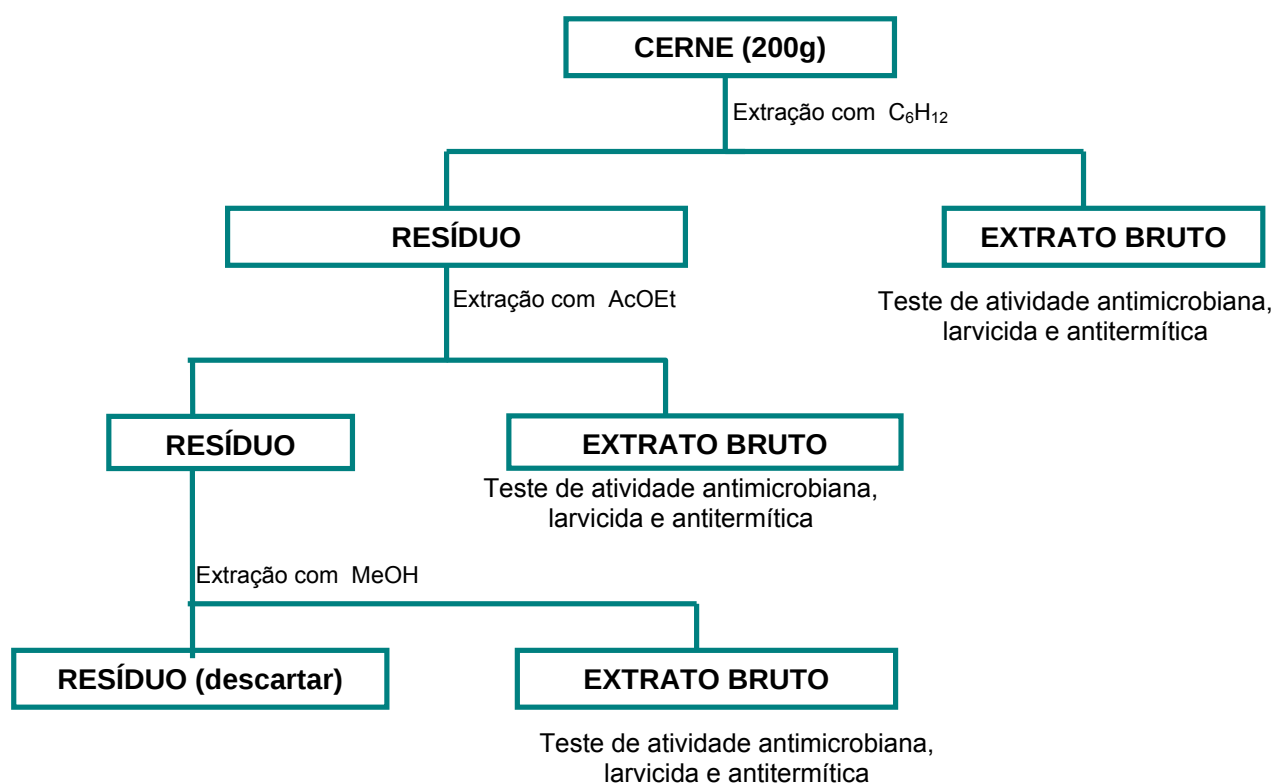


Figura 25 – Obtenção dos extratos brutos do cerne de *Hymenaea stigonocarpa*.

5.3 - Teste de atividade antimicrobiana

5.3.1 - Preparação dos inóculos

Os inóculos foram obtidos a partir de pré-cultura com 18h-24 horas de incubação à 35°C em Agar Mueller-Hinton para as bactérias e em Sabouraud para os fungos. Os microrganismos foram suspensos obtendo-se uma turbidez equivalente ao tubo 0,5 da escala de McFarland contendo aproximadamente 10⁸UFC/mL (KONEMAN, *et al.*, 1997), exceto para os fungos que foram suspensos numa solução de Tween 1%.

5.3.1.1 - Inóculos nas placas de Petri

O teste de difusão foi realizado em placas de Petri estéreis com 90mm de diâmetro, nas quais foram adicionadas os meio de cultura. O inóculo previamente padronizado foi semeado sobre o meio.

As placas semeadas pelo meio de cultura foram mantidas por 30 minutos a temperatura ambiente para que o inóculo fosse absorvido antes da colocação dos discos de papel (BAUER *et al.*, 1966). Os discos de papel estéreis, 6 mm de diâmetro, foram embebidos em extrato a ser testados e secos com ar quente antes de serem depositados na superfície do meio. As placas foram incubadas a 35°C para bactérias e 30°C para os fungos.

5.3.1.2 - Leitura e interpretação: Após a incubação as leituras foram efetuadas através da medição dos diâmetros dos halos de inibição formados em volta dos discos.

5.4 - Fungos da podridão-branca

O fungo de podridão-branca, *Phanerochaete chrysosporum*, foi inoculado em meio de Extrato de Malte Ágar (MEA) e incubado a 30°C por dez dias para crescimento.

5.4.1 - Preparação das amostras para inóculo

Foram pesadas três amostras cada uma com de 5g de madeira: sem extrativos, com extrativo e a madeira com extrativos para controle abiótico, que foram colocados em erlenmeyers de 125 mL com 1 mL de água destilada. Cada um deles foi inoculado com três blocos de madeira (± 6 mm) contendo o fungo crescido e incubado em estufa a 30°C por 30 dias para observação do crescimento.

5.5 – Teste de atividade larvicida

Os extratos C_6H_{12} , AcOEt e MeOH de *H. stigonocarpa* foram dissolvidos em DMSO (5%) e as soluções com diferentes concentrações (1000, 900, 800, 700, 600, 500, 200, 100, 50 e 10mg/L) foram preparadas com água destilada e posteriormente adicionadas sobre uma população de 20 larvas do mosquito *Aedes aegypti* em desenvolvimento larvar L4 (Figura 26), a fim de determinar a ação larvicida dos extratos. As leituras das larvas vivas foram realizadas em 24 e 48h e o grupo controle foi tratado com água destilada em DMSO (5%) (W.H.O, 1985). Os valores da DL_{50} foram calculados estatisticamente pelo Probit Analysis utilizando o software StatusPlus2006.



Figura 26 – Larvas do mosquito *Aedes aegypti*.

Fonte: <<http://www.ioc.fiocruz.br/pages/informerede/corpo/informeemail/2007/0410/dengue1.JPG>> acesso em 22/11/2008.

5.6 – Teste de atividade antitermítica

Para o teste de atividade antitermítica foi utilizado o método descrito por Kang e colaboradores (1990). O extrato C_6H_{12} (1,25; 2,5; 5,0; 10 e 20 mg) foi dissolvido em 200 μ L de clorofórmio, obtendo-se soluções de 6,25; 12,5; 25; 50 e 100 mg/mL. Em seguida, 40 μ L de cada solução foram aplicados em um disco de papel de filtro (Whatman nº 3 com 2,0 cm de diâmetro). Os extratos AcOEt e MeOH de *H. stigonocarpa* foram dissolvidos em acetona seguindo o mesmo procedimento utilizado para o extrato C_6H_{12} . Para o controle foi usado papel de filtro embebido em clorofórmio e acetona. Os discos secos, tanto o controle quanto os embebidos com os extratos foram adicionados em placas de Petri (9,0 cm de diâmetro e 2,0 cm de altura) contendo 20 térmitas da espécie *Nasutitermes corniger* (Motschulsky) (Figura 27), sendo 16 operários e 04 soldados, conforme a proporção mantida nas colônias (PAES, 1997).

A temperatura e a umidade foram controladas em torno de 27°C e 80%, respectivamente. Nas tampas das placas de Petri foi adicionado um pedaço de algodão umedecido diariamente com água destilada. O teste foi realizado em três repetições para cada concentração e o controle; as leituras dos térmitas vivos foram realizadas diariamente por sete dias e o percentual de sobrevivência foi obtido para cada concentração com média do desvio padrão. A análise estatística foi realizada no Origin 7.0, usando Student's t-test.

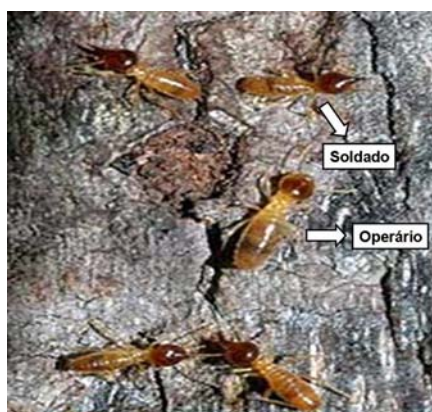


Figura 27 – Térmitas da espécie *Nasutitermes corniger* (Motschulsky).
Fonte: <www.jgi.doe.gov/News/Nasutitermes_corniger.jpg> acesso em 22/11/2008.

5.7 – Teor de Umidade de *Hymenaea stigonocarpa*

Foi pesado 1g do pó de *H. stigonocarpa* e colocado em estufa a $103 \pm 2^\circ\text{C}$ até massa constante.

Determinou-se o teor de umidade através da equação (1) (CALONEGO *et al.*, 2006):

$$U\% = \left[\frac{M_i - M_f}{M_i} \right] \times 100 \quad (1)$$

Em que:

U% - Teor de umidade da madeira em porcentagem;

M_i – Massa inicial da madeira em grama;

M_f – Massa da madeira seca em estufa a $103 \pm 2^\circ\text{C}$ em grama.

5.8 - Determinação de Lignina Insolúvel

A determinação de lignina insolúvel, ou lignina de Klason (LK), foi realizada de acordo com a metodologia da TAPPI (1999). Pesou-se 1g do pó de *H. stigonocarpa* e feita extração com cicloexano utilizando um sistema de Soxhlet por 4 horas. Em seguida, realizou-se extração com álcool etílico por mais 4 horas. A madeira sem extrativos foi transferida para um béquer de 150 mL contendo 100 mL de água destilada e deixada em banho-maria em ebulição por 3 horas. Posteriormente, a madeira foi tratada com 15 mL de H_2SO_4 72%, controlando-se a temperatura para $13^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, a partir da adição do ácido sulfúrico. O sistema foi submetido à agitação vigorosa mantendo-se a temperatura controlada a $19^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, por 2 horas. A solução ácida resultante foi diluída para 3% adicionando-se 560 mL de água destilada e mantida sob refluxo por 4 horas. Após esse período, a solução foi deixada em repouso, para sedimentar o material insolúvel (lignina), que foi filtrado e colocado para secar em estufa a $105^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ até peso constante. A lignina seca foi transferida para dessecador e posteriormente pesada.

A quantificação da lignina insolúvel foi determinada usando-se a equação (2) abaixo:

$$L_i\% = \left[\frac{M_{ig}}{M_f} \right] \times 100 \quad (2)$$

Onde:

$L_i\%$ - Percentual de lignina insolúvel na madeira em porcentagem;

M_{ig} — Massa de lignina insolúvel seca em grama;

M_f — Massa da madeira seca em grama.

5.9 - Análise Quantitativa de Lignina Solúvel

Partiu-se de 300mg de madeira sem extrativos, adicionando-se 3 mL de H_2SO_4 75% mantendo-se sob agitação por 1 minuto. O material foi submetido a banho-maria por 60 minutos a $\pm 30^\circ C$. Em seguida foi colocado em erlenmeyer de 250 mL e diluído a 4% pela adição de 84 mL de água deionizada. Foi autoclavado a $121^\circ C$ durante 30 minutos. Posteriormente, foi filtrado e sua absorbância (280nm) registrada em um espectrofotômetro UV/visível Hewlett Packard - HP-8453E.

O cálculo da lignina solúvel foi determinado através das equações (3) e (4) que relacionam a medida da absorbância a 280 nm (ASTM METHODS, 1956).

$$C_{LS} = (A_{bs\ 280\ nm} - b) / a \quad (3)$$

$$L_s\% = \left[\frac{C_{LS}}{M_i} \right] \times 100 \quad (4)$$

Em que:

C_{LS} — Concentração de lignina solúvel em $g.L^{-1}$;

$A_{bs\ 280\ nm}$ — Absorbância da amostra a 280nm;

b — coeficiente linear da reta;

a — Absortividade da lignina em $L.g^{-1}$;

$L_s\%$ - Percentual de lignina solúvel nas amostras;

M_i — Massa inicial da madeira em grama.

5.10- Determinação de Fenóis Totais

Foi pesado 1g da amostra, adicionou-se 30 mL de MeOH/H₂O (8:2 v/v). A mistura foi deixada em repouso por 24 horas em ambiente escuro. Filtrou-se o extrato e reduziu-se seu volume em rotaevaporador até a eliminação de todo o metanol. Em seguida, separou-se uma alíquota de 50 µL do extrato e adicionou-se 25 mL de água destilada, retirou-se uma alíquota de 500µL dessa nova solução para um tubo de ensaio. A este tubo foram adicionados 2,5mL do reagente de Folin-Ciocalteau 10% e 2,0 mL de Na₂CO₃ 7,5%. O teste branco consistiu em 2,5 mL de Folin-Ciocalteau 10% e 2,0 mL de Na₂CO₃ a 7,5% com 500µL de água destilada.

Os tubos de ensaio foram submetidos a banho-maria a 50°C por 5 min. A amostra foi analisada imediatamente após o aquecimento em um espectrofotômetro UV/visível Hewlett Packard - HP-8453E, para a leitura da absorbância a 760 nm. A concentração de fenóis totais foi avaliada através de uma curva padrão de ácido gálico nas concentrações de 0,78; 1,56; 3,125; 6,25; 12,5; 25 e 50 µg/mL. A concentração de fenóis totais foi determinada através da equação da reta, equação 5, obtida da curva padrão do ácido gálico (WATERMAN & SIMON, 1994).

$$X = \frac{y - B}{A} \quad (5)$$

Onde:

X - Concentração de compostos fenólicos em µg/mL;

y – Absorbância das amostras a 760nm;

B – Coeficiente linear

A – Coeficiente angular da reta.

5.11 - Fracionamento do extrato C₆H₁₂ de *Hymenaea stigonocarpa*

O extrato em C₆H₁₂ foi submetido a fracionamento em coluna cromatográfica de sílica gel 60 (70-230 mesh), utilizando sistema de eluição C₆H₁₂:AcOEt com

gradiente de polaridade (9:1 → 0:1). As frações obtidas foram analisadas por cromatografia em camada delgada, utilizando C₆H₁₂:AcOEt (4:1 → 0:1) como eluente, reveladas com iodo (I₂) e identificadas por espectroscopia de massas acoplada ao cromatógrafo gasoso.

5.12 – Fracionamento do extrato AcOEt de *Hymenaea stigonocarpa*

O extrato em AcOEt (11,8g) foi pré-fracionado em coluna de sílica gel 60 (70-230 mesh), utilizando diferentes polaridades: C₆H₁₂:AcOEt (4:1 → 1:1), AcOEt e AcOEt:MeOH (1:1).

As frações HS-1 à HS-7 provenientes do fracionamento C₆H₁₂ : AcOEt (4:1 → 1:1) foram submetidas a cromatografia CG-MS. As frações HS-8 à HS-13 foram fracionadas em coluna cromatográfica de sílica gel 60 G (70-230 mesh) utilizando o sistema CH₂Cl₂:MeOH (5% - 100%), exceto a fração HS-11. E a fração HS-14 foi fracionada em coluna cromatográfica de Sephadex LH-20 utilizando MeOH como eluente. As frações HS-15 e HS-16 provenientes do fracionamento AcOEt foram fracionadas em coluna cromatográfica de Sephadex LH-20 utilizando AcOEt:MeOH e MeOH, respectivamente como eluentes (Figura 28).

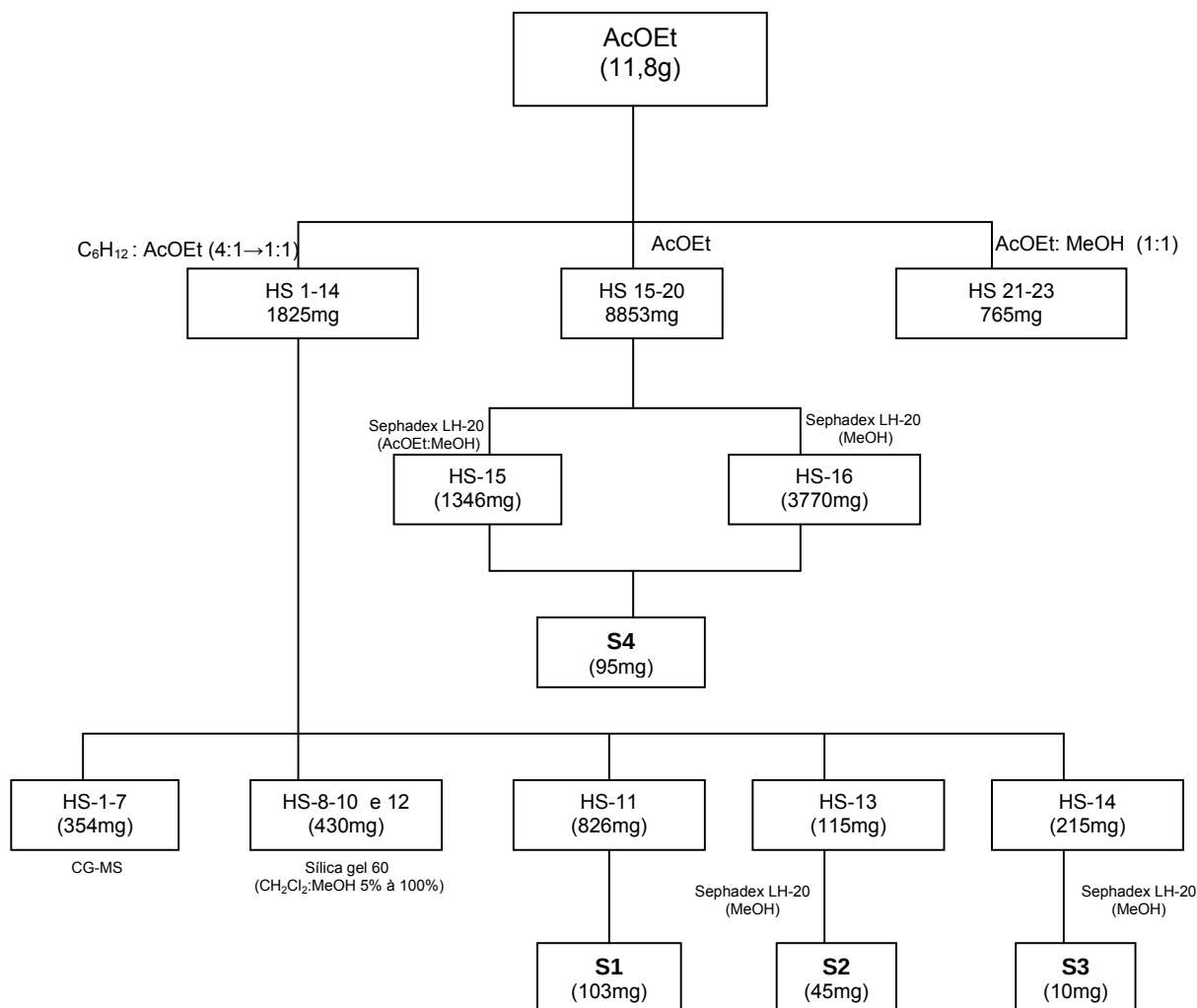


Figura 28 – Fracionamento do extrato AcOEt do cerne de *H. stigonocarpa*.

As frações resultantes da purificação foram analisadas por cromatografia em camada delgada, utilizando como sistema de eluição C_6H_{12} :AcOEt (1:1 → 0:1); CH_2Cl_2 :MeOH (4:1 → 1:1) e reveladas com iodo (I_2) e anisaldeído. E também analisadas por cromatografia líquida em alta performance (HPLC), utilizando a metodologia descrita por Tao e colaboradores (2006). As demais frações foram armazenadas.

Os compostos isolados foram cristalizados em acetona/clorofórmio a quente e as substâncias puras foram identificadas por métodos espectroscópicos e seus

pontos de fusão determinados em aparelho digital MQAPF-301 Microquímica Indústria e Comércio.

5.13 - Métodos espectroscópicos

A análise estrutural das substâncias puras foi realizada por métodos espectroscópicos: RMN de ^1H e ^{13}C . Os espectros de RMN de ^1H foram realizados a 300MHz e os de RMN de ^{13}C a 75MHz - Varian Unity Plus.

O espectrofotômetro UV/visível Hewlett Packard - HP-8453E foi utilizado para determinação de fenóis totais.

6 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 – Abordagem fitoquímica

A abordagem fitoquímica do cerne de *H. stigonocarpa* revelou a presença significativa de flavonóides, esteróides e terpenos, conforme resultados apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Resultados da abordagem fitoquímica do cerne de *H. stigonocarpa*.

Classes de substâncias	Testes	Resultados
Alcalóides	Dragendorff, Mayer	-
Esteróides e Terpenos	Liebermann-Buchard	Positivo
Taninos	Cloreto férrico	-
Saponinas	Espuma	-
Flavonóides	Shinoda, oxalo-bórica	Positivo

Estes resultados condizem com os obtidos em outras espécies de *Hymenaea* estudadas e citadas na literatura. Imai e colaboradores (2008) isolaram flavonóides do cerne de *H. coubaril*. Nogueira e colaboradores (2001) isolaram das sementes de *H. courbaril* terpenos e das folhas desta mesma espécie Abdel-Kader e colaboradores (2002) isolaram terpenos. Pettit e colaboradores (2003) isolaram das folhas de *H. palustris* flavonóides. E das folhas de *H. stigonocarpa* também foram isolados terpenos (LANGENHEIM *et al.*, 1986).

6.2 - Rendimento do processo de obtenção dos extratos brutos de *Hymenaea stigonocarpa*

Partindo-se de 200g de cerne com extrações consecutivas para cada solvente (3 repetições), obteve-se seguintes rendimentos relativos dos extrativos:

Tabela 5 - Resultado dos rendimentos dos extratos brutos de *Hymenaea stigonocarpa*.

Extrato bruto	Rendimento dos extrativos (%)
C ₆ H ₁₂	0,25
AcOEt	12,7
MeOH	11,9

Os dados da Tabela 5 indicam que o extrato AcOEt extraiu mais constituintes químicos comparados com demais extratos.

6.3 – Fracionamento e identificação dos constituintes químicos do extrato cicloexano.

O extrato em C₆H₁₂ (300mg) foi submetido a fracionamento em coluna cromatográfica de sílica gel 60 (70-230 mesh), utilizando-se o sistema de eluição C₆H₁₂:AcOEt que variava em gradiente de polaridade (9:1 → 0:1). Obteve-se 8 frações que foram analisadas por cromatografia em camada delgada, utilizando C₆H₁₂:AcOEt (4:1 → 0:1), reveladas com iodo (I₂). As frações foram analisadas em CG-MS.

Da fração 2 (16mg), cujo sistema de eluição foi C₆H₁₂:AcOEt (9:1), obteve-se duas substâncias que denominaram-se de HS-C1 e HS-C2.

Da fração 3 (59mg) com mesmo sistema de eluição, obteve-se a substância denominada de HS-C3. E da fração 4 (14mg) obteve-se a substância HS-C4, no mesmo sistema de eluição.

As substâncias denominadas HS-C1, HS-C2, HS-C3 e HS-C4, no espectro de massas, apresentavam quebras consecutivas de m/z 14 correspondente a fragmentação [CH₂]⁺, típicas de moléculas alifáticas de cadeia longa.

As demais frações quando comparadas com compostos do banco de dados da biblioteca WILEY 229.LIB, forneceu espectros com baixa similaridade, e portanto não confiáveis.

6.3.1 - Identificação da substância HS-C1

Os fragmentos mais importantes para elucidação estrutural da substância HS-C1 estão descritos na Tabela 6. Já o espectro de massas desta substância pode ser observado na Figura 29.

Tabela 6 – Principais fragmentos no espectro de massas da substância HS-C1.

Massas	Fragmento	Intensidade relativa (%)
256	[C ₁₆ H ₃₂ O ₂] ⁺	5,8
213	[C ₁₃ H ₂₅ O ₂] ⁺	7,5
185	[C ₁₁ H ₂₁ O ₂] ⁺	7,2
157	[C ₉ H ₁₇ O ₂] ⁺	8,3
129	[C ₇ H ₁₃ O ₂] ⁺	20,6
97	[C ₆ H ₉ O] ⁺	15,0
85	[C ₆ H ₁₃] ⁺	21,7
73	[C ₃ H ₅ O ₂] ⁺	69,4
60	[C ₂ H ₄ O ₂] ⁺	59,4
57	[C ₄ H ₉] ⁺	58,6
45	[CHO ₂] ⁺	9,9
43	[C ₃ H ₇] ⁺	100

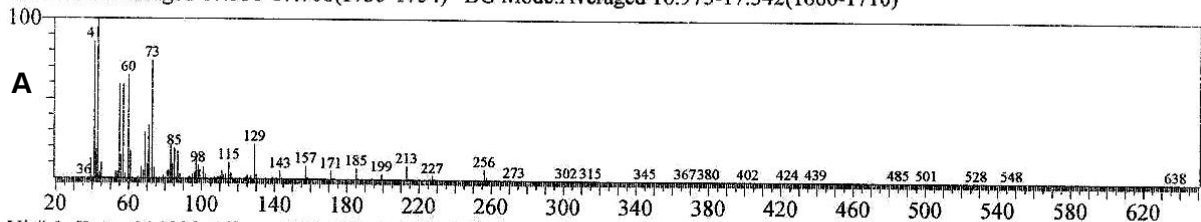
A substância HS-C1 apresenta o pico do íon molecular em $m/z = 256$ e o pico base em $m/z = 43$. Tais valores foram comparados com dados da biblioteca de espectros WILEY 229.LIB, o qual apresentou índice de similaridade (IS) de 95% em relação ao espectro do ácido palmítico (hexadecanóico), cuja fórmula molecular é C₁₆H₃₂O₂. Na Figura 29 tem-se a comparação entre os espectros.

GCMS Library

<< Target >>

Line#:1 R.Time:17.675(Scan#:1750) MassPeaks:292 BasePeak:43.05(4231311)

RawMode:Averaged 17.550-17.708(1735-1754) BG Mode:Averaged 16.975-17.342(1666-1710)



Hit#:1 Entry:114038 Library:WILEY229.LIB SI:95 Formula:C16 H32 O2 CAS:57-10-3 MolWeight:256

CompName:Hexadecanoic acid (CAS) Palmitic acid \$\$ Palmitinic acid \$\$ n-Hexadecoic acid \$\$ n-Hexadecanoic acid \$\$ Pentadecanoic acid

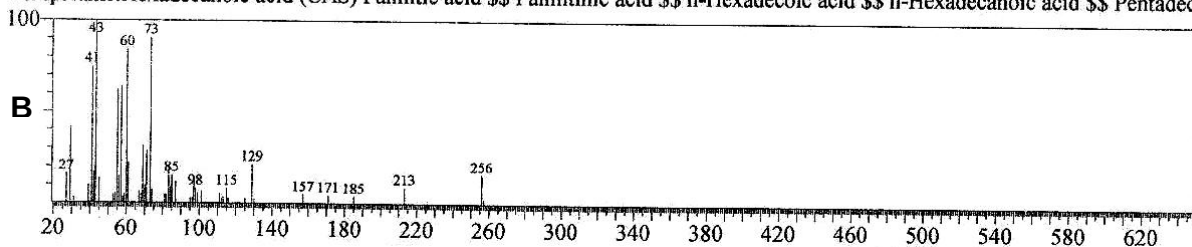


Figura 29 – Comparação entre os espectros de massas do composto HS-C1 (A) e o composto da biblioteca (B).

O pico $m/z = 43$, $[C_3H_7]^+$, resultante da quebra da ligação C-C, com retenção de carga pelo fragmento alquila. Picos característicos de sucessivas quebras $[CH_2]^+$ $m/z = 14$, como o pico $m/z = 57$ $[C_4H_9]^+$. Uma clivagem α à carbonila elimina a cadeia alquila originando o pico em $m/z = 45$. O pico em $m/z = 60$ é resultante de rearranjo de McLafferty para os ácidos (Figura 30).

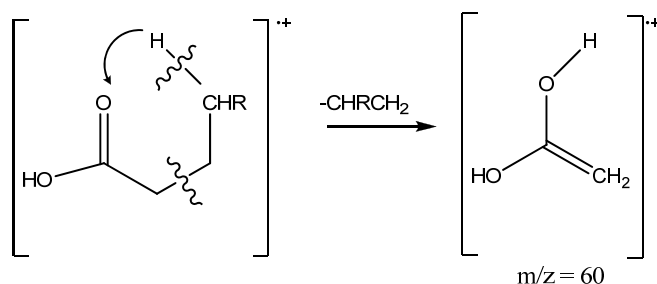


Figura 30 – Rearranjo de McLafferty.

O pico em $m/z = 85$ representa o fragmento alquila $[C_6H_{13}]^+$ e o $m/z = 97$ é originado da perda de uma molécula de H_2O do fragmento em $m/z = 115$. Os picos em $m/z = 213, 199, 185, 157, 129$ formam uma sequência de fragmentação caracterizada por aglomerados de picos afastados a perdas sucessivas de unidade CH_2 . Na Figura 31 observa-se alguns fragmentos da substância HS-C1.

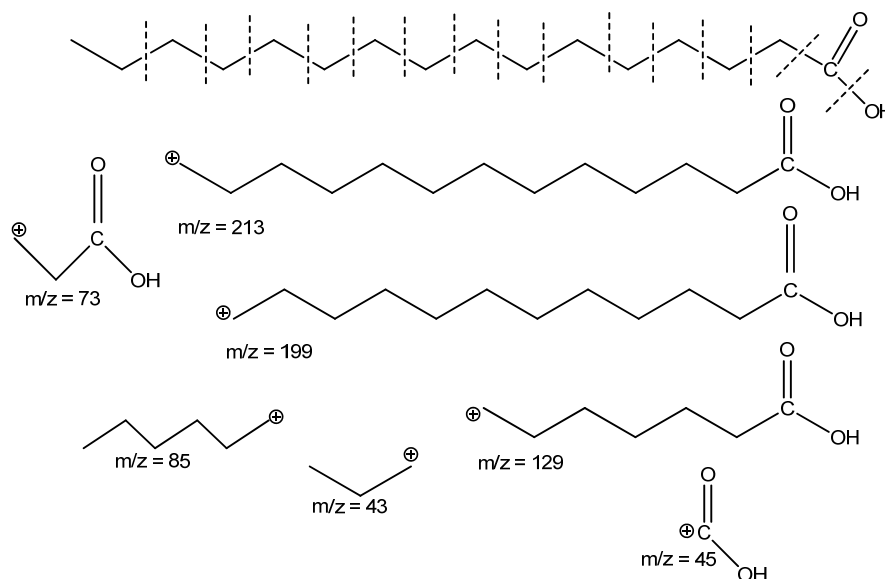


Figura 31 – Alguns fragmentos do composto HS-C1

Com estes resultados foi possível identificar a substância HS-C1 como sendo o ácido hexadecanóico ou ácido palmítico (Figura 32).

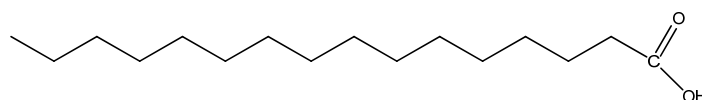


Figura 32 – Estrutura do ácido palmítico

6.3.2 – Identificação do composto HS-C2

O espectro de massas da substância HS-C2 apresenta pico base em $m/z = 41$, os fragmentos e suas respectivas massas (Tabela 7) foram comparados com o da biblioteca de espectros WILEY 229.LIB (Figura 33) e por similaridade de 92%, constatou-se que correspondia ao ácido oléico ou ácido 9-octadecenóico, cuja fórmula molecular é $C_{18}H_{34}O_2$.

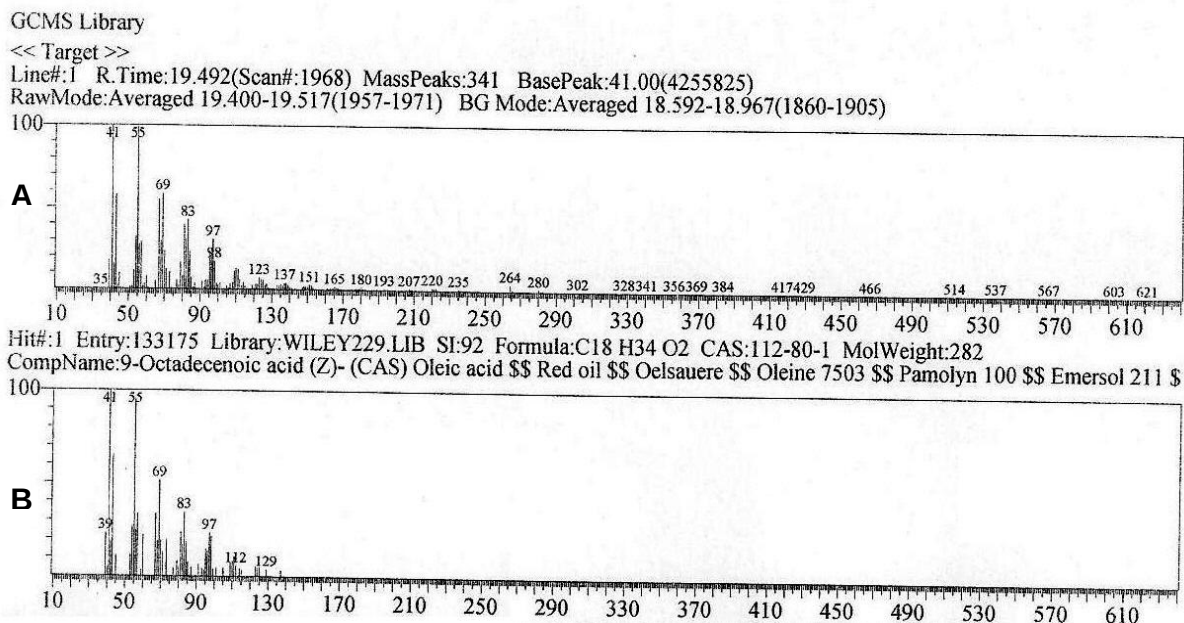


Figura 33 - Comparação entre os espectros de massas do composto HS-C2 (A) e o composto da biblioteca (B).

Tabela 7 - Principais fragmentos no espectro de massas da substância HS-C2.

Massas	Fragmentação	Intensidade relativa(%)
282	$[C_{18}H_{34}O_2]^+$	3,7
264	$[C_{18}H_{32}O]^+$	9,0
111	$[C_8H_{15}]^+$	11,8
97	$[C_7H_{13}]^+$	29,2
83	$[C_6H_{11}]^+$	40,8
69	$[C_5H_9]^+$	58,3
55	$[C_4H_7]^+$	95,7
41	$[C_3H_5]^+$	100

Nos espectros de massas da Figura 33, observa-se que o pico do íon molecular não está visível, a sua intensidade relativa é pequena em comparação aos demais. O pico do íon molecular dos ácidos monocarboxílicos lineares é pouco intenso (SILVERSTEIN, *et al.*, 2006).

Os picos em $m/z = 41, 55, 69, 83, 97$ e 111 correspondem à fórmula C_nH_{2n-1} com $n = 3, 4, 5, 6, 7$ e 8 , respectivamente. Observou-se picos em intervalos de 14 unidades. O pico em $m/z = 264$ é originado da perda de uma molécula de H_2O do pico em $m/z = 282$. Na Figura 34 observa-se alguns fragmentos do composto HS-C2.

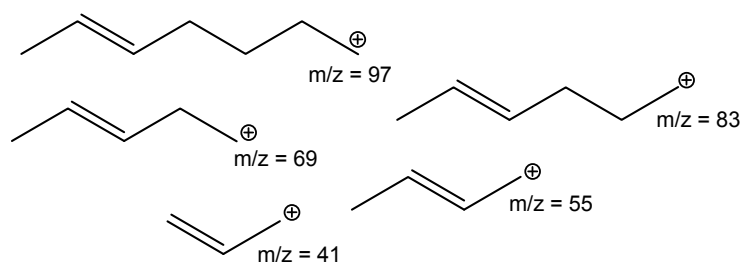


Figura 34 - Alguns fragmentos do composto HS-C2.

Na Figura 35 tem-se a estrutura do composto HS-C2, ácido oléico.

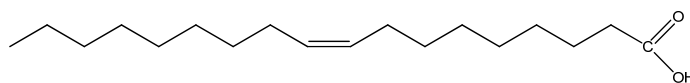


Figura 35 - Estrutura do ácido oléico

6.3.3 – Identificação da substância HS-C3

O espectro de massas da substância HS-C3 foi comparado com os da biblioteca WILEY 229.LIB, apresentando o pico em $m/z = 228$ do íon molecular, mesmo em baixa intensidade, e o pico base em $m/z = 41$ (Figura 36) característico de uma fragmentação $[C_3H_5]^+$.

GCMS Library

<< Target >>

Line#:1 R.Time:15.375(Scan#:1474) MassPeaks:232 BasePeak:41.00(287132)

RawMode:Averaged 15.342-15.467(1470-1485) BG Mode:Averaged 14.892-15.150(1416-1447)

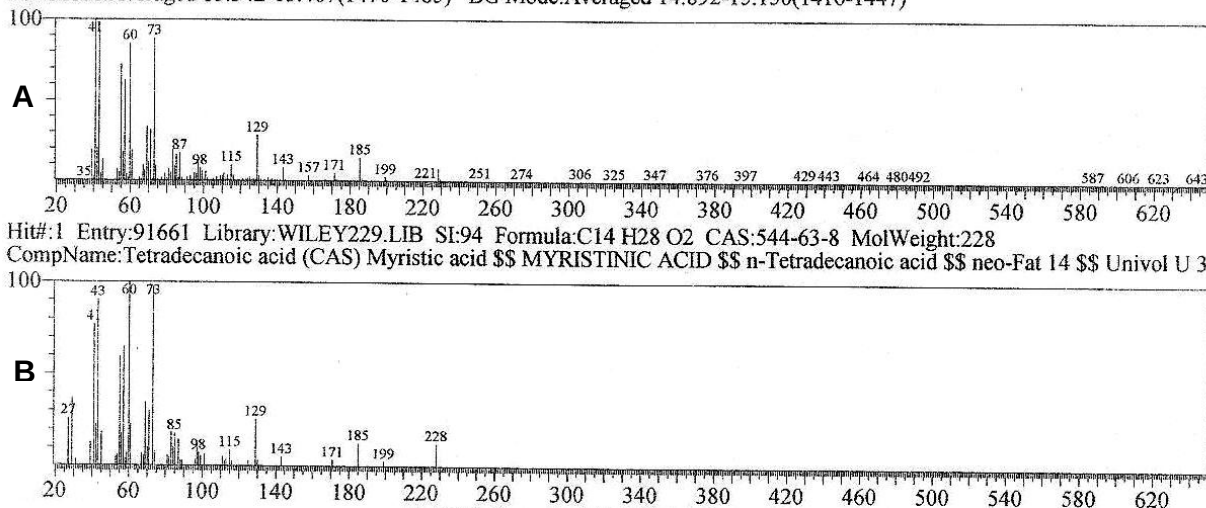


Figura 36 – Espectro de massas da substância HS-C3 (A) e o espectro de massas da biblioteca (B).

O pico em $m/z = 60$ é resultante de rearranjo de McLafferty e $m/z = 73$ é representado por um fragmento contendo oxigênio, $[C_3H_5O_2]^+$. O pico com $m/z = 97$ é característico da perda de uma molécula de H_2O do fragmento em $m/z = 115$. Os picos em $m/z = 185, 171, 129, 115$ formam uma sequência de fragmentação caracterizada por perdas sucessivas de $[CH_2]^+$. A substância HS-C3 possui fragmentações semelhantes as fragmentações do ácido palmítico.

Estes fragmentos (Tabela 8) obtidos da substância HS-C3 foram submetidos a comparação com os espectros de massas da biblioteca WILEY 229.LIB e por similaridade de 94%, constatou-se que correspondia ao ácido mirístico (Figura 37) ou ácido tetradecanóico, cuja fórmula molecular é $C_{14}H_{28}O_2$.

Tabela 8 - Principais fragmentos no espectro de massas da substância HS-C3.

Massas	Fragmentos	Intensidade relativa(%)
228	$[C_{14}H_{28}O_2]^+$	6,8
185	$[C_{11}H_{21}O_2]^+$	13,1
171	$[C_{10}H_{19}O_2]^+$	4,4
129	$[C_7H_{13}O_2]^+$	25,7
115	$[C_6H_{11}O_2]^+$	9,2
97	$[C_6H_9O]^+$	12,1
73	$[C_3H_5O_2]^+$	81,1
60	$[C_2H_4O_2]^+$	77,0
41	$[C_3H_5]^+$	100

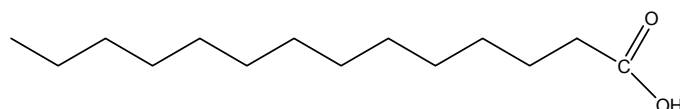


Figura 37 – Estrutura do ácido mirístico

6.3.4 – Identificação da substância HS-C4

O espectro de massas da substância HS-C4 foi comparado com os espectros de massas da biblioteca WILEY 229.LIB e por similaridade de 92%, constatou-se que se tratava do ácido linoléico, cuja fórmula molecular é $C_{18}H_{32}O_2$. Na Figura 38 tem-se a comparação dos espectros de massas do HS-C4 e o da biblioteca.

GCMS Library

<< Target >>

Line#:1 R.Time:19.392(Scan#:1956) MassPeaks:365 BasePeak:67.10(606273)

RawMode:Averaged 19.308-19.550(1946-1975) BG Mode:Averaged 18.250-18.717(1819-1875)

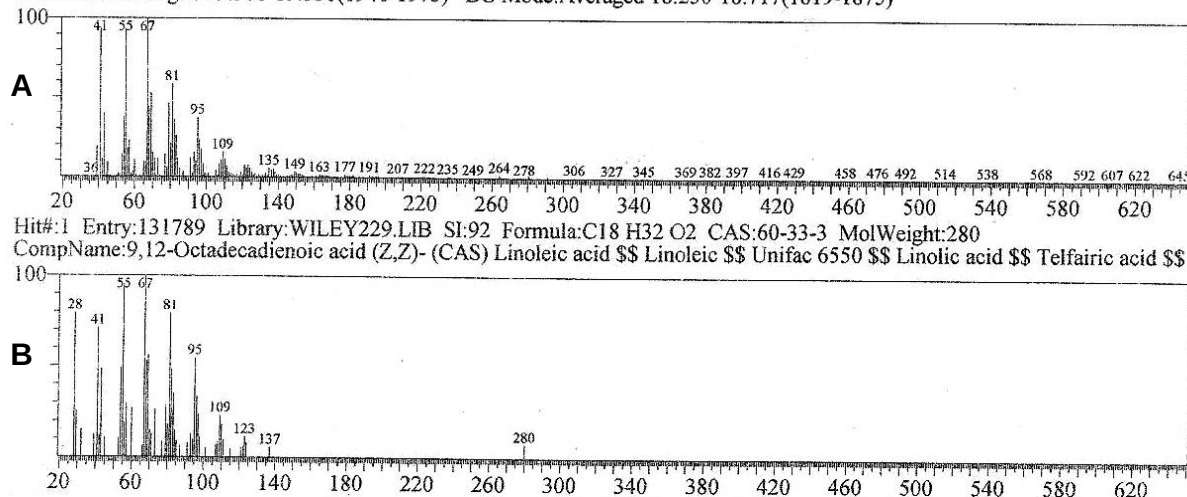


Figura 38 – Espectro de massas do composto HS-C4 (A) com o espectro da biblioteca (B)

Na Tabela 9 estão descritos os principais fragmentos e massas da substância HS-C4.

Tabela 9 – Principais fragmentos do espectro de massas da substância HS-C4

Massas	Fragmentos	Intensidade relativa (%)
280	$[C_{18}H_{32}O_2]^+$	2,3
137	$[C_{10}H_{17}]^+$	4,2
123	$[C_9H_{15}]^+$	7,2
109	$[C_8H_{13}]^+$	13,6
95	$[C_7H_{11}]^+$	29,6
81	$[C_6H_9]^+$	52,7
67	$[C_5H_7]^+$	81,9
55	$[C_4H_7]^+$	100
41	$[C_3H_5]^+$	98,0

Os picos em $m/z = 41$, 55 correspondem à fórmula C_nH_{2n-1} com $n = 3$ e 4 , respectivamente. O pico base em $m/z = 55$. O pico em $m/z = 67$ é característico de fragmento resultante de clivagem alílica. Os picos em $m/z = 81$, 95 , 109 , 123 , 137

seguem uma sequência de fragmentação, caracterizada por aglomerados de picos afastados uns dos outros por 14 unidades de massa (CH_2). O pico em $m/z = 280$ é o pico do íon molecular que possui baixa intensidade. Na Figura 39 tem-se alguns fragmentos da substância HS-C4. E na Figura 40, a estrutura da substância HS-C4, o ácido linoléico.

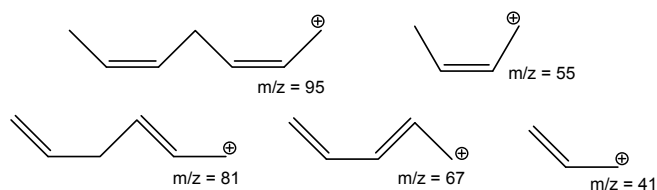


Figura 39 - Alguns fragmentos do composto HS-C4.

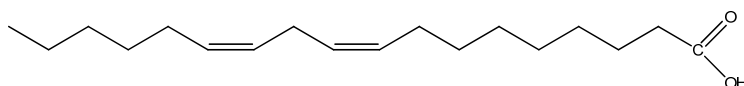


Figura 40 - Estrutura do ácido linoléico

É sabido que as plantas possuem ácidos graxos em sua composição, fazendo parte de suas estruturas celulares (RAMSEWAK *et al.*, 2001). Isto justifica a presença destas substâncias na análise fitoquímica da espécie estudada. Entretanto, para a confirmação da presença dos ácidos graxos aqui identificados, se faz necessário calcular o índice de KOVATS.

6.4 - Fracionamento e identificação dos constituintes químicos do extrato acetato de etila

Do fracionamento do extrato em AcOEt realizado por cromatografia em coluna de sílica gel 60 G (70-230mesh) obteve-se três frações principais que foram submetidas a análise cromatográficas como descrito na Figura 28.

As frações HS-1 à HS-7 provenientes do fracionamento C_6H_{12} : AcOEt (4:1 → 1:1) apresentaram-se com características oleosas e foram submetidas a cromatografia CG-MS, porém não puderam ser identificadas quando comparadas com compostos do banco de dados da biblioteca WILEY 229.LIB, pois forneceram espectros com baixa similaridade, e portanto, não confiáveis.

As frações HS-8, HS-9, HS-10 e HS-12 cromatograficamente idênticas foram reunidas e fracionadas em coluna cromatográfica de sílica gel 60 G utilizando o sistema CH_2Cl_2 :MeOH (5% → 100%). Elas apresentaram-se como uma mistura e tentativas de cristalização com estas frações foram conduzidas em clorofórmio:acetona (3:2). Obteve-se como constituinte principal a substância S1. As demais frações foram armazenadas.

A fração HS-11, após recristalização, apresentou-se pura e foi submetida à análises espectroscópicas de 1H -RMN e ^{13}C -RMN para identificação estrutural da substância S1.

As frações HS-13 e HS-14, cromatograficamente idênticas, foram submetidas a cromatografia em Sephadex LH-20 utilizando MeOH como eluente, obtendo-se assim duas substâncias puras, S2 e S3. Ambas apresentaram-se como cristais amarelos e foram identificadas estruturalmente por métodos espectroscópicos.

As frações HS-15 e HS-16 provenientes do fracionamento AcOEt foram fracionadas em coluna cromatográfica de Sephadex LH-20 utilizando como eluentes AcOEt:MeOH e MeOH, respectivamente. Observou-se a presença de um constituinte químico comum as duas frações, cristais amarelos, que foi nomeado como S4 e submetido a identificação estrutural.

6.5 - Análise espectrométrica das substâncias isoladas

6.5.1 – Identificação da substância S1

A identificação estrutural desta substância foi realizada por RMN de ^1H (Figura 41 e 42) e ^{13}C . Os resultados das análises espectroscópicas de RMN de ^1H da substância S1 estão descritos na Tabela 10.

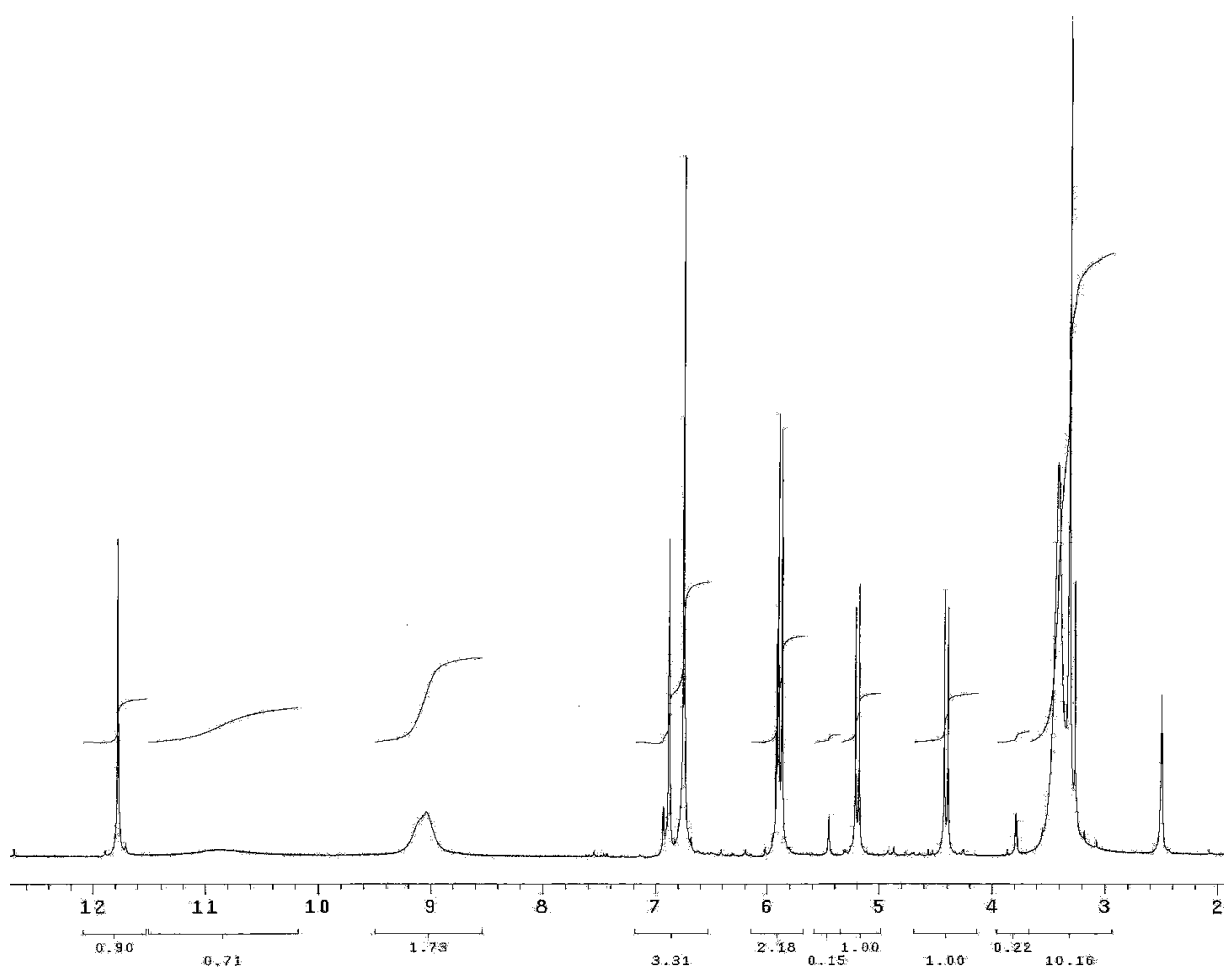


Figura 41 – Espectro de RMN de ^1H da substância S1 em DMSO-d_6 .

No espectro RMN de ^1H pode ser identificado os sinais δ_{H} 5,86 e 5,90 que indicam a presença de dois hidrogênios (dois dupletos) característicos de hidrogênios em anel aromático e que acoplam entre si em posição meta com uma constante de acoplamento $^4J = 2,1 \text{ Hz}$ (Figura 42), indicando um sistema de AB de sinais.

A presença de um segundo anel aromático fica evidenciado pela presença de um sinal em δ_H 6,75, cuja integração corresponde a dois hidrogênios aromáticos e de um sinpleto em δ_H 6,90 correspondente a 1 hidrogênio. Os valores das constantes de acoplamento destes prótons não puderam ser medidos devido a baixa resolução do espectro RMN de 1H .

Através da integração, está bem caracterizada a presença de quatro hidroxilas fenólicas em δ_H 9,04 – 10,8, assim como um sinpleto em δ_H 11,8 bem característico de hidroxila fazendo ligação de hidrogênio com uma carbonila (Figura 43).

O sinal δ_H 3,31 na região de baixa frequência são característicos de prótons de metoxila, com a integração para 3 hidrogênios. Os sinais em δ_H 4,40 (d) e 5,20 (d) são característicos de hidrogênios não aromáticos e que acoplam entre si com uma constante de acoplamento $^3J = 9,9\text{Hz}$ (Figura 42), indicando uma configuração *trans*.

Os prótons não aromáticos e suas constantes de acoplamento (Tabela 10) sugeriram que a substância S1 possui além dos dois anéis aromáticos, um terceiro anel não aromático substituído. Os dados sugeriram que a substância S1 tratava-se de um flavonóide.

Tabela 10 – Deslocamento químico (δ) em ppm e constante de acoplamento (J) em Hz do composto S1 em DMSO- d_6 .

Prótons (n^0)	δ (ppm)	J (Hz)
3OCH ₃	3,31 (s)	-
1H	4,40 (d)	$^3J = 9,9$
1H	5,20 (d)	$^3J = 9,9$
1H	5,86 (d)	$^4J = 2,1$
1H	5,90(d)	$^4J = 2,1$
2 H	6,75	
1 H	6,90 (s)	
2 OH	9,04	
2 OH	10,8	
1 OH	11,8 (s)	

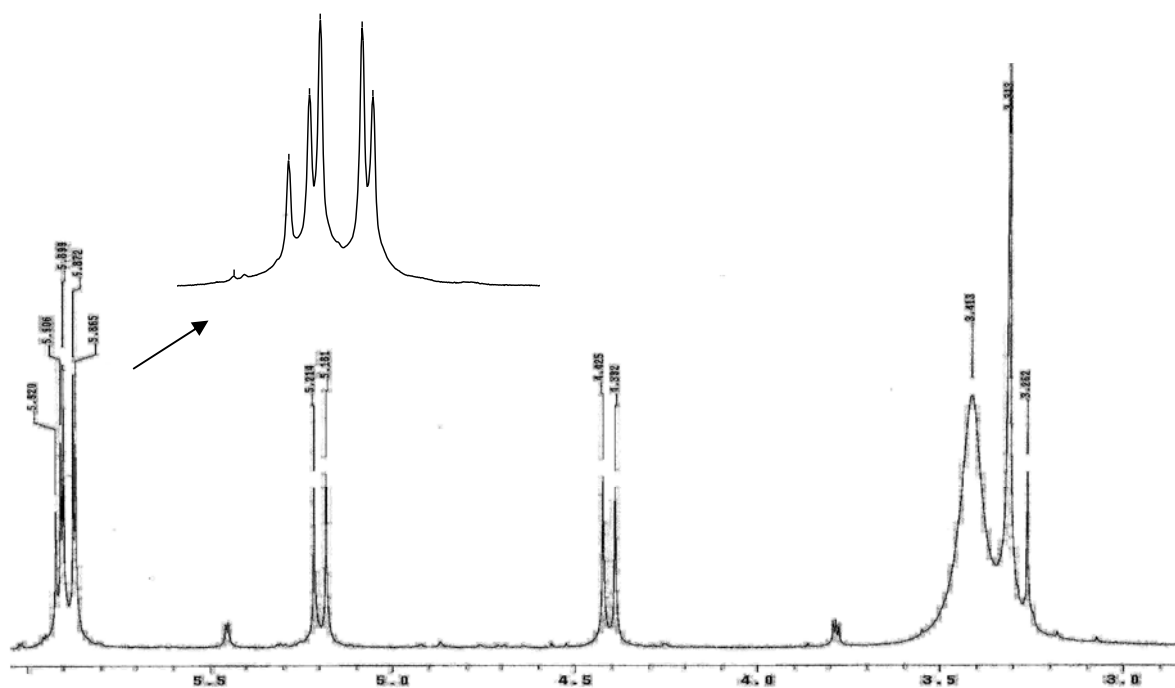


Figura 42 – Expansão do espectro de RMN de ^1H da substância S1 em DMSO-d_6 .

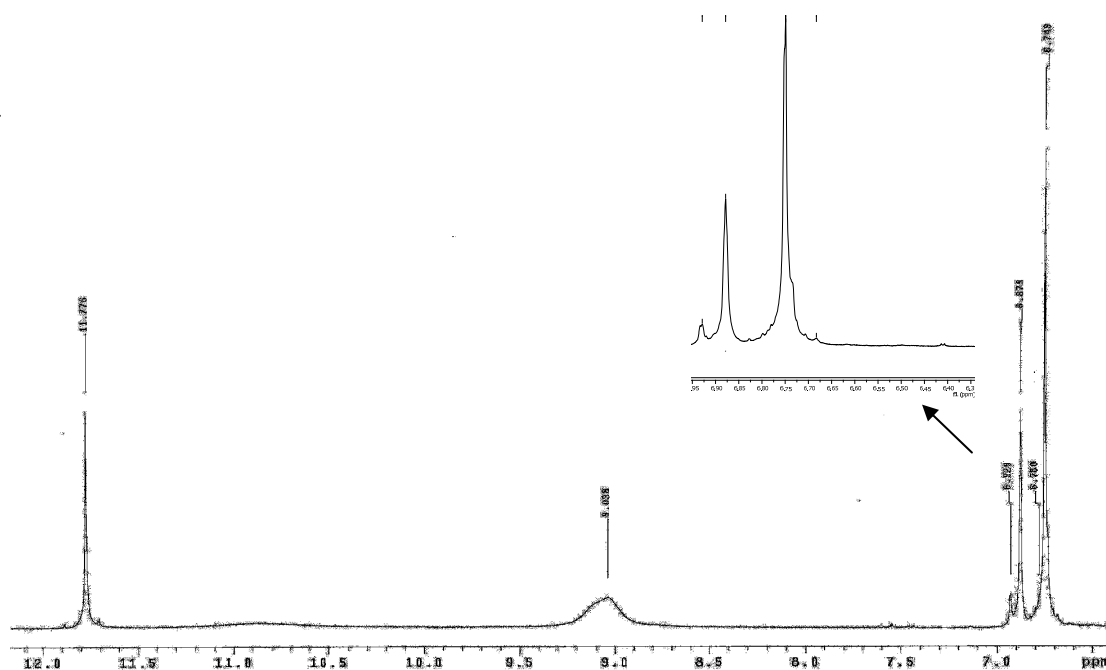


Figura 43 – Expansão do espectro de RMN de ^1H da substância S1 em DMSO-d_6 .

Foi feita uma comparação com os dados de RMN de ^1H da substância S1 com da taxifolina (KUO *et al.*, 1998). Na Tabela 11 podem ser observados os resultados dos espectros de RMN de ^1H .

Tabela 11 – Comparação dos espectros de RMN de ^1H da substância S1 com a taxifolina.

Próton	Taxifolina* (acetona- d_6) δ (ppm) e J (Hz)	S1 (DMSO- d_6) δ (ppm) e J (Hz)
H-2	5,03(d) $^3J=11,4$	5,20(d) $^3J=9,9$
H-3	4,63(d) $^3J=11,4$	4,40(d) $^3J=9,9$
H-6	5,94(d) $^4J=0,8$	5,86(d) $^4J=2,1$
H-8	5,98(d) $^4J=0,8$	5,90(d) $^4J=2,1$
H-2'	7,06(d) $^4J=1,9$	6,90 (s)
H-5'	6,82(d) $^3J=8,1$	6,75
H-6'	6,89(dd) $^3J=8,1$ e $^4J=1,9$	6,75
5-OH	11,69(s)	11,8(s); 10,8; 9,04
OCH ₃	-	3,31(s)

* Kuo *et al*, 1998.

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 44) permitiu identificar um total de 16 sinais, os quais foram atribuídos, de acordo com as informações do espectro DEPT 135°(Figura 45), a presença de 8 carbonos quaternários, 7 carbonos metínicos e 1 carbono metílico.

Os dados de RMN de ^1H associados aos sinais presentes no espectro de RMN de ^{13}C em δ_{C} 196,0, indicativo de uma carbonila (C-4) e na região de δ_{C} 96,1 - 95,1 (C-6 e C-8), permitiram identificar esta substância como sendo uma flavanona com substituintes OH nas posições 5 e 7 do anel aromático (Figura 46) (HARBONE & MABRY, 1982).

A comparação dos dados de RMN de ^{13}C de S1 com os citados na literatura para a substância taxifolina encontram-se na Tabela 12.

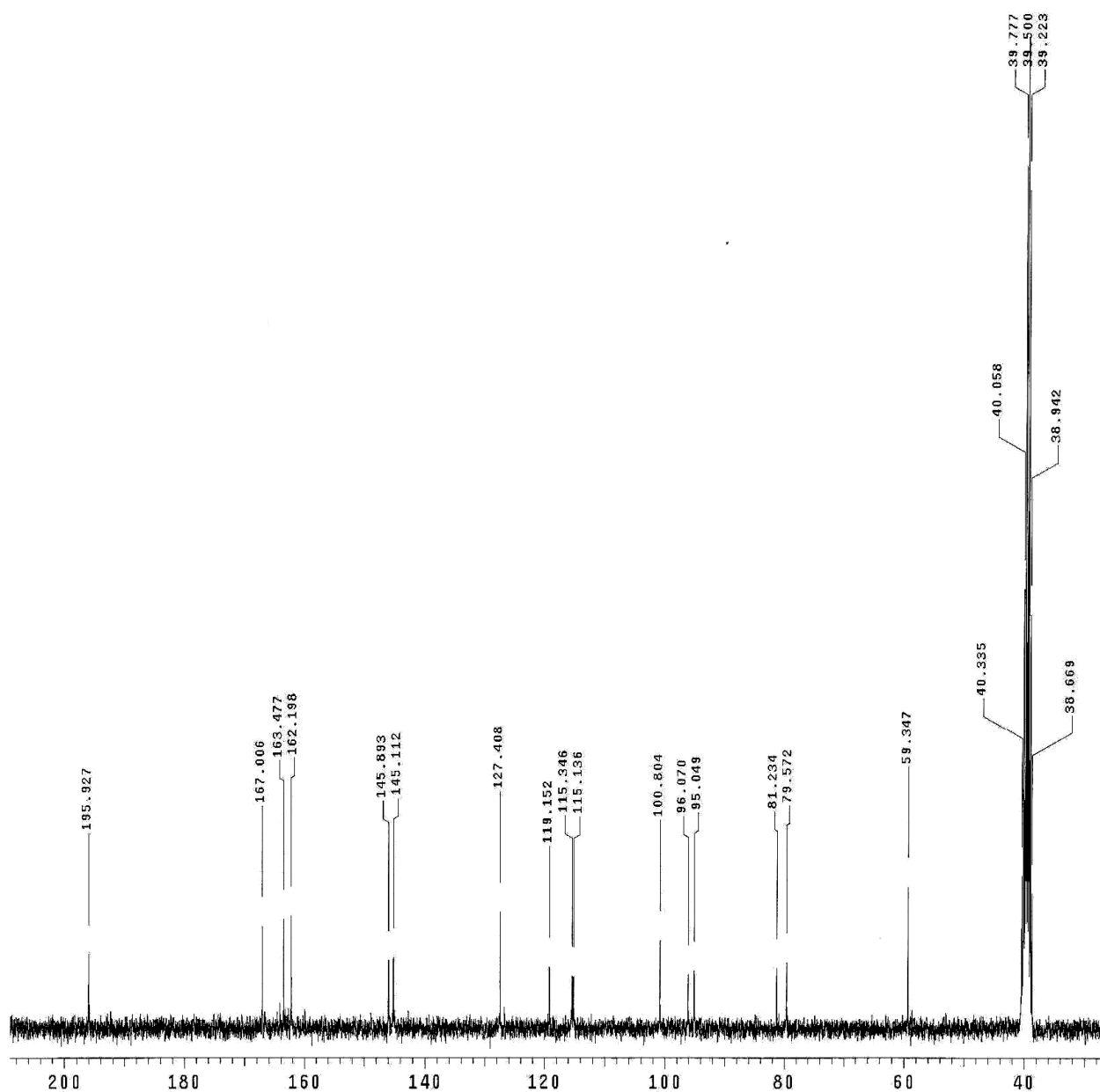


Figura 44 – Espectro de RMN de ^{13}C da substância S1 em DMSO-d_6 .

Width 16501.7 Hz
160 repetitions
OBSERVE C13, 75.4237218 MHz
DECOUPLE H1, 299.9548659 MHz
Power 35 dB
on during acquisition
off during delay
WALTZ-16 modulated
DATA PROCESSING
Line broadening 1.0 Hz
FT size 131072
Total time 18 min, 42 sec

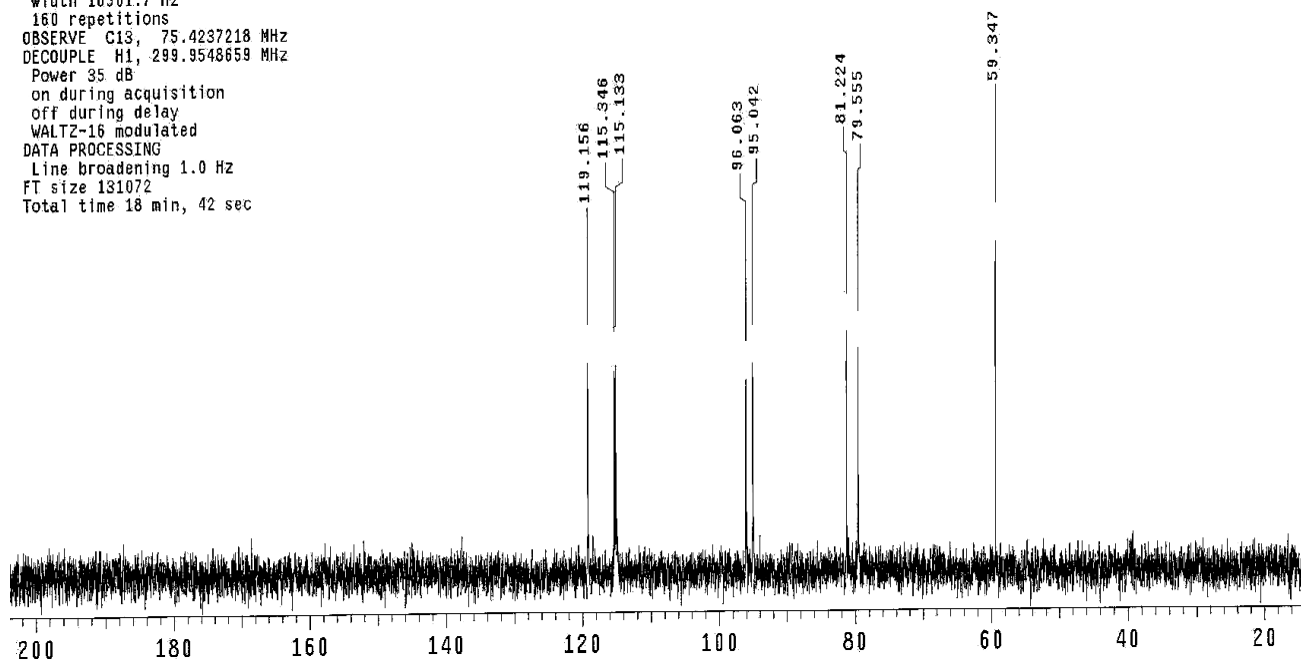


Figura 45 - Espectro de ^{13}C -DEPT (135) da substância S1 em DMSO-d_6 .

Tabela 12 – Deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C da taxifolina com a substância S1.

Carbono	Tipo de carbono	Taxifolina* (acetona- d_6) δ (ppm)	S1 (DMSO- d_6) δ (ppm)
2	CH	84,3	81,2
3	CH	73,0	79,6
4	C	198,0	196,0
5	C	164,8	163,5
6	CH	96,9	96,1
7	C	167,6	167,0
8	CH	95,8	95,1
9	C	164,0	162,2
10	C	101,4	100,8
1'	C	129,3	127,4
2'	CH	115,7	115,4
3'	C	145,5	145,1
4'	C	146,4	146,0
5'	CH	115,6	115,1
6'	CH	120,7	119,2
OCH_3	CH_3	-	59,4

* Kuo et al, 1998.

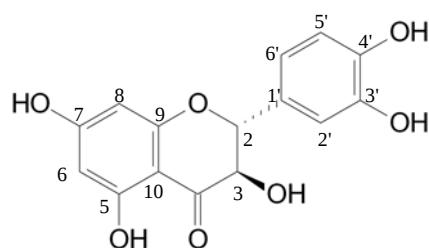


Figura 46 – Estrutura da taxifolina (flavanona)

Na comparação dos deslocamentos químicos entre os dois compostos (Tabela 12) observou-se que os valores para os carbonos 2, 3 e 4 eram diferentes.

A desproteção observada de 6,6 ppm do carbono (C-3) da substância S1 quando comparada ao deslocamento químico do C-3 da taxifolina, sugeri a presença da metoxila nesta posição. Magalhães e colaboradores (1996) isolaram uma

flavanona (Figura 47) que possui na posição 3 um grupo OCH_3 , cujo deslocamento químico do carbono (C-3) é δ_{C} 82,4 e do carbono do grupo metoxila é δ_{C} 60,2 próximo dos valores encontrado na substância S1, cujo valor é de em δ_{C} 79,6 e 59,4.

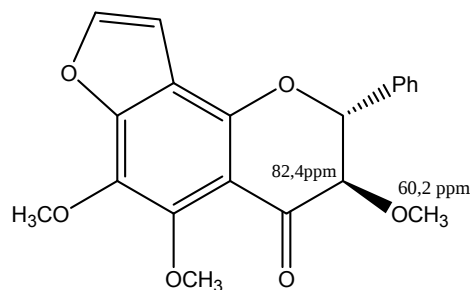


Figura 47 – Estrutura da (2*R*,3*R*)-3,5,6-trimetoxi-[2'',3'',7,8,]-furanoflavanonol

Para fundamentar está proposta foi necessário uma análise espectroscópica de RMN de ^1H e ^{13}C (bidimensionais). No espectro de $^1\text{H} - ^1\text{H}$ (COSY) (Figura 48) foi possível confirmar o acoplamento entre os hidrogênios H-2 e H-3 (acoplamento vicinal), entre os hidrogênios H-6 e H-8 e os hidrogênios entre δ_{H} 6,75 e 6,90.

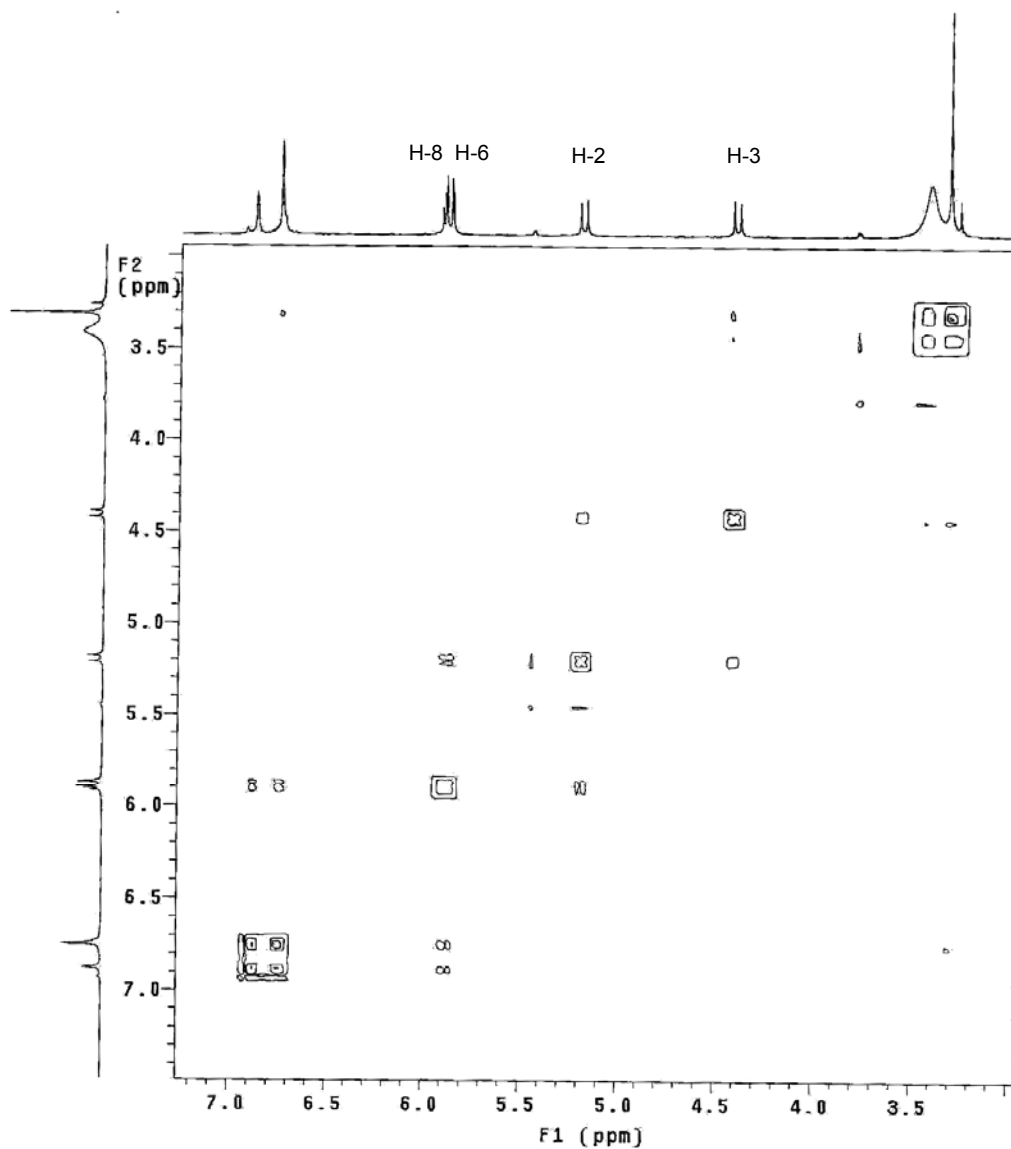


Figura 48 – Espectro de ^1H - ^1H (COSY) da substância S1 em DMSO-d_6 .

No espectro de RMN de ^1H x ^{13}C (HETCOR) (Figura 49) observou-se os acoplamentos entre os carbonos e hidrogênios a eles diretamente ligados (Tabela 13), confirmando as correlações existente.

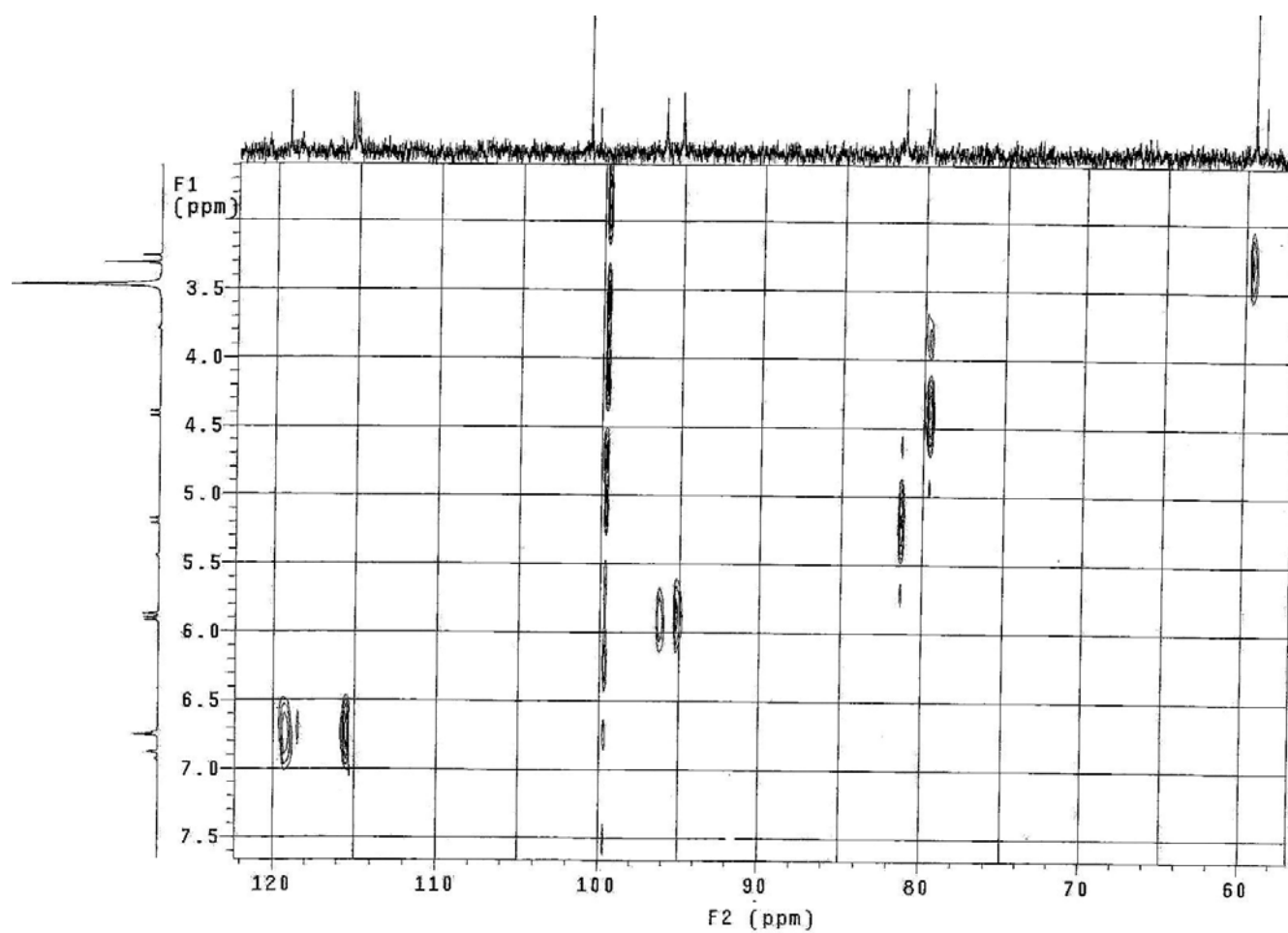


Figura 49 – Espectro de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HETCOR) da substância S1 em DMSO-d_6 .

Tabela 13 – Dados de RMN de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HETCOR) da substância S1.

C	^{13}C δ (ppm)	^1H δ (ppm) e J (Hz)
2	81,2	5,20 (d) $^3J = 9,9$
3	79,6	4,32 (d) $^3J = 9,9$
6	96,1	5,86 (d) $^4J = 2,1$
8	95,1	5,90 (d) $^4J = 2,1$
2'	115,4	6,90(s)
5'	115,1	6,75
6'	119,2	6,75
OCH_3	59,4	3,31(s)

Para confirmar a localização do grupo OCH_3 e as correlações à longa distância foi necessário o espectro de RMN de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) ($^2J_{\text{CH}}$ e $^3J_{\text{CH}}$) (Figura 50). Observou-se que o hidrogênio (H-3) possui uma correlação com o carbono da metoxila ($^3J_{\text{CH}}$) e conseqüentemente foi confirmada pelas correlações dos hidrogênios da metoxila com o carbono C-3 ($^3J_{\text{CH}}$). Na Tabela 14 verifica-se as correlações.

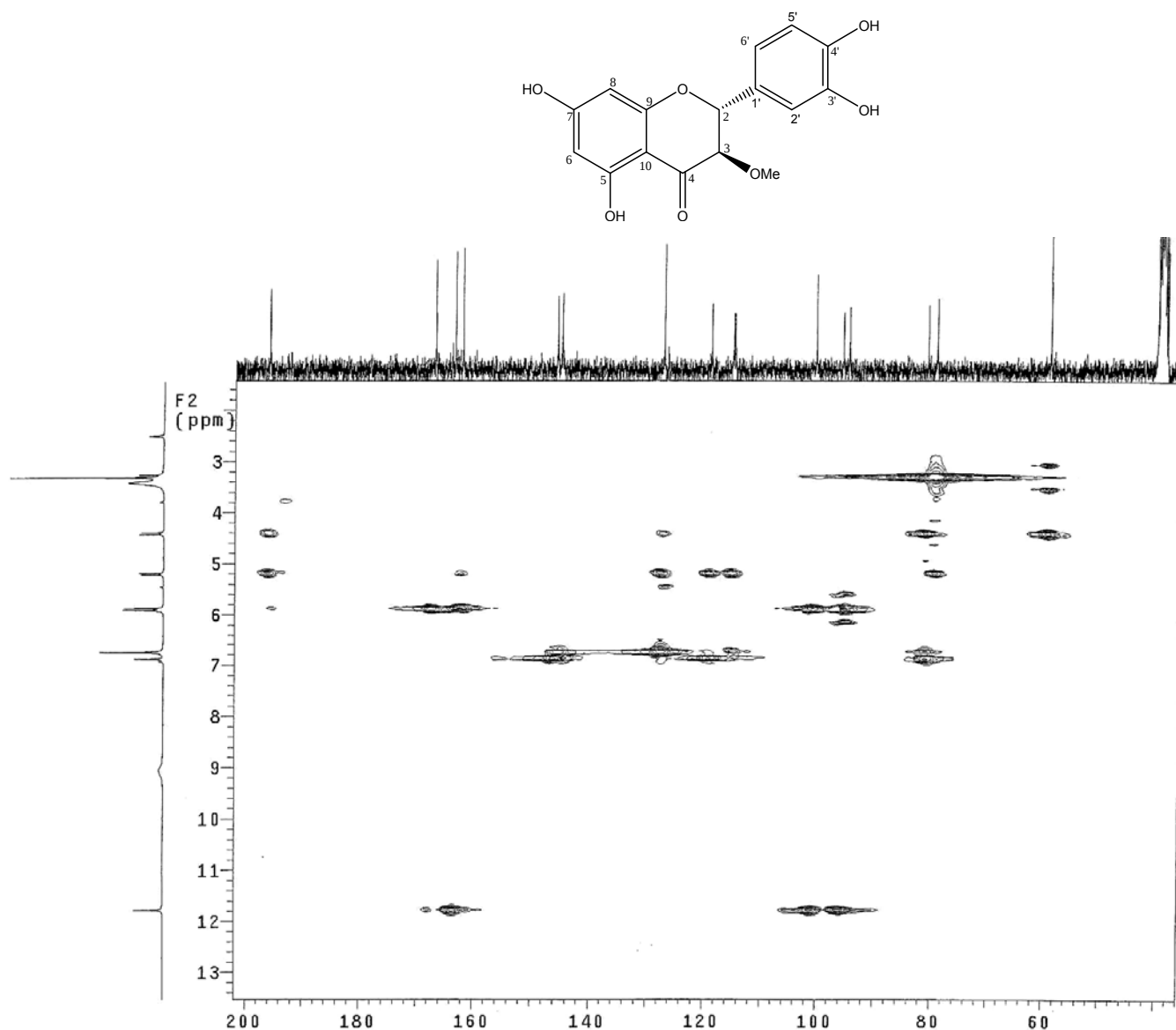


Figura 50 - Espectro de ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC) da substância S1 em DMSO-d_6 .

Tabela 14 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C e suas correlações ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ –HMBC)

C/H	$\delta ^1\text{H}$ (mult, J (Hz))	$\delta ^{13}\text{C}$ (ppm)	HMBC (C $\leftrightarrow$ H)
2	5,20 (d) $^3J = 9,9$	81,2	H-3, H-2', H-5' e H-6'
3	4,40 (d) $^3J = 9,9$	79,6	OCH ₃ , H-2
4		196,0	H-2, H-3
5		163,5	OH-5, H-6
6	5,86 (d) $^4J = 2,1$	96,1	H-8, OH-5
7		167,0	H-6, H-8
8	5,90 (d) $^4J = 2,1$	95,1	H-6
9		162,2	H-2, H-8
10		100,8	OH-5, H-6
1'		127,4	H-3, H-2', H-6', H-2, H-5
2'	6,90 (s)	115,4	H-2, H-6'
3'		146,0	H-5', H-2'
4'		145,1	H-5', H-6', H-2'
5'	6,75	115,1	H-6'
6'	6,75	119,2	H-5', H-2, H-2'
OCH ₃	3,70 (s)	59,4	H-3

Também pelo espectro de RMN de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) foi verificado que os hidrogênios aromáticos em δ_{H} 6,75 e 6,90 estão correlacionados com os carbonos C-1' (δ_{C} 127,4), C-2' (δ_{C} 115,4), C-3' (δ_{C} 145,1) e C-4' (δ_{C} 146,0) e C-2 (δ_{C} 81,2). E uma correlação do hidrogênio em δ_{H} 6,90 com o carbono C-6' (δ_{C} 119,2). Assim, conseguiu-se determinar as posições dos prótons no anel aromático B da flavanona.

Através dos dados espectroscópicos foi possível determinar a estrutura da substância S1 como sendo 3-metóxi-3',4',5,7-tetraidroxiflavanona (Figura 51). A substância S1 é solúvel em acetona e etanol a quente, tem ponto de fusão de 188-190°C, $[\alpha_{\text{D}}] + 6$ (c=0,5, Me₂CO) e fórmula molecular C₁₆H₁₄O₇. Foi isolada pela primeira vez do cerne de *Salix hultenii* (Salicaceae) por Sasaya (1965) que a denominou de hultenina, cujo ponto de fusão mediu 208-209°C e $[\alpha_{\text{D}}] + 6,69^\circ$. Resultados próximos dos valores encontrados.

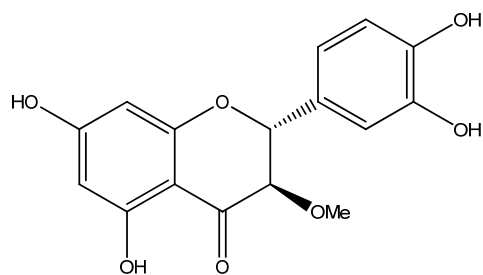


Figura 51 - Estrutura da substância S1 (3-metóxi-3',4',5,7-tetraidróxiflavanona) - hultenina.

A substância S1 foi submetida a atividade antimicrobiana, larvicida e antitermítica.

6.5.2 – Identificação da substância S2

Os dados observados no espectro de RMN de ^1H da substância S2 estão representados na Tabela 15. Os deslocamentos químicos, a integração e a constante de acoplamento permitiram identificar os tipos de prótons, quantidade e suas posições (Figura 52).

Tabela 15 - Deslocamento químico (δ) em ppm e constante de acoplamento (J) em Hz da substância S2 em acetona- d_6 .

Prótons (n°)	δ (ppm)	J (Hz)
1H	4,62 (d)	$^3J = 11,4$
1H	5,02 (d)	$^3J = 11,4$
1H	5,95 (d)	$^4J = 1,8$
1H	5,99 (d)	$^4J = 1,8$
1H	6,87 (d)	$^3J = 8,4$
1H	6,92 (dd)	$^3J = 8,4$ e $^4J = 1,8$
1H	7,08 (d)	$^4J = 1,8$
3OH	8,63	
1 OH	11,7 (s)	

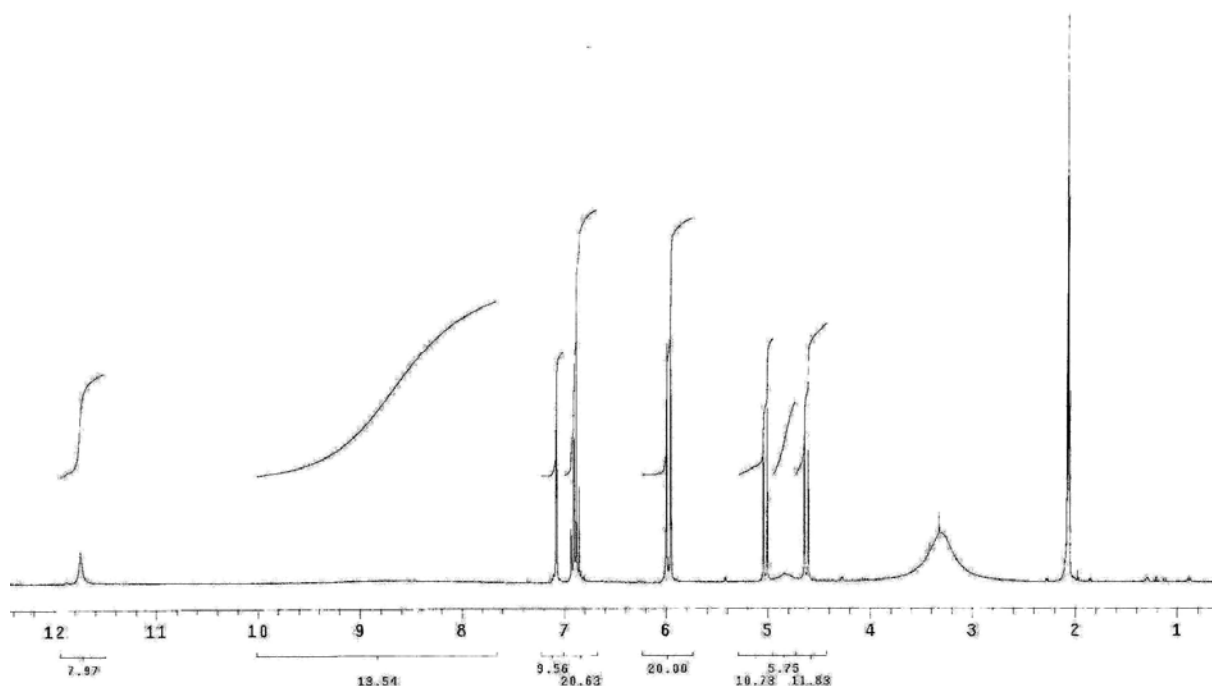


Figura 52 – Espectro de RMN de ^1H da substância S2 em acetona- d_6 .

Os sinais em δ_{H} 4,62 (d) e 5,02 (d) são característicos de hidrogênios não aromáticos e que acoplam entre si com uma constante de acoplamento $^3J = 11,4\text{Hz}$. Os sinais δ_{H} 5,95 e 5,99 são característicos de hidrogênios em anel aromático tetrasubstituído que acoplam entre si em posição meta com uma constante de acoplamento $^4J = 1,8\text{ Hz}$ (sistema do tipo AB) (BREITMAIER, 2002).

Foi observado ainda na região de hidrogênios aromáticos, formando um sistema do tipo ABX, dois dupletos em δ_{H} 6,87 ($^3J = 8,4\text{ Hz}$) e δ_{H} 7,08 ($^4J = 1,8\text{ Hz}$). E um duplo duplete em δ_{H} 6,92 ($^3J = 8,4\text{ Hz}$ e $^4J = 1,8\text{ Hz}$), indicativos da presença de um segundo anel aromático trissubstituídos. A presença de dois grupos OH característicos de hidroxilas fenólicas em δ_{H} 8,63 e outro em δ_{H} 11,7 foi bem evidenciada. O sinal que representa a hidroxila fenólica em δ_{H} 11,7 é característico de hidroxila formando ligação intramolecular com a carbonila (Figura 53 e Figura 54).

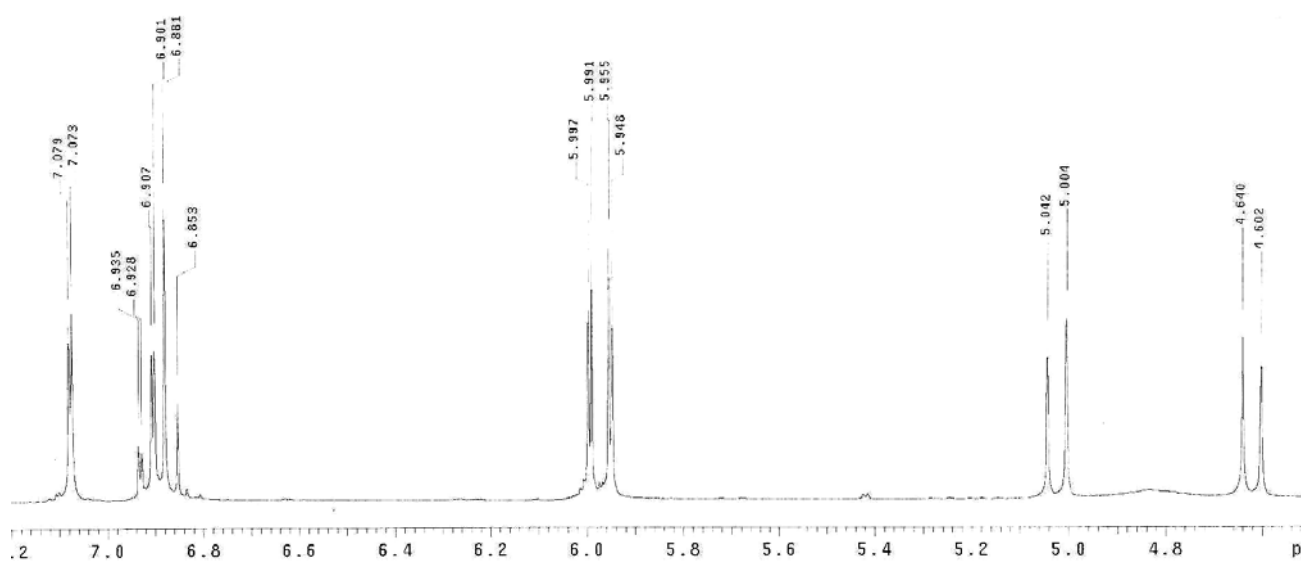


Figura 53 – Expansão do espectro de RMN de ^1H da substância S2 em acetona- d_6 .

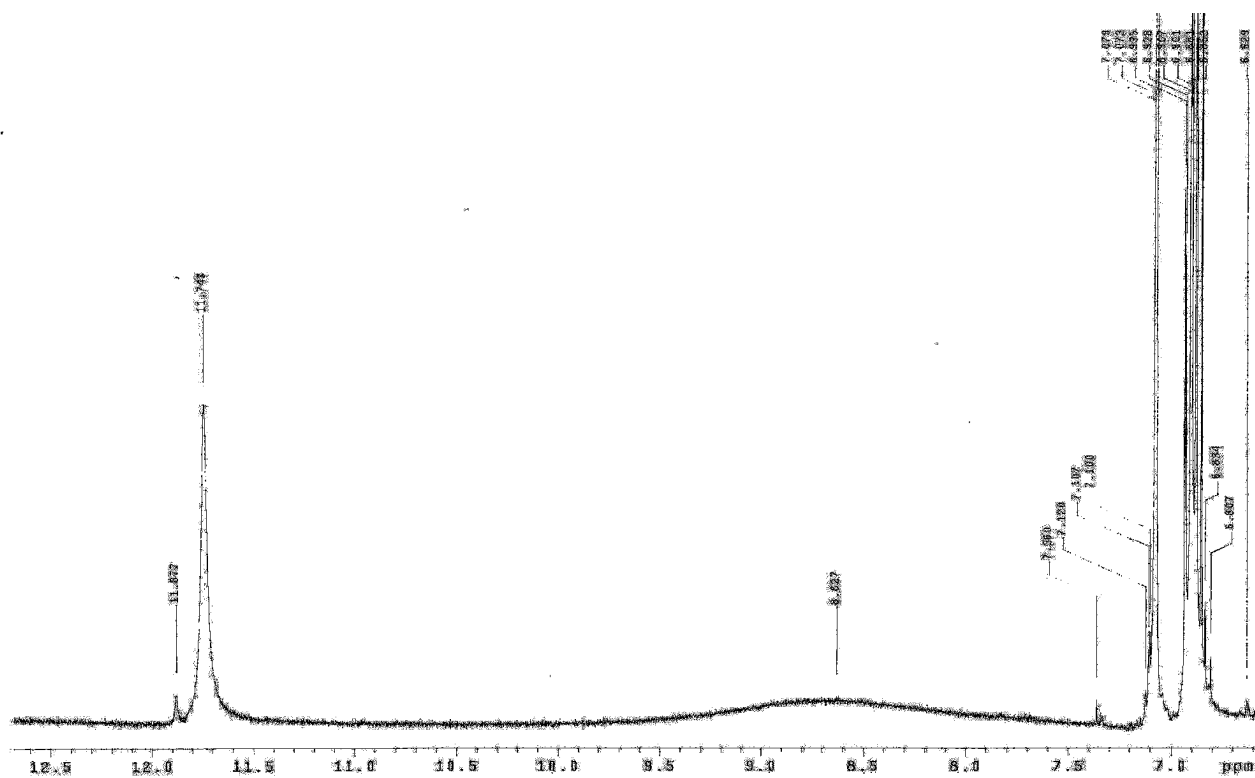


Figura 54 – Expansão do espectro de de RMN de ^{13}C da substância S2 em acetona- d_6 .

Na Figura 55 pode ser observado o deslocamento químico do espectro de RMN de ^{13}C da substância S2 e listados na Tabela 16.

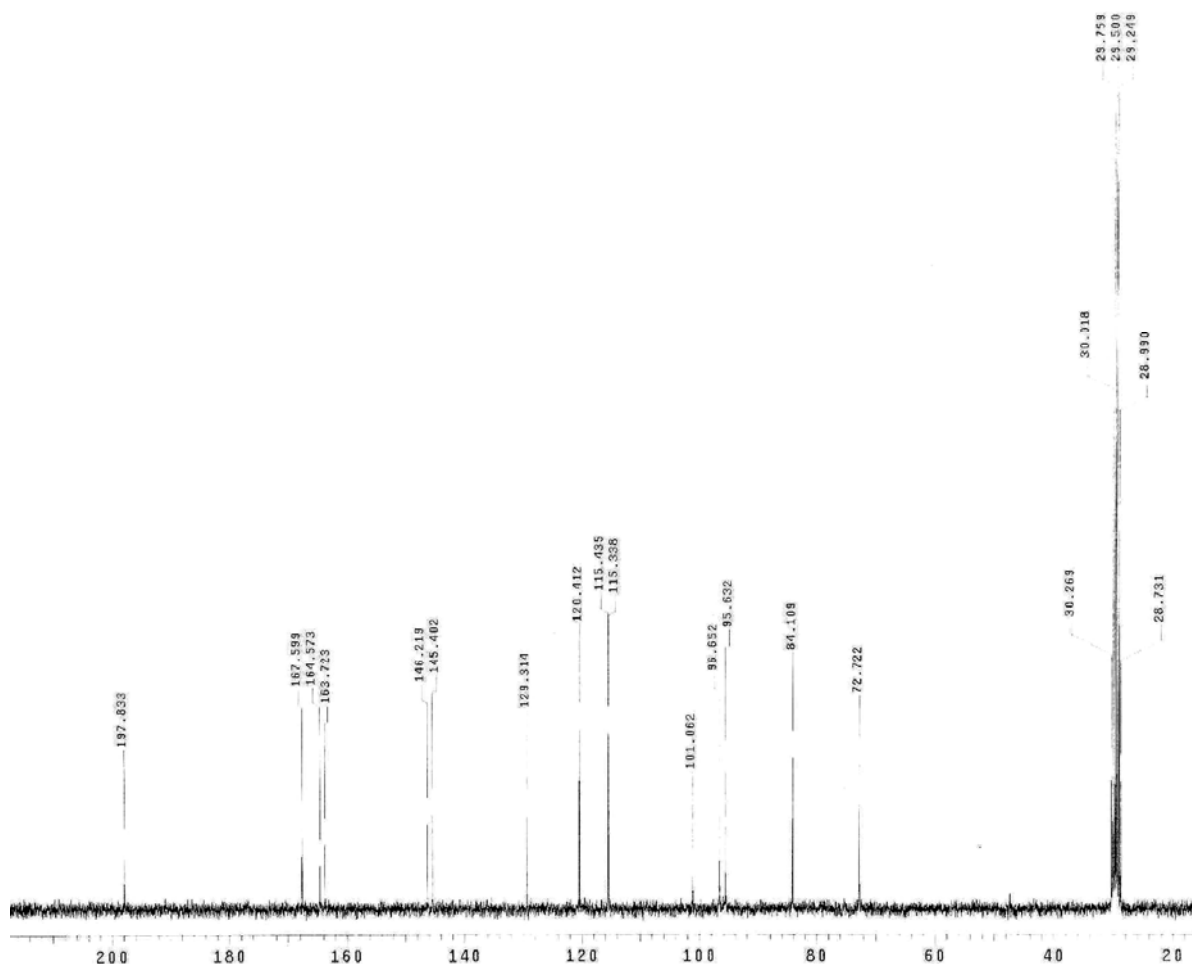


Figura 55 – Espectro de espectro de RMN de ^{13}C da substância S2 em acetona- d_6 .

Através do espectro de espectro de RMN de ^{13}C da substância S2 foi possível identificar um total de 15 carbonos. Os dados obtidos na literatura de Kuo e colaboradores (1998) que isolaram a taxifolina, permitiram fazer a comparação com os resultados obtidos da substância S2 (Tabela 16).

Tabela 16 - Comparação do espectro de RMN de ^{13}C da taxifolina com a substância S2 ambos em acetona- d_6 .

Carbono	Tipo de carbono	Taxifolina*	S2
		δ (ppm)	δ (ppm)
2	CH	84,3	84,1
3	CH	73,0	72,7
4	C	198,0	197,8
5	C	164,8	164,6
6	CH	96,9	96,6
7	C	167,6	167,6
8	CH	95,8	95,6
9	C	164,0	163,7
10	C	101,4	101,1
1'	C	129,3	129,3
2'	CH	115,7	115,4
3'	C	145,5	145,4
4'	C	146,4	146,2
5'	CH	115,6	115,3
6'	CH	120,7	120,4

* Kuo *et al.*, 1998.

Observou-se que existe um pequeno desvio de 0,3ppm dos deslocamentos do espectro de RMN de ^{13}C da substância S2 com o da taxifolina, assim como os resultados dos espectros de ^1H -RMN que podem ser verificados na Tabela 17.

Tabela 17 – Comparação dos espectros de RMN de ^1H da substância S2 com o da taxifolina, ambos em acetona- d_6 .

Próton	Taxifolina*	S2
	δ (ppm) e J (Hz)	δ (ppm) e J (Hz)
H-2	5,03(d) $^3J = 11,4$	5,02(d) $^3J = 11,4$
H-3	4,63(d) $^3J = 11,4$	4,62(d) $^3J = 11,4$
H-6	5,94(d) $^4J = 0,8$	5,95(d) $^4J = 1,8$
H-8	5,98(d) $^4J = 0,8$	5,99(d) $^4J = 1,8$
H-2'	7,06(d) $^4J = 1,9$	7,08(d) $^4J = 1,8$
H-5'	6,82(d) $^3J = 8,1$	6,87(d) $^4J = 8,4$
H-6'	6,89(dd) $^3J = 8,1$ e $^4J = 1,9$	6,92(dd) $^3J = 8,4$ e $^4J = 1,8$
5-OH	11,69(s)	11,70(s)

* Kuo et al, 1998.

Observou-se que na substância S2 os prótons H-2 e H-3 em região de prótons alifáticos, acoplam entre si com $^3J = 11,4\text{Hz}$, indicando uma configuração *trans* assim como os prótons da taxifolina (Figura 56). Os dados espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C da substância S2 e a comparação com os dados da literatura foram satisfatórios para identificação. Desta forma, foi possível confirmar que a substância S2 tratava-se da taxifolina. Fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_7$, solúvel em acetona e etanol.

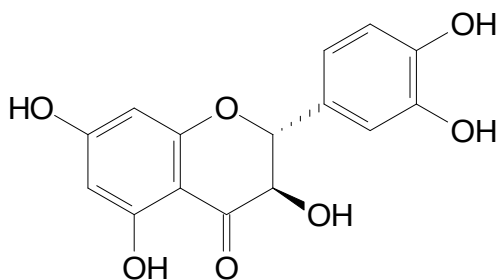


Figura 56 – Estrutura da substância S2 - taxifolina

6.5.3 – Identificação da substância S3

A identificação da substância S3 foi realizada com base nos dados obtidos dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C -RMN. Na Tabela 18 pode ser observado o resultado da análise espectroscópica de RMN de ^1H da substância S3.

Tabela 18 - Deslocamento químico (δ) em ppm e constante de acoplamento (J) em Hz dos sinais de próton da substância S3 em acetona- d_6 .

Prótons (n^0)	δ (ppm)	J (Hz)
1H	6,26 (d)	$^4J = 1,8$
1H	6,52(d)	$^4J = 1,8$
1H	6,99 (d)	$^3J = 8,5$
1H	7,69 (dd)	$^4J = 1,8$ e $^3J = 8,5$
1H	7,82 (d)	$^4J = 1,8$
4OH	8,71	
1 OH	12,18	

Os sinais em δ_{H} 6,26 e 6,52 (dupletos), formando um sistema do tipo AB, são característicos de hidrogênios aromáticos e que acoplam entre si em posição meta com uma constante de acoplamento $^4J = 1,8$ Hz, indicando a presença de um anel aromático tetrasubstituídos, da mesma forma que as substâncias S1 e S2, com hidroxila nas posições 5 e 7.

O sinal em δ_{H} 6,99 (duplete) também é característico de hidrogênio aromático e possui uma constante de acoplamento $^3J = 8,5$ Hz, indicando acoplamento orto. Em δ_{H} 7,69 (duplo duplete) há um próton que acopla em posição orto e meta com constantes de acoplamento $^3J = 8,5$ e $^4J = 1,8$ Hz, respectivamente. E em δ_{H} 7,82 têm-se um próton com acoplamento $^4J = 1,8$ Hz, posição meta no anel aromático. Esta análise indica a presença de um segundo anel aromático com sistema do tipo ABX, semelhante às substâncias S1 e S2 com hidroxilas nas posições 3' e 4'.

O sinal em δ_{H} 8,71 é característico de grupo hidroxila fenólico e pela integração constata-se a presença de quatro grupos hidroxila e outro em δ_{H} 12,18 característico de hidroxila fazendo ligação intramolecular com a carbonila (Figuras

57 e 58). Neste espectro foi observada a ausência dos dois dupletos na região de prótons alifáticos que foram evidenciados nos espectros de RMN de ^1H das substâncias S1 e S2. Desta forma, estes dados sugerem diferenças significativas no anel C.

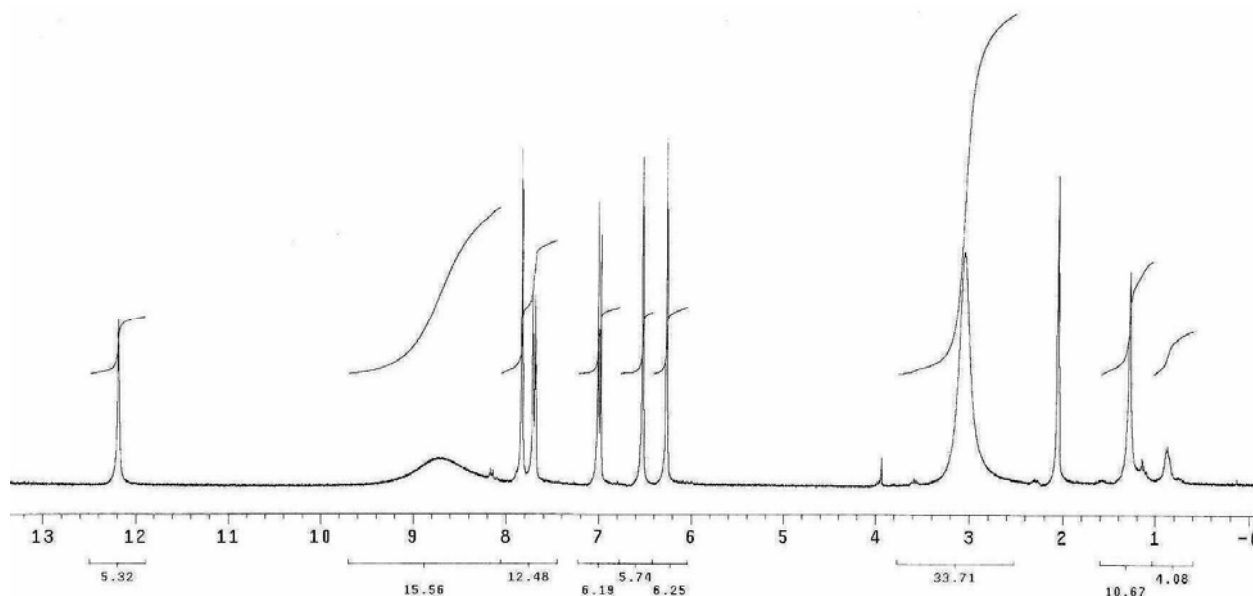


Figura 57 – Espectro de RMN de ^1H da substância S3 em acetona- d_6 .



Figura 58 – Expansão do espectro de RMN de ^1H da substância S3 em acetona- d_6 .

Foi observado no espectro de RMN de ^{13}C a presença de 15 sinais atribuíveis a um flavonóide (Figura 59) e a ausência de sinais na região entre δ_{C} 72,1 e 84,1, confirmando diferenças no anel heterocíclico da substância S3 quando comparada com S1 e S2. A presença dos sinais em δ_{C} 136,8 e 148,4 sugeriram que S3 se tratava de um flavonol.

Após a comparação com os resultados obtidos por Chen e colaboradores (2008) constatou-se a semelhança com o deslocamento químico da quercetina. Na Tabela 19 pode-se verificar a comparação dos resultados de RMN de ^{13}C da substância isolada S3 com os da literatura citada.

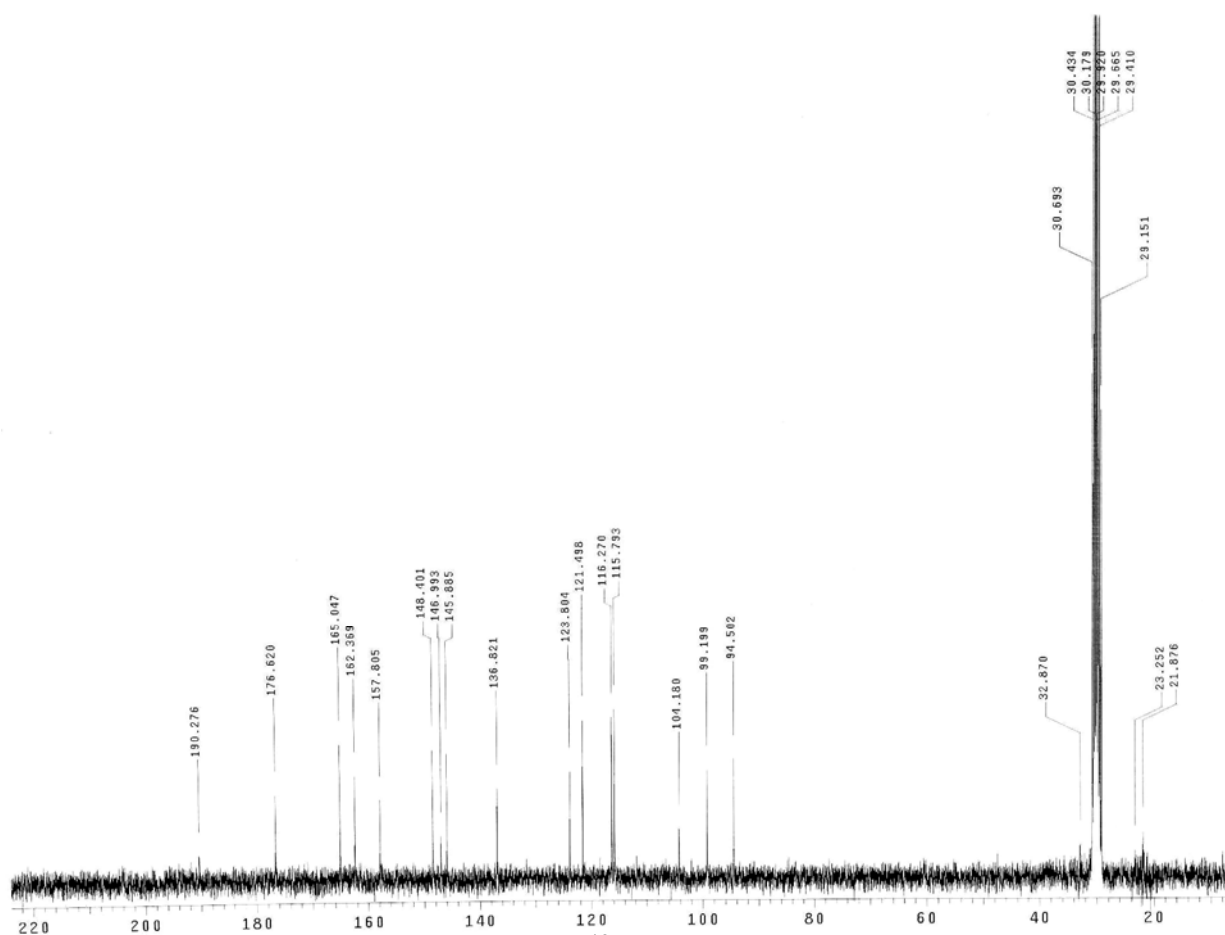


Figura 59 – Espectro de RMN de ^{13}C da substância S3 em acetona- d_6 .

Tabela 19 - Comparação do espectro de RMN de ^{13}C da quercetina em CD_3OD com a substância S3 em acetona- d_6 .

Carbono	Quercetina* δ (ppm)	S3 δ (ppm)
2	147,4	148,4
3	135,9	136,8
4	175,9	176,6
5	161,2	162,4
6	97,9	99,2
7	164,2	165,0
8	93,0	94,5
9	156,8	157,8
10	103,2	104,2
1'	122,8	123,8
2'	114,6	115,8
3'	146,6	147,0
4'	144,9	145,9
5'	114,9	116,3
6'	120,3	121,5

*Chen *et al.*, 2008.

Na Tabela 20 também observa-se a comparação dos resultados espectrocópicos de RMN de ^1H da substância S3 com o da quercetina.

Tabela 20 - Comparação dos espectros de ^1H -RMN da substância S3 em acetona- d_6 com o da quercetina em CD_3OD .

Próton	Quercetina*	S3
	δ (ppm) e J (Hz)	δ (ppm) e J (Hz)
H-6	6,18(d) $^4J = 1,7$	6,26(d) $^4J = 1,8$
H-8	6,38(d) $^4J = 2,4$	6,52(d) $^4J = 1,8$
H-2'	7,73(d) $^4J = 2,3$	7,82(d) $^4J = 1,8$
H-5'	6,88(d) $^3J = 8,6$	6,99(d) $^4J = 8,5$
H-6'	7,63(dd) $^3J = 8,5$ e $^4J = 3,2$	7,69(dd) $^3J = 8,5$ e $^4J = 1,8$

*Chen *et al.*, 2008.

É possível, depois dos resultados obtidos e comparados, afirmar que a substância S3, solúvel em acetona, cuja fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$, é a quercetina (Figura 60), com ponto de fusão experimental de $310\text{-}312^\circ\text{C}$ e o da literatura de $314\text{-}316^\circ\text{C}$.

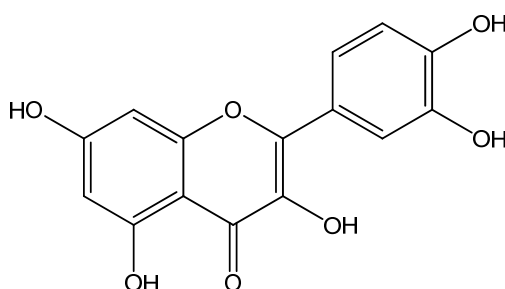


Figura 60 – Estrutura da substância S3 – quercetina.

A substância S3 - quercetina foi submetida a teste de atividade biológica.

6.5.4 – Identificação da substância S4

A identificação estrutural da substância S4 foi realizada por RMN de ^1H e ^{13}C , bem como pelos métodos bidimensionais associados a eles (COSY, HETCOR, HMBC). Os resultados das análises espectroscópicas de RMN de ^1H da substância S4 estão descritos na Tabela 21.

Tabela 21 – Deslocamento químico (δ) em ppm e constante de acoplamento (J) em Hz dos sinais de prótons da substância S4 em DMSO- d_6 .

Prótons (n^0)	δ (ppm)	J (Hz)
1H	2,37 (dd)	$^2J = 16,2$ e $^3J = 7,8$
1H	2,65 (dd)	$^2J = 16,2$ e $^3J = 5,1$
OCH ₃	3,70(s)	
1H	3,84 (m)	
1H	4,53 (d)	$^3J = 7,2$
1H	4,94	
1H	5,85 (d)	$^4J = 2,1$
1H	5,97 (d)	$^4J = 2,1$
1H	6,59 (dd)	$^3J = 8,1$ e $^4J = 2,1$
1H	6,70 (d)	$^3J = 8,1$
1H	6,72 (d)	$^4J = 2,1$
1 OH	8,88	
1 OH	8,90	
1OH	9,23	

Através dos deslocamentos químicos e integração, verificou-se a presença de 5 hidrogênios em região de aromáticos entre δ_{H} 5,85 e 6,72. Entre δ_{H} 5,85 e δ_{H} 5,97 observa-se dois dupletos atribuídos a hidrogênios em acoplamento meta com $^4J = 2,1$ Hz indicando um anel aromático A com mesmo padrão de substituição das substâncias S1, S2 e S3. Semelhanças entre as substâncias também foram observadas com relação ao anel B, pois foi observado dois dupletos (δ_{H} 6,72 com $^4J = 2,1$ e em δ_{H} 6,70 com $^3J = 8,1$) e um duplo duplete (δ_{H} 6,59 $^3J = 8,1$ e $^4J = 2,1$),

formando um sistema do tipo ABX referentes aos hidrogênios H-2', H-5' e H-6', respectivamente. Nesta região constatou-se ainda a presença de três hidroxilas fenólicas em δ_H 8,88 – 9,23 (Figura 61 e 62).

Os sinais δ_H 2,37 e 2,65 em região de baixa frequência, indica a presença de 2 hidrogênios metilênicos (CH_2) e um sinal em δ_H 3,70 com integração para 3 hidrogênios, indicando a presença de um grupo metoxila (OCH_3) (Figura 62). Por integração, na região de prótons alifáticos observa-se ainda a presença de um próton em δ_H 3,84 e em δ_H 4,94 um próton carbinólico.

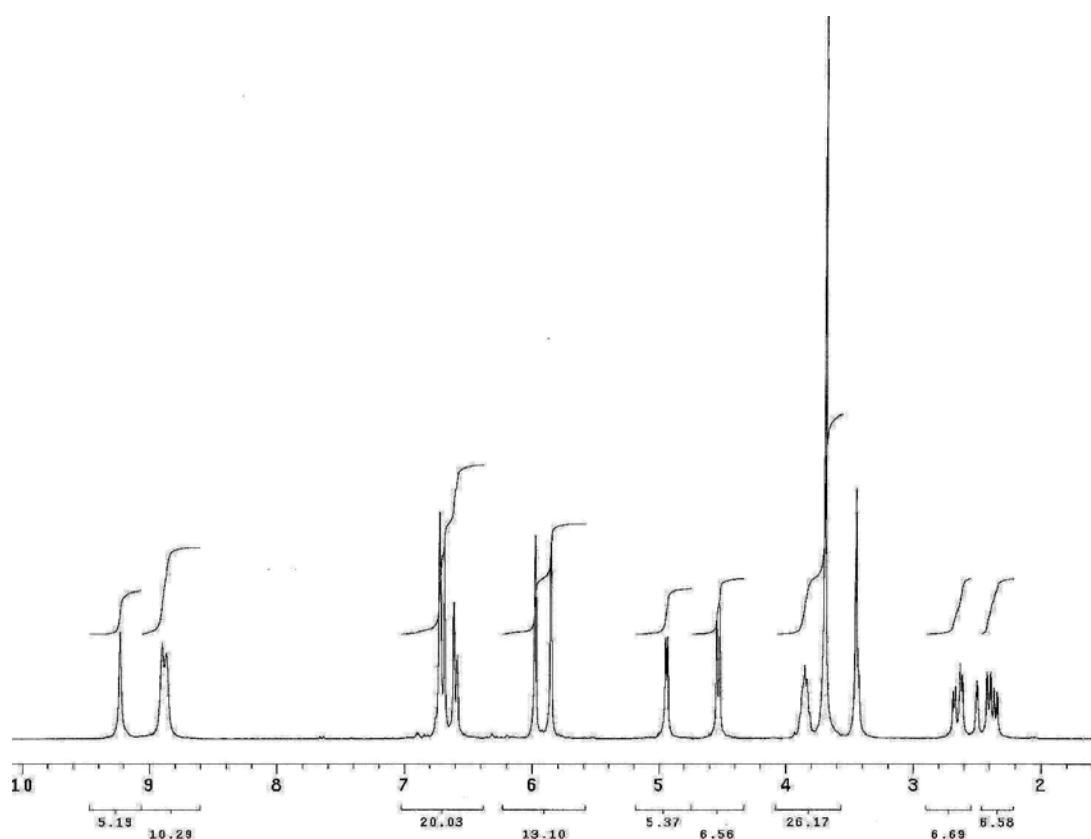


Figura 61 – Espectro de RMN de 1H da substância S4 em $DMSO-d_6$.

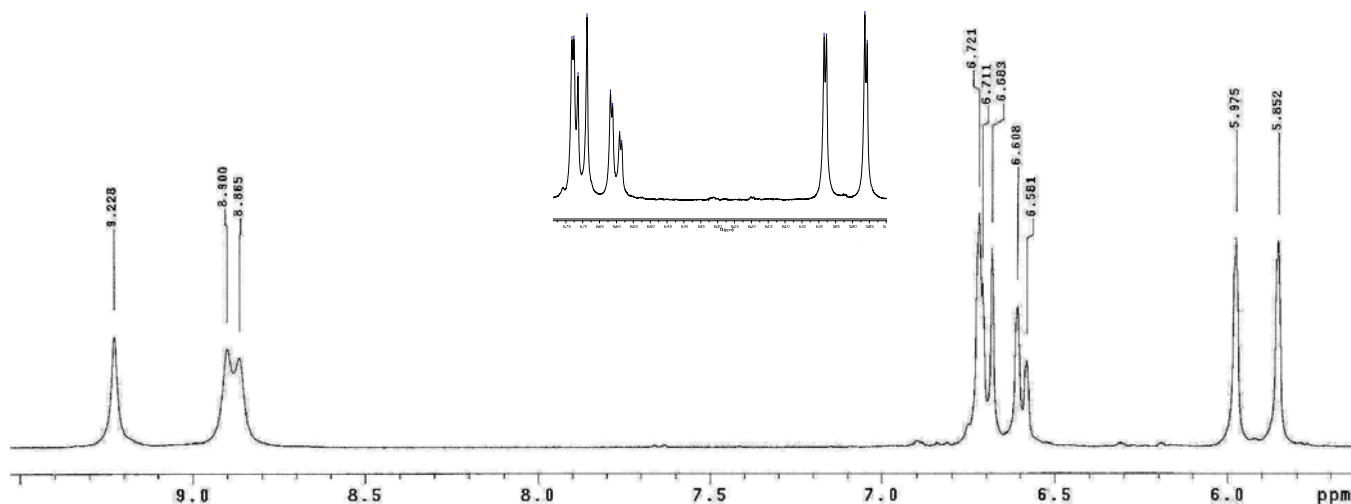


Figura 62 – Expansão do espectro RMN de ^1H da substância S4 em DMSO-d_6 .

Os prótons não aromáticos e suas constantes de acoplamento (Tabela 21) sugerem que a substância S4 possui, um terceiro anel substituído. Os resultados foram comparados com os resultados dos espectros de ^1H -RMN (200MHz) de um flavanol encontrado por Bilia e colaboradores (1996). Na Tabela 22 observa-se que os prótons da substância S4 possuem deslocamento químico semelhante aos prótons do flavanol (Figura 63) correspondente na literatura.

Tabela 22 – Comparação dos espectros de RMN de ^1H da literatura com os encontrados na substância S4.

Próton	δ (ppm) e J (Hz)	
	Literatura* (CD_3OD)	S4 (DMSO)
OCH_3	3,96 (s)	3,70(s)
H - 2	4,56(d) $^3J=7,6$	4,53 (d) $^3J=7,2$
H - 3	3,98(m)	3,84(m)
H - 4a	2,50(dd) $^3J=8,2$ e $^2J=16,1$	2,37(dd) $^3J=7,8$ e $^2J=16,2$
H - 4b	2,84(dd) $^3J=5,4$ e $^2J=16,1$	2,65 (dd) $^3J=5,1$ e $^2J=16,2$
H - 6	5,85(d) $^4J=1,9$	5,85 (d) $^4J=2,1$
H - 8	5,97(d) $^4J=1,9$	5,97 (d) $^4J=2,1$
H - 2'	6,84(d) $^4J=1,9$	6,72 (d) $^4J=2,1$
H - 5'	6,74 (m)	6,70 (d) $^3J=8,1$
H - 6'	6,74 (m)	6,59 (dd) $^4J=2,1$ e $^3J=8,1$

* Bilia et al, 1996.

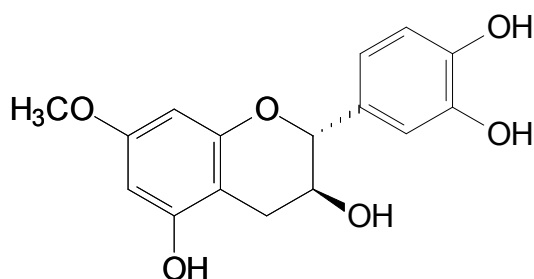


Figura 63 – Estrutura da 7-metóxi-(+)-catequina.

Analisando os espectros de RMN de ^{13}C -APT (Figura 64) foi possível identificar o deslocamento químico e os tipos de carbonos presentes na substância S4 que estão demonstrados na Tabela 23.

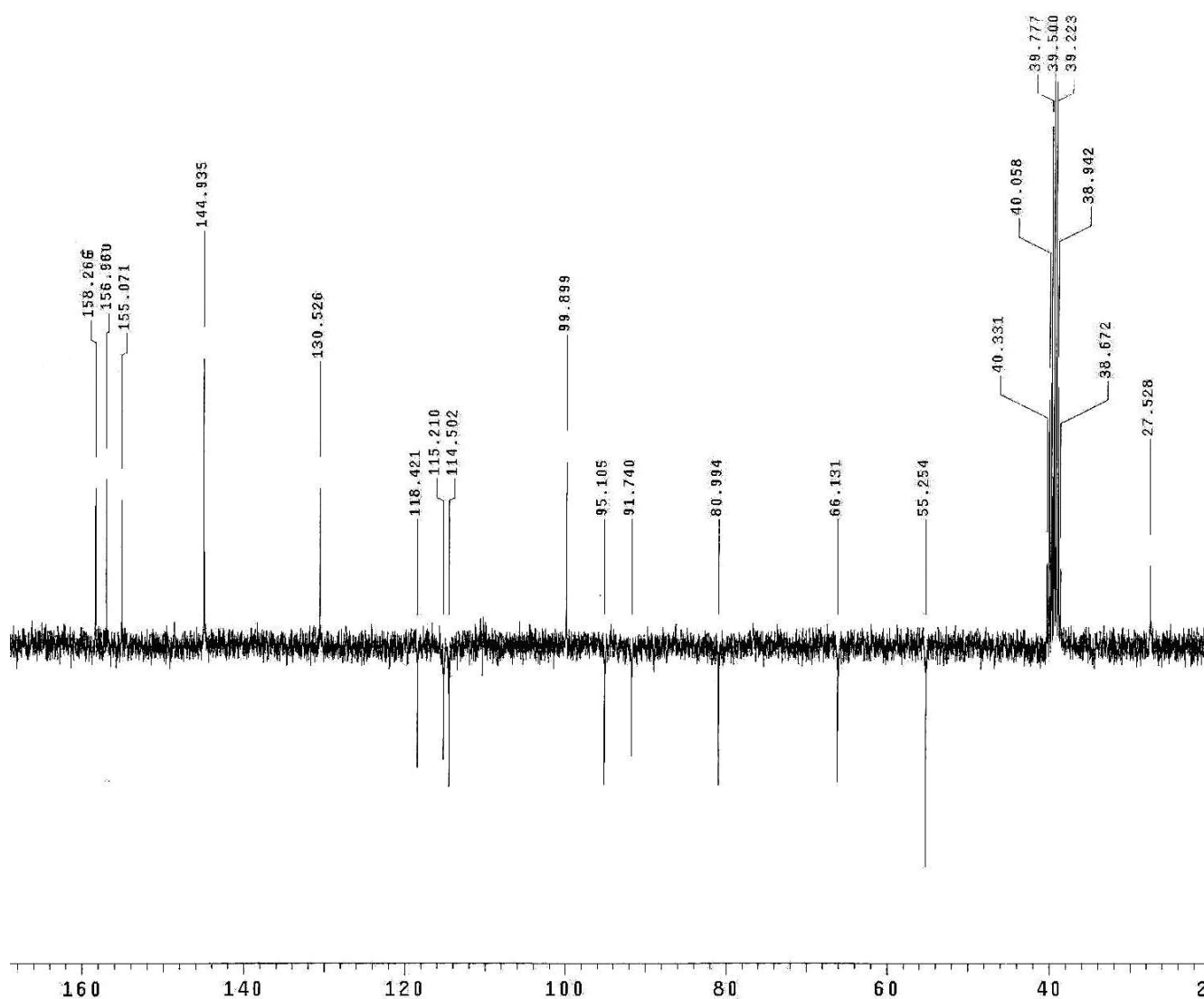


Figura 64 – Espectro de ^{13}C - (APT) da substância S4 em DMSO-d_6 .

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 65) mostra 15 sinais. Como há dois sinais sobrepostos em 144,99, identifica-se pela intensidade do sinal do carbono quaternário, tem-se o total de 16 átomos de carbonos, dos quais 7 carbonos são quaternários, 1 carbono metílico, 7 carbonos são metínicos e 1 carbono metilênico.

Na Tabela 23 podem ser observados os resultados obtidos por Bilia e colaboradores (1996) e os encontrados nos espectros de RMN de ^{13}C da substância S4.

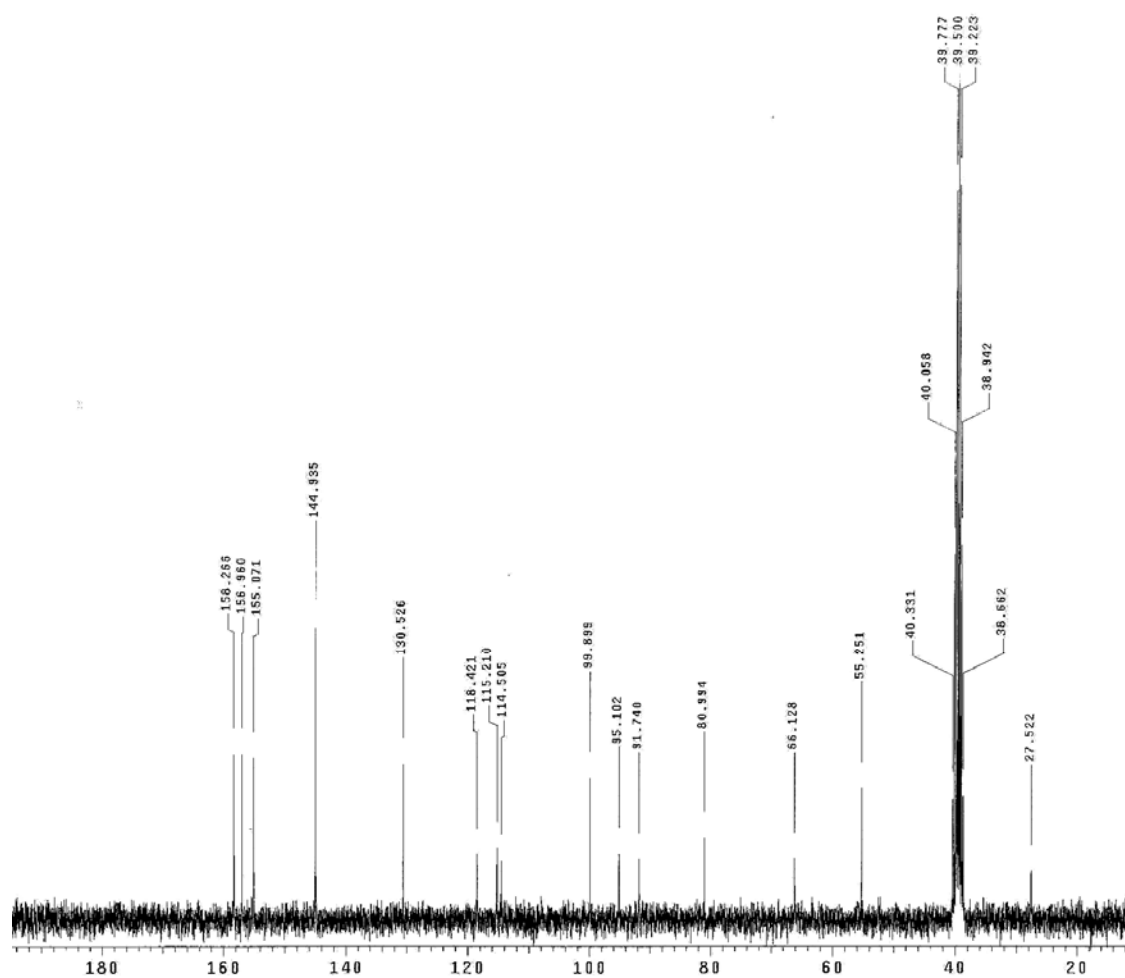


Figura 65 – Espectro de RMN de ^{13}C da substância S4 em DMSO-d_6 .

Tabela 23 – Comparação dos espectros de ^{13}C -RMN da literatura do flavanol em CD_3OD com a substância S4 em DMSO-d_6 .

Carbono	Tipo de Carbono	flavanol δ (ppm)	S4 δ (ppm)
2	CH	82,7	81,0
3	CH	68,8	66,1
4	CH_2	28,4	27,5
5	C	157,0	157,0
6	CH	94,7	95,1
7	C	160,8	158,3
8	CH	94,0	91,7
9	C	156,9	155,1
10	C	102,7	99,9
1'	C	132,0	130,5
2'	CH	115,1	114,5
3'	C	145,1	144,9
4'	C	145,1	144,9
5'	CH	115,8	115,2
6'	CH	120,0	118,4
OCH_3	CH_3	55,0	55,2

As técnicas bidimensionais (COSY, HETCOR) foram realizadas para confirmação dos acoplamentos entre os ^1H - ^1H e ^1H - ^{13}C .

Na Figura 66 tem-se o espectro de ^1H - ^1H (COSY) da substância S4 em DMSO-d_6 que confirma o acoplamento entre os prótons H-4a e H-4b (acoplamento geminal); H-2 e H-3 (acoplamento vicinal); também o acoplamento entre os prótons H-6 e H-8.

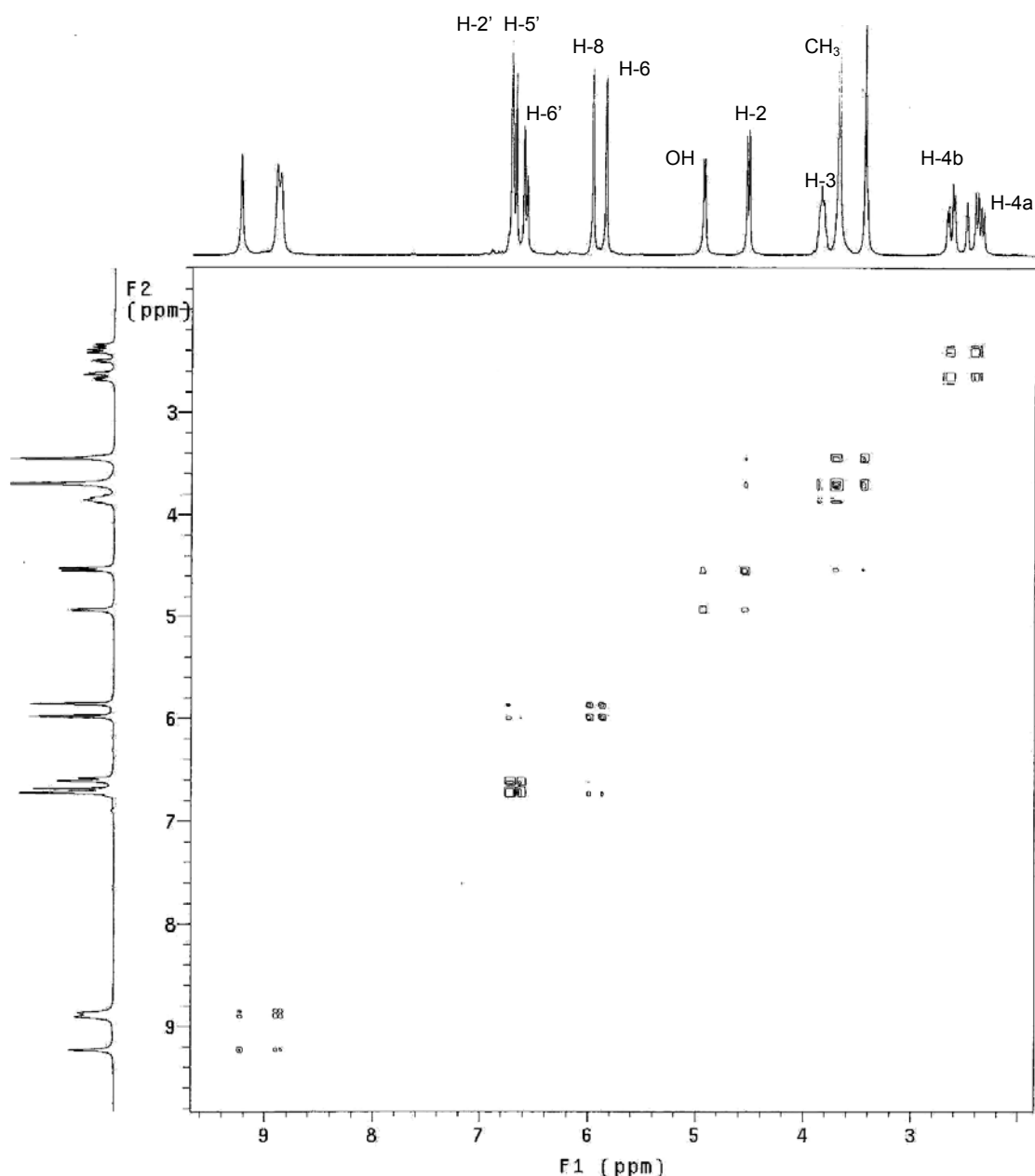


Figura 66 – Espectro de ^1H - ^1H (COSY) da substância S4 em DMSO-d_6 .

No espectro ^{13}C - ^1H (HETCOR) (Figura 67) através das correlações pode-se confirmar as atribuições dos deslocamentos químicos proposta para substância S4. O C-4 ($27,52 \delta_{\text{C}}$) apresenta correlação com dois dupletos ($2,36$ e $2,63 \delta_{\text{H}}$). O carbono do grupo metoxila correlaciona-se com os 3H ($3,68 \delta_{\text{H}}$). O C-3 correlaciona-se com 1H em $3,80 \delta_{\text{H}}$ e C-2 com 1H em $4,51 \delta_{\text{H}}$, confirmando assim, o anel não aromático do flavanol. Também pode-se confirmar o anel aromático, C-6 e C-8 correlacionando-se com $5,84$ e $5,96 \delta_{\text{H}}$ (sistema do tipo AB). Os carbonos C-2', C-5'

e C-6' correlacionam-se com os outros prótons em região de aromático (6,72, 6,70, 6,59 δ_H).

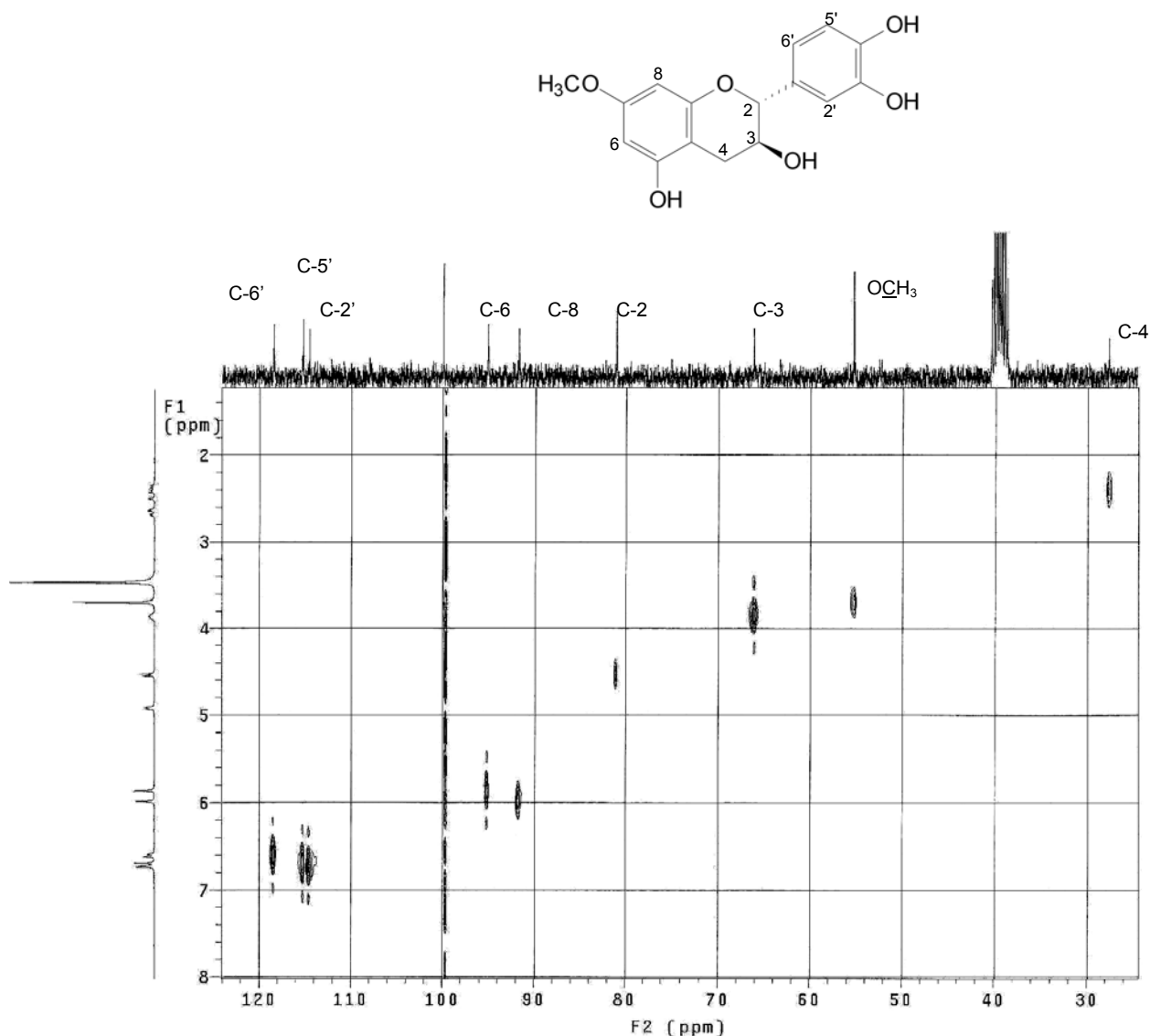


Figura 67 – Espectro de ^{13}C - ^1H (HETCOR) da substância S4 em DMSO-d_6 .

Foi necessário definir a localização do grupo metoxila e confirmar outras conectividades através do espectro de RMN de ^1H x ^{13}C (HMBC). Observa-se na Figura 68 que os prótons da metoxila acoplam ($^3J_{\text{CH}}$) com o carbono quaternário de deslocamento químico 158,3 δ_C (C-7). O próton H-2 (4,53 δ) tem conectividade com os carbonos C-2', C-5', C-6' e C-1'), permitindo assim confirmar a proposta feita para

o segundo anel aromático. Na Tabela 24 observa-se os dados de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) da substância S4.

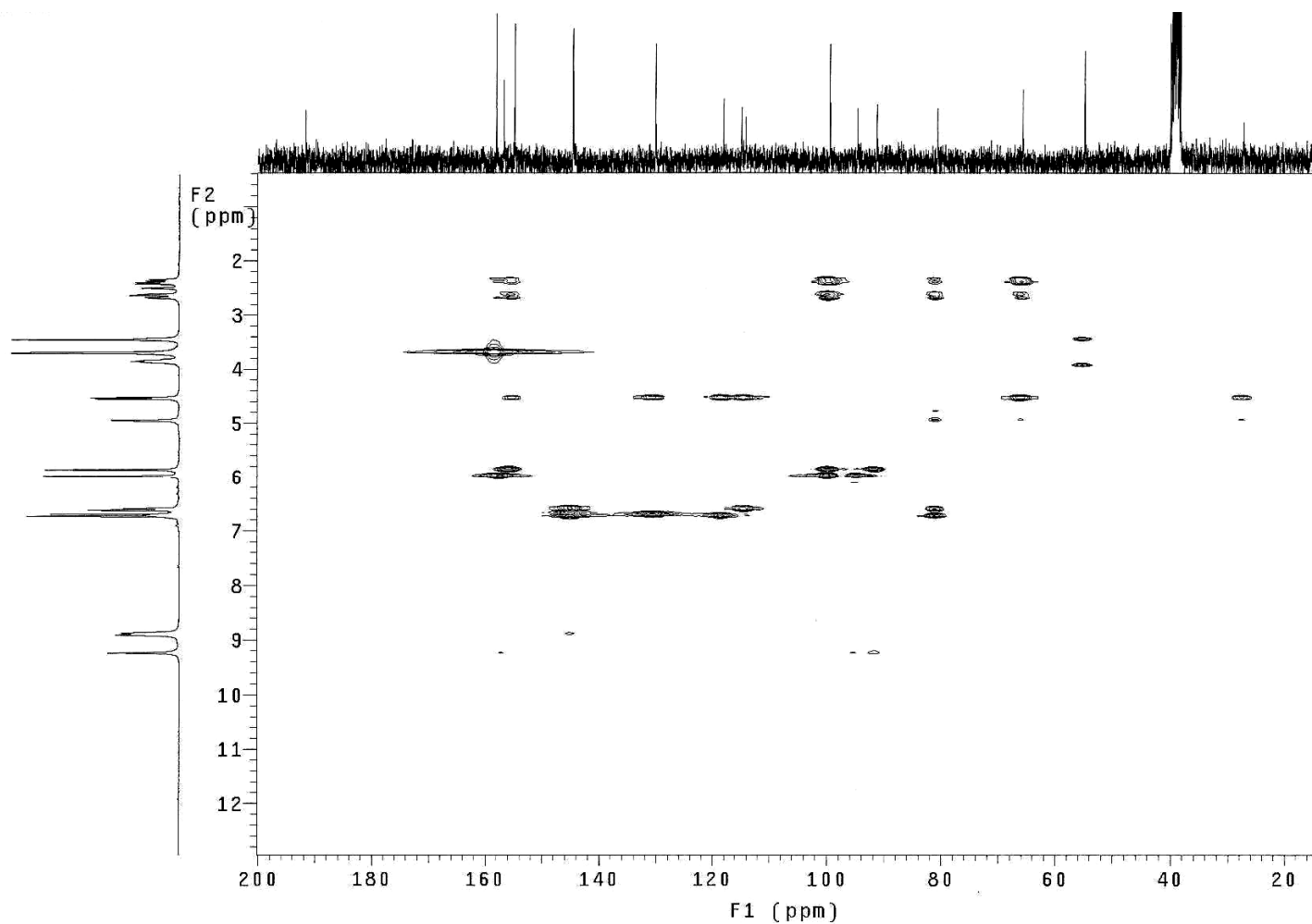
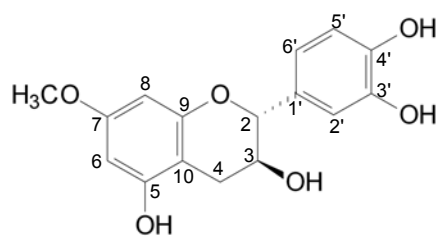


Figura 68 - Espectro $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) da substância S4 em DMSO- d_6 .

Tabela 24 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C obtido da substância S4 em DMSO- d_6 .

C/H	δ ^1H (mult, J (Hz))	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC)
2	4,53 (d) $^3J = 7,2$	81,0	H-4a e H-4b , H-2' , H-6' , H-5'
3	3,84 (m)	66,1	H-4a e H-4b, H-2
4a 4b	2,37 (dd) $^3J = 7,8$ e $^2J = 16,2$ 2,65 (dd) (dd) $^3J = 5,1$ e $^2J = 16,2$	27,5	H-2
5		157,0	H-4a e H-4b , H-6
6	5,85 (d) $^4J = 2,1$	95,1	H-8
7		158,3	OCH ₃ , H-8
8	5,97 (d) $^4J = 2,1$	91,7	H-6
9		155,1	H-4a e H-4b, H-2, H-8
10		99,9	H-4a e H-4b, H-8, H-6
1'		130,5	H-2, H-2' , H-5'
2'	6,72 (d) $^4J = 2,1$	114,5	H-2
3'		144,9	H-2' , H-5' , H-6'
4'		144,9	H-2' , H-5' , H-6'
5'	6,70 (d) $^3J = 8,1$	115,2	H-6'
6'	6,59 (dd) $^4J = 2,1$ e $^3J = 8,1$	118,4	H-2 , H-2' , H-5'
OCH ₃	3,70 (s)	55,2	

Comparando os resultados obtidos com os da literatura descritos por Bilia e colaboradores (1996), a substância S4 é o flavanol, derivado da catequina, é o 7-metóxi-(+)-catequina, com ponto de fusão 210-212°C, $[\alpha]_D + 10$ (c = 0,5, Me₂CO), fórmula molecular C₁₆H₁₆O₆ , fórmula estrutural demonstrada na Figura 69, solúvel em acetona e etanol a quente. Na literatura citada foi calculado apenas $[\alpha]_D + 15$ (c = 0,6, Me₂CO).

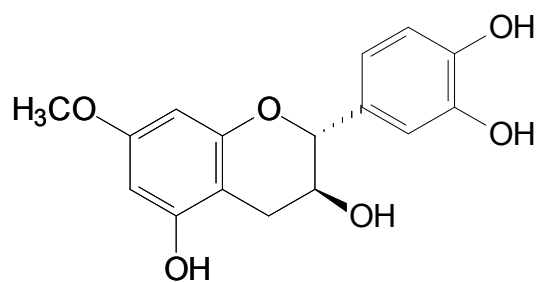


Figura 69 – Estrutura da 7-metóxi-(+)-catequina.

A catequina é um representante importante do grupo dos flavan-3-óis e exhibe inúmeros efeitos biológicos incluindo ação antiviral, antioxidante, antitrombótica (NEIVA *et al*, 2003). A substância S4 foi submetida a testes biológicos.

6.6 – Teste de atividade antimicrobiana

Foi observado nos testes de atividade antimicrobiana que os extratos em AcOEt e MeOH, apresentaram uma maior atividade quando comparados com o C₆H₁₂ para as bactérias testadas (Tabela 25).

Tabela 25 - Atividade antimicrobiana dos extratos brutos de *H. stigonocarpa* com halos de inibição em milímetros (mm) nas concentrações de 100 e 300 µg/mL.

Microorganismos	C ₆ H ₁₂		AcOEt		MeOH	
	100µg/mL	300µg/mL	100µg/mL	300µg/mL	100µg/mL	300µg/mL
<i>Staphylococcus aureus</i>	10	15	-	-	10	20
<i>Bacillus subtilis</i>	16	-	14	22	16	21
<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	-	10	16	-	10
<i>Escherichia coli</i>	-	-	10	14	-	9
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	-	-	23	30	19	23

Pettit e colaboradores em 2002 isolaram das folhas de *H. palustris* flavonóides com ação antimicrobiana. Desses flavonóides, a luteolina e o crisoeriol possuem atividade frente à bactéria Gram-positiva, *Enterococcus faecalis*, e a bactéria Gram-negativa, *Neisseria gonorrhoeae*.

Baseados nestes resultados e também nas atividades dos extratos de *H. stigonocarpa*, testou-se a atividade antimicrobiana de S1 e S4 buscando a concentração mínima inibitória (CMI) frente à bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus*, no qual obteve-se o valor de 128 µg/mL para ambos, sendo os resultados significantes, pois substâncias com CMI entre 100 e 500 µg/mL são consideradas moderadamente ativas (HOLETZ *et al.*, 2002).

O teste com os fungos fitopatógenos, apenas foi realizado com os extratos brutos. O extrato C₆H₁₂ na concentração de 4500µg/mL apresentou uma inibição frente ao *F. moniliforme* (2291) (Figura 70), com halo de inibição de 25mm. Com

este resultado o extrato em C_6H_{12} é considerado bom antifúngico frente ao *F. moniliforme*, pois possui uma halo de inibição > 16mm (MAHESH & SATISH, 2008).



Figura 70 - Efeito antifúngico do extrato C_6H_{12} frente ao *F. moniliforme*

O extrato em C_6H_{12} contém os ácidos graxos que possuem atividade frente à fitopatógenos (WALTERS, *et al.*, 2004). Liu e colaboradores (2008) constataram que a atividade de vários ácidos graxos, entre eles, os ácidos mirístico, oléico, linoléico, palmítico, frente à fitopatógenos está relacionada à inibição do crescimento micelial dos fungos.

6.7 - Teste de atividade larvicida

Apenas o extrato bruto C_6H_{12} apresentou atividade frente à larva do mosquito *A. aegypti* com valor de DL_{50} 296 ppm. Neste extrato foram identificados os ácidos palmítico, mirístico, oléico, linoléico que possuem comprovada atividade larvicida frente ao *A. aegypti* (RAMSEWAK *et al.*, 2001; LEITE *et al.*, 2009). O valor da DL_{50} para o extrato C_6H_{12} foi considerado significativo por se tratar de extrato bruto. Extratos brutos são considerados ativos frente à larva do mosquito *A. aegypti*, quando a $DL_{50} < 500$ ppm (CICCIA *et al.*, 2000). O valor da DL_{50} foi calculado estatisticamente (Probit Analysis) e construída a curva dose x resposta (Figura 71).

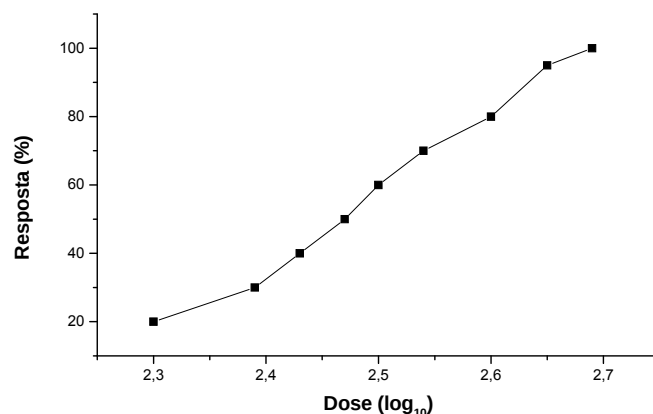


Figura 71 – Curva dose x resposta do extrato cicloexano frente ao *A. aegypti*.

O extrato em AcOEt não apresentou atividade larvica, porém um dos flavonóides isolados (S1) deste extrato, apresentou atividade com o valor DL₅₀ 237 ppm, calculado estatisticamente (Probit Analysis). Na Figura 72 tem-se o gráfico da curva dose x resposta da substância S1. Flavonóides possuem atividade larvica frente ao *A. aegypti*, entretanto, dos citados na literatura todos possuem DL₅₀ < 123 ppm (HO *et al.*, 2003; RAJKUMAR & JEBANESAN, 2008). Nenhum estudo de atividade biológica foi conduzido anteriormente com a substância S1.

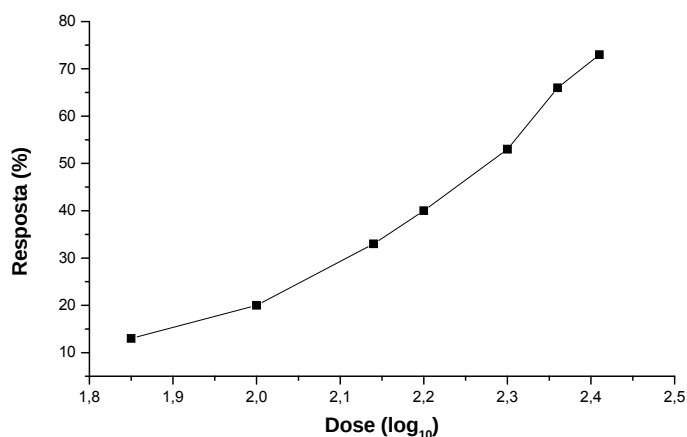
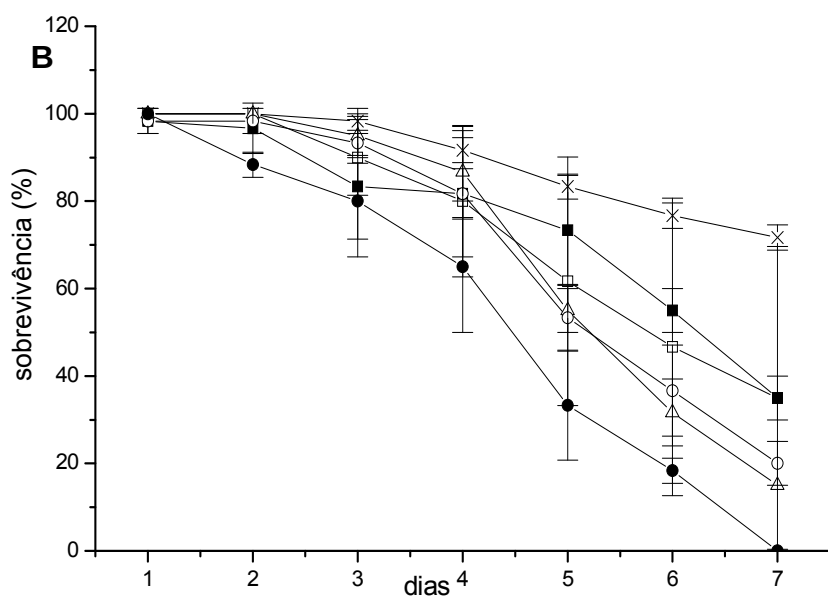
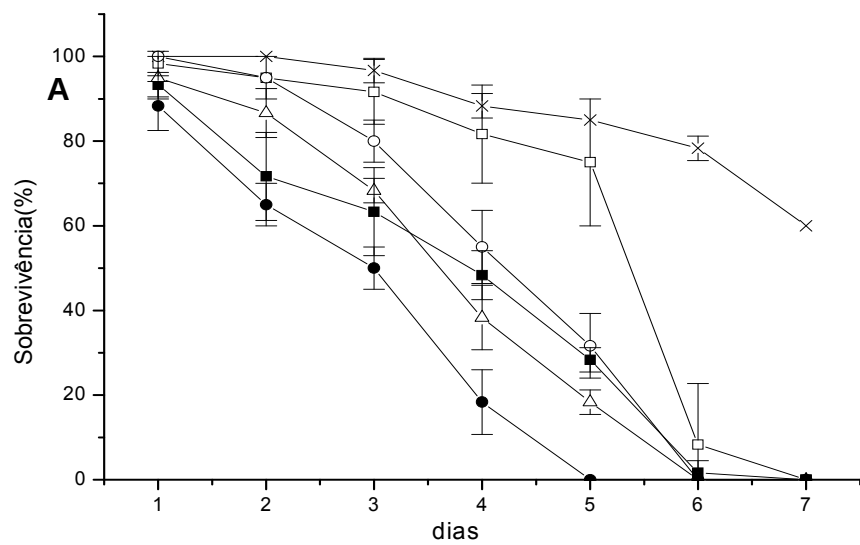


Figura 72 – Curva dose x resposta da substância S1 frente ao *A. aegypti*.

6.8 – Teste de atividade antitermítica

Na Figura 73 pode-se verificar a porcentagem de sobrevivência dos *N. corniger* quando expostos aos extratos brutos do cerne de *H. stigonocarpa*.



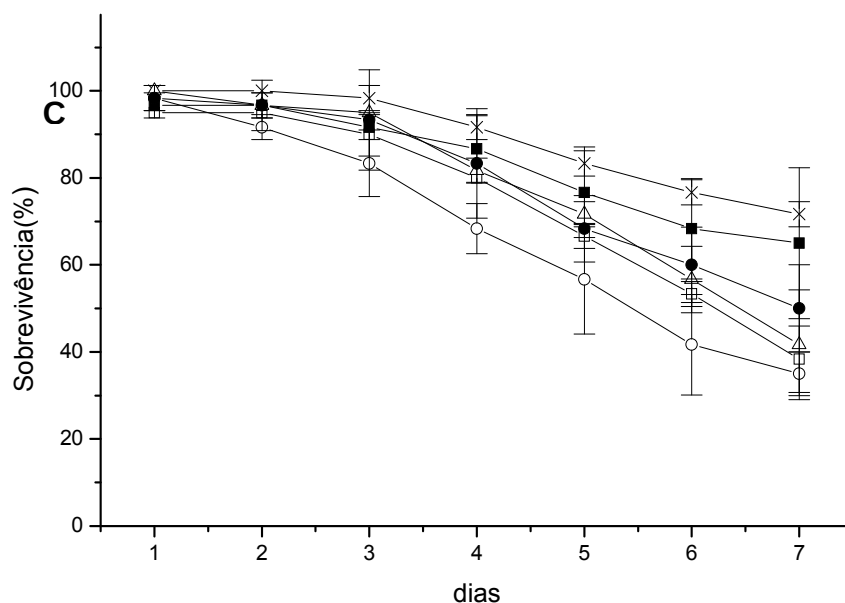


Figura 73 - Efeito dos extratos da Madeira de *H. stigonocarpa* frente ao *N. corniger*. Extrato cicloexano (A), AcEOt (B) e extrato metanólico (C). Com concentrações de 6,25 (□), 12,5 (■), 25 (Δ), 50 (○) e 100 (●) mg/mL. Controle negativo (x) em A com clorofórmio e B e C em acetona. Os pontos estão representados com média do desvio padrão.

Todos os extratos apresentaram atividade frente aos térmitas. Os flavonóides, taxifolina e quercetina, presentes no extrato em AcOEt, possuem atividade “antifeedant” (inibi a alimentação) frente aos térmitas (MARIMOTO *et al.*, 2000 ; OHMURA *et al.*, 2000). Isto justifica a atividade do extrato em AcOEt e dos compostos isolados, não tóxicos, nem repelentes. O extrato C_6H_{12} foi o que apresentou maior atividade; durante a realização do teste foi constatado que este extrato não possui toxicidade, nem repelência, acreditando assim, que também deve ter atividade “antifeedant”, apesar dos constituintes químicos não serem flavonóides. Como os ácidos graxos possuem atividade larvicida e antimicrobiana, é provável que também possuam atividade frente aos cupins. O extrato MeOH apresentou fraca atividade frente aos cupins comparado com os demais.

6.9 - Teste de biodegradação da madeira pelo fungo de podridão-branca

No estudo de biodegradação da madeira *in vitro*, pelo fungo da espécie *Phanerochaete chrysosporium*, responsável pela podridão-branca, foi observado que

H. stigonocarpa apresentou resistência à proliferação do fungo. Na madeira para controle abiótico não foi verificado qualquer alteração.

Observou-se que *P. chrysosporium* cresce melhor na madeira livre de extrativo do que na madeira com extrativos, no entanto o padrão de crescimento do fungo varia de acordo com o tipo de madeira. A resistência natural das madeiras é conferida pelos seus metabólitos secundários (OLIVEIRA *et al.*, 2005).

6.10 - Determinação de Fenóis Totais

O método de Folin-Ciocalteu foi o utilizado para determinar a quantidade de fenóis totais, através da equação da reta (6) obtida da curva padrão do ácido gálico (Figura 74) e expressa em mg de equivalentes de ácido gálico (EAG) / g de extrato. Sendo o coeficiente de correlação para a curva obtida de $R^2 = 0,91423$.

O reativo de Folin-Ciocalteu na presença de composto fenólico muda a coloração de amarela para azul e a intensidade da coloração azul é maior quanto maior a quantidade de compostos fenólicos na solução, sendo necessário medir a absorbância.

$$Y = 0,00881X + 0,04226 \quad (6)$$

As absorbâncias medidas para as amostras estão representadas pelo Y e as concentrações dos fenóis totais em $\mu\text{g/mL}$, pelo X.

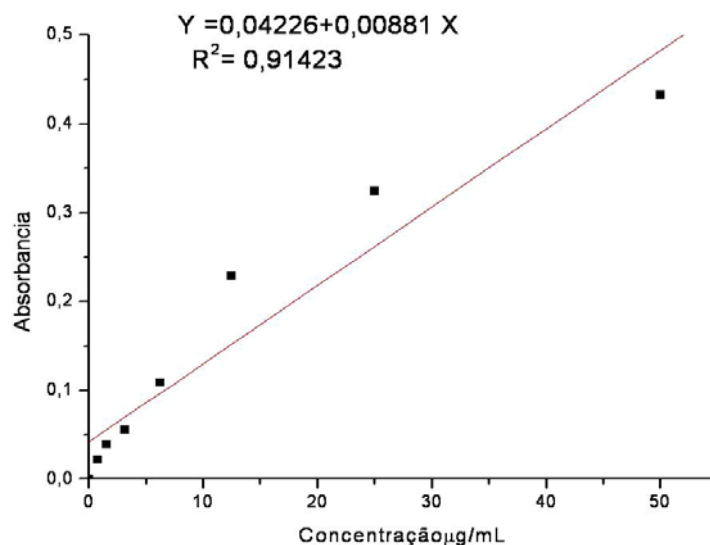


Figura 74 - Gráfico da curva padrão do ácido gálico

Os valores de fenóis totais estão apresentados na Tabela 26.

Tabela 26 - Quantificação de fenóis totais em equivalente de ácido gálico.

Amostras	Fenóis totais
<i>Delonix regia</i>	0,092 ± 0,007
<i>Hymenaea stigonocarpa</i>	0,248 ± 0,009

Equivalente de ácido gálico (EAG) em mg/g do extrato da amostra.

É possível observar que *H. stigonocarpa* apresenta maior quantidade de fenóis totais que *Delonix regia*, utilizada como padrão, que segundo a literatura apresenta uma baixa resistência à degradação (MENEGETTI, 2003). Segundo Queiroz e colaboradores (2002) uma elevada quantidade de extrativos fenólicos é um dos principais responsáveis pela resistência natural de madeiras à degradação química e biológica.

6.11 - Determinação de Lignina Insolúvel e Solúvel

Na determinação de lignina insolúvel em ácido descrita na Tabela 27, observa-se que *D. regia* apresenta um percentual mais baixo que a *H. stigonocarpa*. Segundo os valores da literatura a lignina insolúvel na madeira varia entre 26,0 - 35,6 %. Os resultados deste trabalho condizem com os dados da literatura.

Tabela 27 - Percentual de lignina total.

Amostras	LS (%)	LI (%)	LT (%)
<i>D. regia</i>	0,3 ± 0,1	22,0 ± 1,0	22,3 ± 1
<i>H. stigonocarpa</i>	0,6 ± 0,4	27,0 ± 1,0	28,0 ± 1

LS – lignina solúvel LI – lignina insolúvel LT – lignina total

As espécies de *H. courbaril* e *H. parvifolia* apresentaram 30,3 e 28,4 % de lignina insolúvel respectivamente (SANTANA & OKINO, 2007). Sabe-se que a lignina é o terceiro maior constituinte das madeiras. Sendo um dos responsáveis pela resistência das madeiras, uma vez que sua composição química é formada de grupos fenólicos. Compostos estes, que são tóxicos para organismos xilófagos.

Portanto, o valor mais elevado de lignina insolúvel encontrado para *H. stigonocarpa* pode ser um dos fatores responsáveis pela resistência desta madeira.

A análise de lignina solúvel (Tabela 27) forneceu como resultado que, a madeira com maior valor de lignina solúvel foi *H. stigonocarpa*. Segundo Santana e Okino (2007) os valores obtidos para 36 espécies de madeiras tropicais variaram entre 0,66% e 1,81%. Os resultados obtidos neste trabalho enquadram-se com os obtidos na literatura para lignina solúvel (SANTANA & OKINO, 2007).

Os valores de lignina solúvel bem como fenóis totais encontrados para *H. stigonocarpa* foram maiores quando comparados com *D. regia*. Estes resultados comprovam que *H. stigonocarpa* é madeira de alta resistência ao ataque de organismos xilófagos.

Todos os resultados obtidos são inéditos se tratando do cerne de *H. stigonocarpa*.

6.12 – Teor de umidade de *Hymenaea stigonocarpa*

Os resultados do teor de umidade demonstraram que *H. stigonocarpa* apresentou um valor de umidade relativamente baixo quando comparada com a *D. regia* (Tabela 28).

A presença de água na madeira influi na diminuição da resistência física e biológica e favorece o crescimento dos organismos xilófagos (KLOCK, *et al.*, 2005). Segundo Gonzaga (2006) o crescimento de fungos apodrecedores é favorecido pelo teor de umidade acima de 20%. Porém, verificou-se que madeira com teor de umidade menor que 20% como *D. regia*, sofre ataque de organismos xilófagos. Apenas o teor de umidade não é suficiente para identificar a resistência da madeira.

Tabela 28 - Percentual de umidade das madeiras

Amostras	Umidade (%)
<i>Delonix regia</i>	13,0 ± 2,00
<i>Hymenaea stigonocarpa</i>	9,60 ± 0,05

7 – CONCLUSÕES

- ❖ O extrato cicloexano do cerne de *H. stigonocarpa* possui atividade biológica antimicrobiana, larvicida e antitermítica.
- ❖ Os extrato AcOEt e MeOH de *H. stigonocarpa* possuem atividade antibacteriana e antitermítica.
- ❖ A abordagem fitoquímica indicou a presença de flavonóides, esteróides e terpenos no cerne de *H. stigonocarpa*.
- ❖ Todos compostos isolados são inéditos no cerne de *H. stigonocarpa*, uma vez que não há estudo anterior com o cerne desta planta.
- ❖ Os flavonóides, 7-metoxi-catequina, hultenina, taxifolina e quercetina, foram identificados através dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C uni e bi-dimensionais.
- ❖ A substância S1 é uma flavanona (3-metóxi-3',4',5,7-tetrahidróxiflavanona) com atividade larvicida frente ao *A. Aegypti*.
- ❖ Os ácidos graxos palmítico, mirístico, oléico e linoléico, foram identificados por CG-MS provenientes do extrato ciclohexânico. E possuem atividade larvicida frente ao *A. aegypti* bem como ao fungo fitopatógeno *F. moniliforme*.
- ❖ O teor de fenóis totais associado aos metabólitos secundários presentes no cerne da madeira são os responsáveis pela resistência das madeiras ao ataque de organismos xilófagos.

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASTM METHODS, D271-48. **Standard test methods for lignin in wood.** 1956.

ABDEL-KADER, M., BERGER, J. M., SLEBODNICK, C., HOCH, J., MALONE, S., WISSE, J. H., WERKHOVEN, M. C. M., MAMBER, S., KINGSTON, D. G. I. Isolation and absolute configuration of ent-halimane diterpenoids from *Hymenaea courbaril* from the Suriname rain forest. **Journal of Natural Products**, 65: 1, 11-15, 2002.

BAUER, A. W., KIRBY, W. M., SHERRIS, J. C., TURCK, M. Antibiotic Susceptibility testing by a standardized single disk method. **Journal Clinical Pathology**, 45:4, 493-496, 1966.

BARRICHELO, L. E. G., BRITTO, J. O. **Química da madeira - Manual Didático.** Centro Acadêmico "Luiz de Queiróz". USP - Piracicaba. 1989.

BILIA, A. R., MORELLI, I., HAMBURGUER, M., HOSTTMANN, K. Flavans and a tipe proanthocyanidins from *Prunus prostata*. **Phytochemistry**, 43:4, 887-892, 1996.

BREITMAIER, E. **Structure elucidation by NMR in organic chemistry.** 3^a ed., John Wiley & Sons Ltd, England, 2002.

BUCKINGHAM, J. **Dictionary of Natural Products.** London: Chapman & Hall, 1993.

BUSATO, A. P., VARGAS-RECHIA, G., REICHER, Fany. Xyloglucan from the leaves of *Hymenaea courbaril*. **Phytochemistry**, 58, 525-531, 2001.

CALONEGO, F. W., BATISTA, W. R., SEVERO, E. T. D., SANTOS, J. E. G. RIBAS, C. Avaliação do teor de umidade da madeira de *Eucalyptus grandis* por

medidores elétricos resistivos. **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, 18, 71-78, 2006.

CARVALHO, P. E. Espécies Arbóreas Brasileiras. **Revista da madeira**, 86:14, 2004.

CHEN, Z., LIU, Y. -M., YANG, S., SONG, B. -A., XU, G. -F., BHADURY, P. S., JIN, L. -H., HU, D. -Y., LIU, F., XUE, W., ZHOU, X. Studies on the chemical constituents and anticancer activity of *Saxifraga stolonifera* (L) Meeb. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 16, 1337–1344, 2008.

CHENG, S. -S., CHANG, H. -T., WU, C. -L., CHANG, S. -T. Anti-termite activities of essential oils from coniferous trees against *Coptotermes formosanus*. **Bioresource Technology**, 98, 456-459, 2007.

CHIMELO, J. P. **Anatomia da madeira**. In: LEPAGE, Ennio Silva. Manual de preservação de madeiras. 2.ed. São Paulo: IPT., 41-67/ 99-278. 1989.

CICCIA, G., COUSSIO, J., MONGELLI, E. Insecticidal activity against *Aedes aegypti* larvae of some medicinal South American plants, **Journal of Ethnopharmacology**, 72, 185–189, 2000.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das Plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Ministério da Agricultura, IBDF, Imprensa Nacional, Rio de Janeiro, 593-599, 1984.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. v. III, 2^a ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1982.

COXON, D. T. Phytoalexins from other families. In: **Phytoalexins**. Ed. J. A. Bailey and J. W. Mansfield. Glasgow, 21-80, 1982.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products – A Biosynthetic Approach**. John Wiley & Sons, New York, 1997.

ELISABETSKY, E., COSTA-CAMPOS, L. Medicinal plant genetic resources and international cooperation the Brazilian perspective. **Journal of Ethnopharmacology**. 51, 111-120, 1996.

FARIAS, D. I. A., EDWARDS, H. G. M., AFONSO, M. C., BRODY, R. H., MORAIS J. L Raman spectroscopic analysis of a *tembetá*: a resin archaeological artefact in need of conservation. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**. 60: 7, 1505-1513, 2004.

FERRAZ, A., RODRIGUEZ, J., FREER, J., BAEZA, J. Biodegradation of *Pinus radiata* softwood by white- and brown-rot fungi. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, 17, 31-34, 2001.

FURTADO, M. R. Cresce o uso de aditivos de bactérias e fungos para tratar efluentes e biorremediar solos. **Biotecnologia – Química e Derivados**. 389, 2001.

GONZAGA, A. L. Madeira - uso e conservação. **IPHAN/MONUMENTA**, Cadernos Técnicos 6, 2006.

HARBONE, J. B. **Introduction to Ecological Biochemistry**, London: Academic Press, 3^a ed. 1988.

HARBONE, J. B., MABRY, T. J. **The flavonoids: advances in research**. New York: Chapman and Hall Ltd, 1982.

HO, S. H., WANG, J., SIM, K.Y., Ee, G.C.L., IMIYABIR, Z., YAP, K.F., SHAARI, K., GOH, S. H. Meliternatin: a feeding deterrent and larvicidal polyoxygenated flavone from *Melicope subunifoliolata*. **Phytochemistry**, 62, 1121-1124, 2003.

HOLETZ, F. B., PESSINI, G. L., SANCHES, N. R., CORTEZ, D. A. G., NAKAMURA, C. V., DIAS FILHO, B. P. Screening of Some Plants Used in the

Brazilian Folk Medicine for the Treatment of Infectious Diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 97:7, 1027-1031, 2002.

IMAI, T., INOUE, S., OHDAIRA, N., MATSUSHITA, Y., SUZUKI, R., SAKURAI, M., JESUS, J. M. H., OZAKI, S. K., FINGER, Z., FUKUSHIMA, K. Heartwood extractives from the Amazonian trees *Dipteryx odorata*, *Hymenaea courbaril*, and *Astronium lecointei* and their antioxidant activities. **Journal Wood Science**, 54, 470-475, 2008.

INGHAM, J. L. Phitoalexins from the Leguminosae. In: **Phytoalexins**. Ed. J. A. Bailey and J. W. Mansfield. Glasgow: Blackie, 1982.

ISHIBASHI, M., ODA, H., MITAMURA, M., OKUYAMA, E., KOMIYAMA, K., KAWAGUCHI, K., WATANABE, T., ALVES, S. M., MAEKAWA, T., OHTSUKI, K. Casein kinase II inhibitors isolated from two Brazilian plants *Hymenaea parvifolia* and *Wulffia baccata*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters** 9: 15, 2157-2160, 1999.

ISTEK, A., SIVRIKAYA, H., EROGLU, H., GULSOY, S. K. Biodegradation of *Abies bornmülleriana* (Mattf.) and *Fagus orientalis* (L.) by the white-rot fungus. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 55, 63-67, 2005.

JUDD, S. W., CAMPBELL, S. C., KELLOG, E. A., STEVENS, P. S. In: O GÊNERO *Copaifera* L. **Química Nova**, 25: 2, 273-286, 2002.

KANG, H. Y., MATSUSHITA, N., SAMESHINA, K., TAKAMURA, N., Termite resistance test of hardwoods of Kochi growth. The strong termitidal activity of kagonoki (*Litsea coreana* L' eveill'e). **Mokuzai Gakkaishi** 36, 78-84, 1990.

KLOCK, U., MUÑIZ, G. I. B., HERNANDEZ, J. A., ANDRADE, A. S. **Química da Madeira**. Curitiba: Fundação de Pesquisas Florestais do Paraná – Fupef, 2005.

KONEMAN, E. W., ALLEM, S. D., DOWELL, V. R., JAIHA, W. M., SOMEMMERS, H. M., WIMN, C. W. W. **Diagnóstico microbiológico médico**. J.B. Lippincott co. 570, 1997.

KORB, J. Termites. **Current Biology**, 17, 995-999, 2007.

KUO, Y. -H., YEH, M. -H., HUANG, S. -L. Anovel 6-butyl-3-hydroxyflavanone from heartwood of *Bauhinia purpurea*. **Phytochemistry**. 49: 8, 2529-2530, 1998.

LANGENHEIM J. H., CONVIS C. L., MACEDO, C. A., STUBBLEBINE, W. H. *Hymenaea* and *Copaifera* leaf sesquiterpenes in relation to lepidopteran herbivory in southeastern Brazil. **Biochemical Systematics and Ecology**. 14: 1, 41-49, 1986.

LEHNINGER, A.L. **Bioquímica**. São Paulo: Editora Edgard Blucher Ltda, 2ª. Ed. 1998.

LEITE, J. J. G., BRITO, E. H. S., CORDEIRO, R. A., BRILHANTE, R. S. N. B., SIDRIM, J. J. C., BERTINI, L. M., DE MORAIS, S. M., ROCHA, M. F. G. Chemical composition, toxicity and larvicidal and antifungal activities of *Persea americana* (avocado) seed extracts. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 42: 2,110-113, 2009.

LELIS, A. T. Termite problem in São Paulo City-Brazil. In: LENOIR, A., ARNOLD, G., LEPAGE, M., (Eds.), **Proceedings of the 12th Congress of the International Union for the Study of Social Insects-IUSSI**, Paris, 42-46, 1994.

LELIS, A.T., BRAZOLIN, S., FERNANDES, J. L. G., LOPEZ, G. A. G., MONTEIRO, M. B. B., ZENID, G. **Biodeterioração de madeiras em edificações**, São Paulo: IPT, 54, 2001.

LEPAGE, E. S. Química da Madeira. In: **Manual de preservação de madeiras**, São Paulo: IPT, 69-97, 1986.

LIMA, N. N., VARGAS-RECHIA, C. G., GANTER, J. L. M. S., REICHER, F., SIERAKOWSKI, M. R. Oligosaccharides derived from the xyloglucan isolated from the sedes of hymenaea courbaril var. stilbocarpa. **International Journal of Biological Macromolecules**. 17: 6, 413-416, 1995.

LIU, S., RUAN, W., LI, J., XU, H., WANG, J., GAO, Y., WANG, J. Biological control of phytopathogenic fungi by fatty acids. **Mycopathologia**, 166, 93–102, 2008.

MAGALHÃES, F. A., TOZZI, A. G. A.M., SALES, N.L.H.B., MAGALHÃES, G. E. Twnty-three flavonoids from *Lonchocarpus subglaucescens*. **Phytochesmistry**, 42: 5, 1459-1471, 1996.

MAGALHÃES, F. A., TOZZI, A. G. A.M., SALES, N. L. H.B., MAGALHÃES, G. E., NOGUEIRA, A. M., QUEIROZ, C.N.S. Flavonoids from *Lonchocarpus latifolius* roots. **Phytochemistry**, 55, 787-792, 2000.

MAHESH, B., SATISH, S. Antimicrobial activity of some important medicinal plant against plant and human pathogens. **World Journal of Agricultural Sciences**, 4, S, 839-843, 2008.

MANSFIELD, J. W. In: Preformed Antimicrobial Compounds and Plant Defense against Fungal Attack. **The Plant Cell**, 8: 1821-1831. 1996.

MARIMOTO, M., KUMEDA, S., KOMAI, K. Insect Antifeedant Flavonoids from *Gnaphalium affine* D. Don. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 48, 1888-1891, 2000.

MARGIS-PINHEIRO, M., MARTIN, C., DIDIERJAN, L., BURKARD, G. Differential expression of bean chitinase genes by virus infection, chemical treatment and UV irradiation. **Plant Molecular Biology**, 22: 659-668, 1993.

MARSAIOLI, A. J., LEITÃO FILHO, H. F., DE CAMPELO, J. P. Diterpenes in bark of *Hymenaea courbaril*. **Phytochemistry** 14: 1882-1883, 1975.

MARTIN, S. S., LANGENHEIM, J. H., ZAVARIN, E. Sesquiterpenes in leaf pocket resin of *Hymenaea courbaril*. **Phytochemistry**. 11: 3049-3051, 1972.

MATEUS, T. **Bases para dimensionamento de estrutura de madeira** memória nº 179, Lisboa: LNEC 1961.

MENEGHETTI, G. I. P. Estudo de dois métodos de amostragem para inventário da arborização de ruas dos bairros da orla marítima do município de Santos, SP. **Dissertação** – Recursos Florestais - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, SP, 2003.

MONTANARI, C. A., BOLZANI, V. S. Planejamento racional de fármacos baseados em produtos naturais. **Química Nova**, 24: 1, 105-111, 2001.

NEIVA, T. J. C., MACHADO, M. J., HOEHN, M. *et al.* Evaluation of platelet aggregation in platelet concentrates: storage implications. **Revista Brasileira Hematol. Hemoter**, 25: 4, 207-212, 2003.

NOGUEIRA, R. T.; SHEPHERD, G. J.; LAVERDE JR, A.; MARSAIOLI, A. J.; IMAMURA, P. M. Clerodane-type diterpenes from the seed pods of *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa*. **Phytochemistry**. 58: 1153-1157, 2001.

OHMURA, W., DOI, S., AOYAMA, M. Antifeedant activity of flavonoids and related compounds against the subterranean termite *Coptotermes formosanus* Shiraki. **Journal of Wood Science**, 46, 149-153, 2000.

OLIVEIRA, A.M.F., LELIS, A. T., LEPAGE, E. S., CARBALLERA LOPEZ, G. A., OLIVEIRA, L. C. S., CANEDO, M. D., MILANO, S. Agentes destruidores da madeira. In: **Manual de preservação de madeiras**. São Paulo: IPT, 99-275, 1986.

OLIVEIRA, J. T. S., SOUZA, L. C., LUCIA, R. M. D., SOUZA JÚNIOR, W. P. Influência dos extrativos na resistência ao apodrecimento de seis espécies de madeira. **Revista Árvore**, 29:5, 819-826, 2005.

PAES, J. B. Efeitos da purificação e do enriquecimento do creosoto vegetal em suas propriedades preservativas. **Tese de Doutorado em Ciência Florestal** – Universidade Federal de Viçosa, MG, 1997.

PAES, J. B., MORAIS, V. M., LIMA, C. R. Resistência das madeiras de aroeira (*Myracrodruon urundeuva*), cássia (*Senna siamea*) e ipê (*Tabebuia impetiginosa*) a fungos e cupins xilófagos em condições de laboratório. **Floresta e Ambiente**, 9, 135-144, 2002.

PAES J. B.; MORAIS, V. M.; SOBRINHO, D.W.BAKKE, O. Natural resistance of nine Brazilian semi-arid regions tree species to subterranean termites, under laboratory condition. **Cerne** 9, 36-47, 2003.

PAES J. B., MORAIS, V. M., LIMA, C. R. Resistência natural de nove madeiras do semi-árido brasileiro a fungos causadores da podridão-mole **Revista Árvore**, 29: 3, 365-371, 2005.

PASSINI, A., CAPELO, S. M. J., OLIVEIRA, R. C. Ensaios preliminares para avaliação da eficiência de óleo de neem no controle de *Oligonychus yotheri* (Acari: Tetranychidae). **Semina: Ciências Agrárias**, 24:2, 315-316, 2003.

PETTIT, G. R., MENG, Y., STEVENSON, C. A., DOUBEK, D. L., KNIGHT, J. C., CICHACZ, Z., PETTIT, R. K., CHAPUIS, J.-C., SCHMIDT, J. M. Isolation and structure of Palstatin from the Amazon tree *Hymenaea palustris*. **Journal of Natural Product**, 66:2, 259-262, 2003.

QUEIROZ, C. R. A., MORAIS, S. A. L., NASCIMENTO, E. A. Caracterização dos taninos da aroeira-preta (*Myracrodruon urundeuva*). **Revista Árvore**, 26:4, 493-497, 2002.

RAHUMAN, A. A., VENKATESAN, P., GOPALAKRISHNAN, G. Mosquito larvicidal activity of oleic and linoleic acids isolated from *Citrullus colocynthis* (Linn.) **Schrad. Parasitology Research**, 103, 1383-1390, 2008.

RAJKUMAR, S., JEBANESAN, A. Bioactivity of flavonoid compounds from *Poncirus trifoliata* L. (Family: Rutaceae) against the dengue vector, *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). **Parasitology Research** , 104, 19–25, 2008.

RAMSEWAK, R. S., NAIR, M. G., MURUGESAN, S., MATTSON, W. J., ZASADA, J. Insecticidal Fatty Acids and Triglycerides from *Dirca palustris*. **Journal Agricultural Food Chemistry**, 49, 5852-5856, 2001.

REICHER, F., VARGAS-RECHIA, C. G., BUSATO, A. P. Xyloglucan from the leaves of *Hymenaea courbaril*. **Phytochemistry**. 58, 525-531, 2001.

RICHTER, H. G., BURGER, L.M. **Anatomia da Madeira**. Curitiba: Editora da UFPR, 2^a. Ed., 1978.

SANTANA, M. A. E., OKINO, E. Y. A. Chemical composition of 36 Brazilian Amazon forest wood Species, **Holzforschung**, 61, 469–477, 2007.

SANTIAGO, G. M. ., VIANA, F. A., PESSOA, O. D. L., SANTOS R. P., POULIQUEN Y. B. M., ARRIAGA, A. M. C., ANDRADE-NETO, M., BRAZ-FILHO, R. Avaliação da atividade larvica de saponinas triperpênicas isoladas de *Pentaclethra macroloba* (Willd.) Kuntze (Fabacea) e *Cordia piauhiensis* Fresen (Boraginaceae) sobre *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 15:3, 187-190. 2005.

SASAYA, T. Flavonoids of willow wood. **Enshurin Kenkyu Hokoku**, 24:1, 177-234, 1965.

SENEVIRANTE, G. I, HARBORNE, J. B. In: Phytoalexins: What have we learned after 60 years? **Annual Review of Phytopathology**, 37, 285-306, 1999.

SERPA, F. G. Cupim, uma ameaça a Olinda, patrimônio da humanidade. São Paulo: **ABPM**, Boletim 40, 8, 1986.

SILVA, A. C. **Madeiras da Amazônia: Características Gerais, nome vulgar e usos**. Manaus: Copyright, 2002.

SILVA, C. A. Análise da composição da madeira de *Caesalpinia echinata* Lam. (Pau-Brasil): subsídios para o entendimento de sua estrutura e resistência a organismos xilófagos. **Tese de Doutorado em Biologia**, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, 2007a.

SILVA, J. C., LOPEZ, A. G. C., OLIVEIRA, J. T. S. Influência da idade na resistência natural da madeira de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex. Maiden ao ataque de cupim de madeira seca (*Cryptotermes brevis*). **Revista Árvore** 28, 583-587, 2004.

SILVA, M. R., SILVA, M. A. A. P., CHANG, Y. K. Utilização da farinha de jatobá (*Hymenaea stigonocarpa* mart.) na elaboração de biscoitos tipo cookie e avaliação de aceitação por testes sensoriais afetivos univariados e multivariados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. 18: 1, Campinas Jan/Abr, 1998.

SILVA, H. H. G., GERIS, R., RODRIGUES FILHO, E., ROCHA, C., SILVA, I. G. Atividade larvicida das frações do óleo-resina da planta medicinal brasileira *Copaifera reticulata* Ducke (Leguminosae-Caesalpinoideae) sobre o *Aedes aegypti* (Díptera, Culicidae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 40: 3, 264-267, 2007b.

SILVERSTEIN, R. M., WEBSTER, F. X., KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. Rio de Janeiro: LTC Editora, 7ª ed., 2006.

SIMÕES, K., DU, J., PESSONI, R. A. B., CARDOSO-LOPES, E. M., VIVANCO, J. M., STERMITZ, F. R.; BRAGA, M. R. Ipomopsin and hymenain, two biscoumarins from seeds of *Hymenaea courbaril*. **Phytochemistry Letters**, 2, 59-62, 2009.

SOARES, F. P., PAIVA, R., NOGUEIRA, R. C., OLIVEIRA, L. M., PAIVA, P. D. O., SILVA, D. R. G. Cultivo e usos do Nim (*Azadirachta indica* A. Juss). **Lavras: Boletim Agropecuário**, 68, 1-14, 2006.

SOLOMONS, T. W. G. **Química Orgânica 2**. Rio de Janeiro: LTC Editora, 6ª ed., 1996.

STUMPP, E., RECH, V., SATTLER, M. A, BARROS, N. M., ABITANTE, A.L. Avaliação de sustentabilidade e eficácia de tratamentos preservantes naturais de madeiras de florestas plantadas no Rio Grande do Sul para o controle do cupim. **Ambiente Construído** 6, 21-31, 2006.

TAO, L., WANG, Z. -T., ZHU, E. -Y., LU, Y. -H., WEI, D. -Z. HPLC analysis of bioactive flavonoids from the rhizome of *Alpinia officinarum*. **South African Journal of Botany** 72, 163-166, 2006.

TAPPI TEST METHOD T 222 OM-88, Acid-insoluble lignin in wood and pulp, In: Tappi Test Methods. **Atlanta: Tappi Press**, 1999.

THIELE, V. O. W. **Lipide, isoprenoide mit Steroiden**. Stuttgart: Thieme, 1979.

VASCONCELOS, J. N., LIMA, J.Q., LEMOS, T. L. G., OLIVEIRA, M. C. F., ALMEIDA, M. M. B., ANDRADE-NETO, M., MAFEZOLI, J., ARRIAGA, A. M. C., SANTIAGO, M. P., BRAZ-FILHO, R. Estudo químico e biológico de *Tephrosia toxicaria* Pers. **Química Nova**, 32: 2, 382-386, 2009.

VANETTEN, H.D., MANSFIELD, J.W., BAILEY, J.A., FARMER, E.E. In: Preformed Antimicrobial Compounds and Plant Defense against Fungal Attack. **The Plant Cell**, 8, 1821-1831, 1996.

VIEGAS JR., C. Terpenos com atividade inseticida: Uma alternativa para o controle químico de insetos. **Química Nova**, 26: 3, 390-400, 2003.

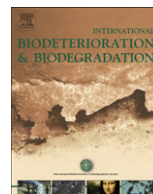
WALTERS, D., RAYNOR, L., MITCHELL, A., WALKER, R., WALKER, K. Antifungal activities of four fatty acids against Plant Pathogenic fungi. **Mycopathologia**, 157, 87–90, 2004.

WATERMAN, P. G., SIMON, M. **Analysis of phenolic plant metabolites**, London: Blackwell Scientific Publications, 1994.

W.H.O. Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides. **World Health Organization**, VBC 81.807, 1985.

ZUANAZZI, J. A. S. In: **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 3^a ed., Editora da UFSC, 2001.

ANEXOS



Antitermitic activity of extractives from three Brazilian hardwoods against *Nasutitermes corniger*

Andréa L.B.D. Santana^a, Cláudia A. Maranhão^a, Jefferson C. Santos^a, Franklin M. Cunha^c,
Gonçalo M. Conceição^d, Lothar W. Bieber^a, Márcia S. Nascimento^{b,*}

^a Departamento de Química Fundamental-CCEN, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50670-901 Recife, Pernambuco, Brazil

^b Departamento de Antibióticos-CCB, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50670-901 Recife, Pernambuco, Brazil

^c Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Dois Irmãos, 52171-030 Recife, Pernambuco, Brazil

^d Centro de Estudos Superiores de Caxias, Universidade Estadual do Maranhão, 65000-000 Caxias, Maranhão, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 May 2009

Received in revised form

11 July 2009

Accepted 16 July 2009

Available online 16 December 2009

Keywords:

Bowdichia virgilioides

Hymenaea stigonocarpa

Anadenanthera colubrina

Antitermitic activity

Nasutitermes corniger

ABSTRACT

Antitermitic activity of extractives from three Brazilian hardwoods timber known for their high resistance to biodegradation, *Bowdichia virgilioides*, *Anadenanthera colubrina*, and *Hymenaea stigonocarpa*, were evaluated in laboratory tests against termites *Nasutitermes corniger*. The data obtained in this study suggest that all extracts tested contained antitermitic compounds against this termite species. Alkaloidal extract from *B. virgilioides* heartwood exhibited the highest antitermitic activity ($LC_{50} = 7.2 \text{ mg ml}^{-1}$ after 4 days) followed by cyclohexane extracts from the same species ($LC_{50} = 12.2 \text{ mg ml}^{-1}$ after 4 days) and *H. stigonocarpa* heartwood ($LC_{50} = 11.9 \text{ mg ml}^{-1}$ after 4 days) and ethyl acetate extract from *Anadenanthera colubrina* wood ($LC_{50} = 17.3 \text{ mg ml}^{-1}$ after 4 days). Exposure of *N. corniger* to the other extracts from *A. colubrina* wood and *H. stigonocarpa* heartwood resulted in a higher termite survival rate than for the above mentioned extracts, but still reduced the survival of termites compared to a corresponding control. Only *B. virgilioides* cyclohexane extract presented repellent properties. The termite resistance of these hardwoods can be attributed to antitermitic activity of secondary metabolites present in the extracts.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

One of the limiting factors for the widespread utilization of wood species is wood's low resistance to biodegradation (Bultman et al., 1979; Deka et al., 2002; Paes et al., 2003). Termites are insects that cause serious damage to wooden structures, because the main structural polymer of wood, lignocellulose, is efficiently digested by their hindgut protozoa or bacteria (Breznak, 1982; Breznak and Brune, 1994). Damage caused by termites *Nasutitermes*, *Coptotermes*, and *Reticulitermes* historically has been a concern of researchers worldwide. Korb (2007) estimated annual damage caused by termites at about U.S. \$50 billion worldwide. In the city of Sao Paulo, Brazil, alone, a 20-year loss of \$3.5 billion was incurred (Lelis, 1994).

Nasutitermes corniger Motschulsky (Isoptera, Termitidae) is one of the most widely distributed species of termites, being found from the south of Mexico to the south of Brazil and the north of Argentina. *N. corniger* is highly adaptable to colonization in urban, agricultural, and natural environments, and in many places it is a dominant species. This species consumes wood in almost any

form, as hardwoods and softwoods that are dry, wet, or partially decayed (Scheffrahn et al., 2002, 2005).

The traditional method of combating termites involves the use of synthetic chemical products. These insecticides, today mainly organophosphates and pyrethroids, are quite harmful to human health and to the environment (Cabrera et al., 2001). For these reasons there is increasing interest in compounds from extractives of non-biodegradable woods as alternatives for controlling termites (Carter et al., 1978; Reyes-Chilpa et al., 1995; Watanabe et al., 2005; Morimoto et al., 2006; Cheng et al., 2007; Ragon et al., 2008).

There are several properties that determine wood's natural resistance to termite attack. It is known that extractives may be toxic, repellent, or distasteful to termites (Scheffrahn, 1991; Escoubas et al., 1995; Lajide et al., 1995; Cabrera et al., 2001; Ragon et al., 2008). This is due to the presence of chemical constituents residing in the lignocellulosic tissue such as flavonoids (Reyes-Chilpa et al., 1995; Ohmura et al., 2000; Chen et al., 2004; Morimoto et al., 2006), terpenoids (Kawaguchi et al., 1989; Chang et al., 2001; Watanabe et al., 2005), quinones (Carter et al., 1978; Ganapaty et al., 2004), alkaloids (Kawaguchi et al., 1989) and tannins (Fava et al., 2006).

From the Brazilian hardwood timbers most used in the furniture, building, and naval industries, three species belonging to

* Corresponding author. Tel.: +55 8121268347; fax: +55 8121268346.

E-mail address: marcia.nascimento@ufpe.br (M.S. Nascimento).

Leguminosae family were selected for antitermitic activity: *Bowdichia virgilioides* (sucupira), *Anadenanthera colubrina* (angico-de-carço), and *Hymenaea stigonocarpa* (jatobá-do-cerrado). These wood species were chosen due to their reputed durability, including resistance to termite attack (Lorenzi, 1998). Only *A. colubrina* was tested against termites under laboratory conditions using wood samples (Paes et al., 2003; Silva et al., 2007).

This study aims to evaluate the effects of wood extractives from *A. colubrina* and heartwood extractives from *H. stigonocarpa* and *B. virgilioides*, known for high durability, against termites *N. corniger* Motschulsky.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

Fresh material of *B. virgilioides*, *Anadenanthera colubrina*, and *H. stigonocarpa* were collected from their natural habitats in northeast Brazil, the first in the state of Maranhão and the other in Pernambuco. *A. colubrina* and *B. virgilioides* specimens were classified by Prof. Suzene Izídio da Silva (Universidade Federal Rural de Pernambuco), while *H. stigonocarpa* by Prof. Gonçalo Mendes da Conceição (Universidade Estadual do Maranhão). Voucher specimens of these three plants were deposited in the herbaria of the respective institutions (Table 1).

2.2. Phytochemical tests of the plants

Wood of *A. colubrina* and heartwood of *H. stigonocarpa* and *B. virgilioides* were air-dried at room temperature, powdered, and subsequently subjected to phytochemical screening, using procedures described by Costa (1982) to identify the main classes of secondary metabolites (Table 2).

2.3. Preparation of extracts

After identification of the classes of compounds, preliminary solubility assays monitored by thin-layer chromatography (TLC) were performed to obtain information that guided the fractionation. Thus, three different extraction procedures were adopted for the three wood samples.

Air-dried and powdered heartwood (200 g) of *H. stigonocarpa* was extracted with cyclohexane at room temperature; subsequently the extract was evaporated to dryness. The recovered wood powder was submitted to the same procedure using ethyl acetate and methanol.

Table 2

Classes of secondary metabolites detected in the plants employed in this study.

Classes of compounds	Tests	<i>B. virgilioides</i> (heartwood)	<i>A. colubrina</i> (wood)	<i>H. stigonocarpa</i> (heartwood)
Alkaloids	Dragendorff, Mayer	+	–	–
Flavonoids	Shinoda	+	+	+
	Oxalo-boric acid			
Saponins	Frothing	–	–	–
Tannins	Ferric chloride	–	+	–
Steroids and terpenoids	Liebermann–Burchard	+	+	+

+: detected; – : not detected.

Air-dried and powdered wood of *A. colubrina* (200 g) was extracted at room temperature with ethanol. After concentration in vacuo, the residue was partitioned between MeOH/H₂O (9:1) and cyclohexane. The hydromethanolic solution was evaporated under reduced pressure. Then MeOH/H₂O (1:1) was added to the residue and the resulting solution was submitted to successive partitions with dichloromethane, ethyl acetate, and n-butanol.

Air-dried and powdered heartwood (200 g) of *B. virgilioides* was extracted at room temperature with ethanol. The residue obtained after concentration under reduced pressure was redissolved with ethanol and extracted with cyclohexane. The ethanolic extract was suspended in 1 L of acidified water (adjusted with HCl 1% to pH 3) and then partitioned with CHCl₃. After removal of the organic phase, the aqueous phase was then basified with Na₂CO₃ to pH 8–9 and was extracted with CHCl₃ to give a crude alkaloidal extract.

2.4. Termiticidal assay

N. corniger identification was performed by Dr. Luiz Roberto Fontes (Superintendência de Controle de Endemias, SUCEN, Brasil). Termite colonies were maintained in a green house at the agronomy department of the Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). The no-choice feeding method described by Kang et al. (1990), with some adaptations, was used to evaluate the antitermitic activity of the extracts. Samples of 1.25, 2.5, 5.0, 10, and 20 mg of each extract were dissolved in 200 µL of solvent, to obtain solutions of 0.625% (6.25 mg ml^{–1}), 1.25% (12.5 mg ml^{–1}), 2.5% (25 mg ml^{–1}), 5.0% (50 mg ml^{–1}), and 10% (100 mg ml^{–1}), respectively, and 40 µL of each solution was applied on a disk of filter paper (Whatman No. 3, 2.0 cm diameter). Filter paper treated with solvent only was used as a control. After evaporation of the solvent the disks impregnated with the sample, and the control, were

Table 1

Plants employed in this study and their ethnobotanical information.

Subfamily Species Common name [Locality: date of collect] Voucher number	Ethnobotanical use and/or medicinal application	Reference
Papilionoideae <i>Bowdichia virgilioides</i> Kunt Sucupira [Recife/PE: 11/2003] PE UFR-455028	Anti-rheumatic, depurative, astringent, anti-inflammatory, anti-malarial, used to treat arthritis, diabetes, dissenter and leishmaniasis, used in building and furniture, termite resistance	Veloze et al., 1999 Deharo et al., 2001 Bourdy et al., 2000 Barbosa and Fearnside, 2004 Lorenzi, 1998
Mimosoideae <i>Anadenanthera colubrina</i> (Vell.) Brenan var. Cebil (Griseb.) Von Reis Alt. Angico-de-carço [Serra Talhada/PE: 11/2007] PE UFR-49643	Natural resistance soft-rot fungi and termites, anti-inflammatory properties, used to treat problems respiratory, leather tanning, used in furniture, building and naval industries	Paes et al., 2003 Lorenzi, 1998 Corrêa, 1984 Delgobo et al., 1998
Caesalpinioideae <i>Hymenaea stigonocarpa</i> Mart ex. Hayne. Jatobá-do-cerrado [Caxias/MA: 03/2003] UEMA HABIT-055	Astringent, used to treat bronchitis and inflammations, natural resistance soft-rot fungi and termites, furniture, used in building and naval industries	Rodrigues and de Carvalho, 2001 Neto, 2006 Carvalho, 2004

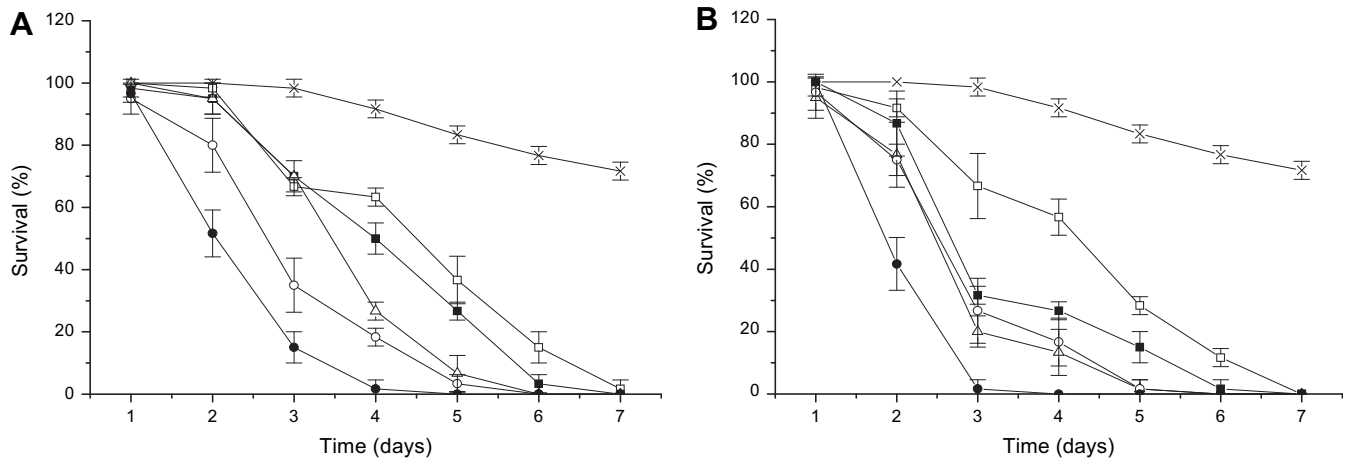


Fig. 1. Effect of contact with *B. virgilioides* heartwood extracts on *N. corniger*. Cyclohexane extract (A) alkaloidal extract (B). Treatments at concentrations of 6.25 (□), 12.5 (■), 25 (△), 50 (◇) and 100 (●) mg ml⁻¹. Acetone was used as negative control (×). Each point represents the mean ± S.D. of three experiments.

placed individually in petri plates (9 cm in diameter and 2 cm high) together with 20 active termites (16 workers and 4 soldiers) from colonies maintained in the vegetation house. The covered tests plates were maintained in darkness at 27 °C and 80% relative humidity. A cotton ball soaked with distilled water was placed in the superior part of each plate and monitored daily. Three repetitions were accomplished for each sample concentration including the control, and the percentage termites surviving was counted daily for seven days. Survival rates were obtained for each treatment and expressed as mean ± s.d. Paired Student's *t*-test was used

to compare the means. Differences were considered statistically significant at $P < 0.05$. All statistical analyses were performed with Origin™ 7.0 (Microcal, USA).

3. Results

The phytochemical screening performed in this study showed that all tested timbers contain flavonoids, terpenoids, and steroids, but only *B. virgilioides* and *A. colubrina* revealed the presence of alkaloids and tannins, respectively (Table 2). The choice of different

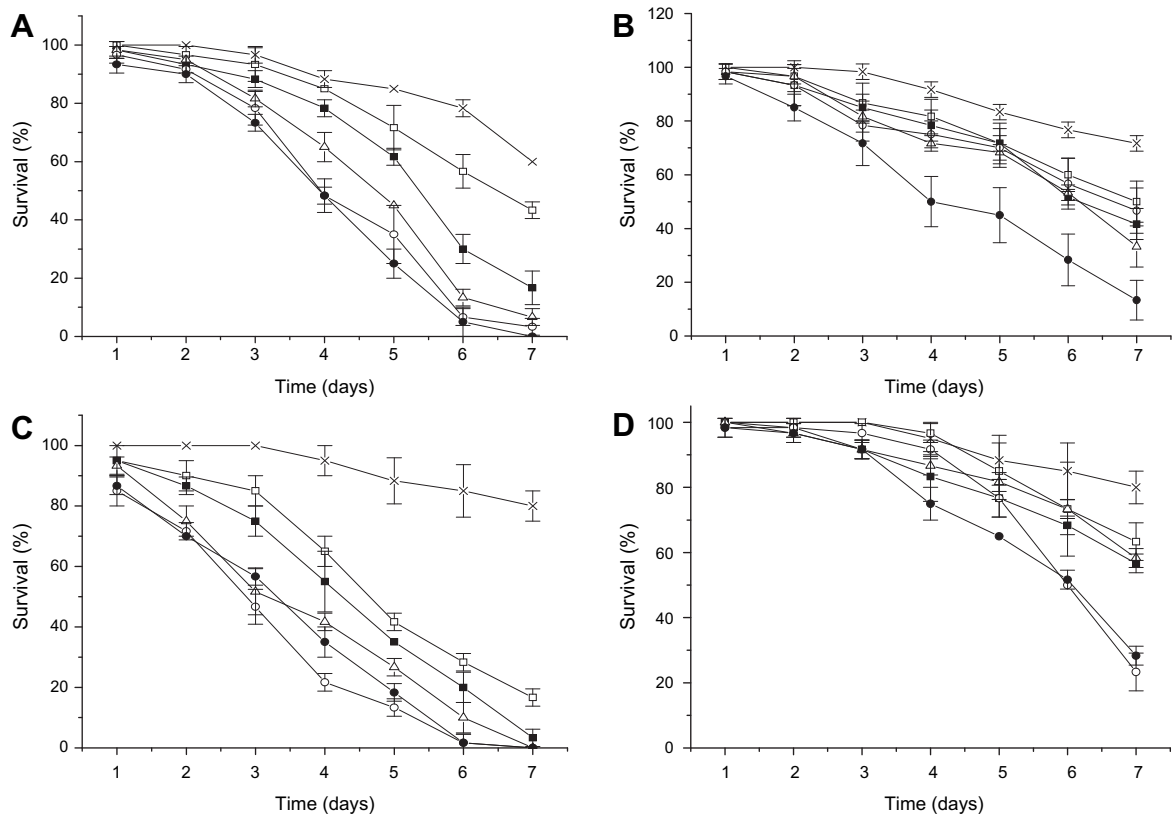


Fig. 2. Effect of contact with *A. colubrina* wood extracts on *N. corniger*. Cyclohexane extract (A) dichloromethane extract (B) ethyl acetate extract (C) n-butanol extract (D). Treatments at concentrations of 6.25 (□), 12.5 (■), 25 (△), 50 (◇) and 100 (●) mg ml⁻¹. Chloroform was used as negative control (×) in A, acetone (×) in B and methanol (×) in C and D. Each point represents the mean ± S.D. of three experiments.

extraction procedures aimed to facilitate the preliminary fractionation of these constituents.

B. virgilioides ethanolic extract was partitioned into two main fractions: a cyclohexane soluble part containing most flavonoid, terpenoid, and steroid constituents; and an alkaloidal fraction obtained by acid/base extraction of the polar constituents.

A. colubrina ethanolic extract was partitioned to give a cyclohexane extract of less polar constituents and three other fractions of increasing polarity including n-butanol for the most polar tannins.

The best separation of *H. stigonocarpa* constituents into three fractions of increasing polarity was by successive extraction of the powdered wood using cyclohexane, ethyl acetate, and methanol.

The results for the nine extracts evaluated for their antitermitic activity are presented in Figs. 1–3. All extracts reduced the survival of termites compared to the corresponding control, showing significant activity against *N. corniger*.

The most active extract (alkaloidal from heartwood of *B. virgilioides* [Fig. 1B]) killed all the termites in 4 days at 100 mg ml⁻¹ (LC₅₀ = 7.2 mg ml⁻¹), while the cyclohexane extract gave an LC₅₀ = 12.2 mg ml⁻¹ in 4 days of treatment (Fig. 1A).

Exposure of *N. corniger* to the extracts from wood of *A. colubrina* (Fig. 2A–D) revealed no survival of termites after 7 days for ethyl acetate extract at 25, 50, and 100 mg ml⁻¹ and the LC₅₀ value after 4 days was 17.3 mg ml⁻¹. The order of termite survival after 7 days at 100 mg ml⁻¹ for the other extracts was: n-butanol (28.3%) > dichloromethane (13.3%) > cyclohexane (0%).

As can be seen from Fig. 3A–C, cyclohexane was the most active extract from heartwood of *H. stigonocarpa*. Treatment with the highest concentration induced death of all insects after 5 days. With the most concentrated ethyl acetate extract all the termites died after 7 days. On the other hand, the methanol extract showed the highest survival rate of the termites after 7 days.

The statistical comparison of the results obtained for the cyclohexane extracts showed that the susceptibility to *N. corniger* did not vary among *B. virgilioides* (LC₅₀ = 12.2 mg ml⁻¹ after 4 days) and *H. stigonocarpa* (LC₅₀ = 11.9 mg ml⁻¹ after 4 days). However, these two results were different from those obtained for *A. colubrina* (LC₅₀ = 67.4 mg ml⁻¹ after 4 days).

The statistical analysis also showed that dichloromethane extract from *A. colubrina* and ethyl acetate extract from *H. stigonocarpa* were equally effective. Similar results were obtained between methanol and n-butanol extracts from *H. stigonocarpa* and *A. colubrina*, respectively.

Although this experiment was not specifically designed to test repellent effects, termites were observed most of the time on the treated filter paper, except the cyclohexane extract from *B. virgilioides* that they avoided.

4. Discussion

Extractives from termite-resistant woods have been investigated for many years and offer some promise as termite control agents because they constitute rich sources of bioactive compounds that offer, jointly or independently, toxicity, feeding deterrence, or repellence (Scheffrahn, 1991; Escoubas et al., 1995; Chen et al., 2004). However, the exact mechanism by which extractives kill, deter, or repel termites is unclear.

The data obtained in this study for antitermitic activity suggest that all extracts tested contained antitermitic compounds against *N. corniger*. The high activity of alkaloidal extract from *B. virgilioides* wood can be explained by the toxicity presented by this class of compounds. Previous chemical investigations with the stem bark from this species revealed the presence of quinolizidine alkaloids (Torrenegra et al., 1989; Barbosa-Filho et al., 2004) and a recent study done with this type of alkaloid isolated from *Sophora flavescens* (Leguminosae) demonstrated high toxicity and a strong

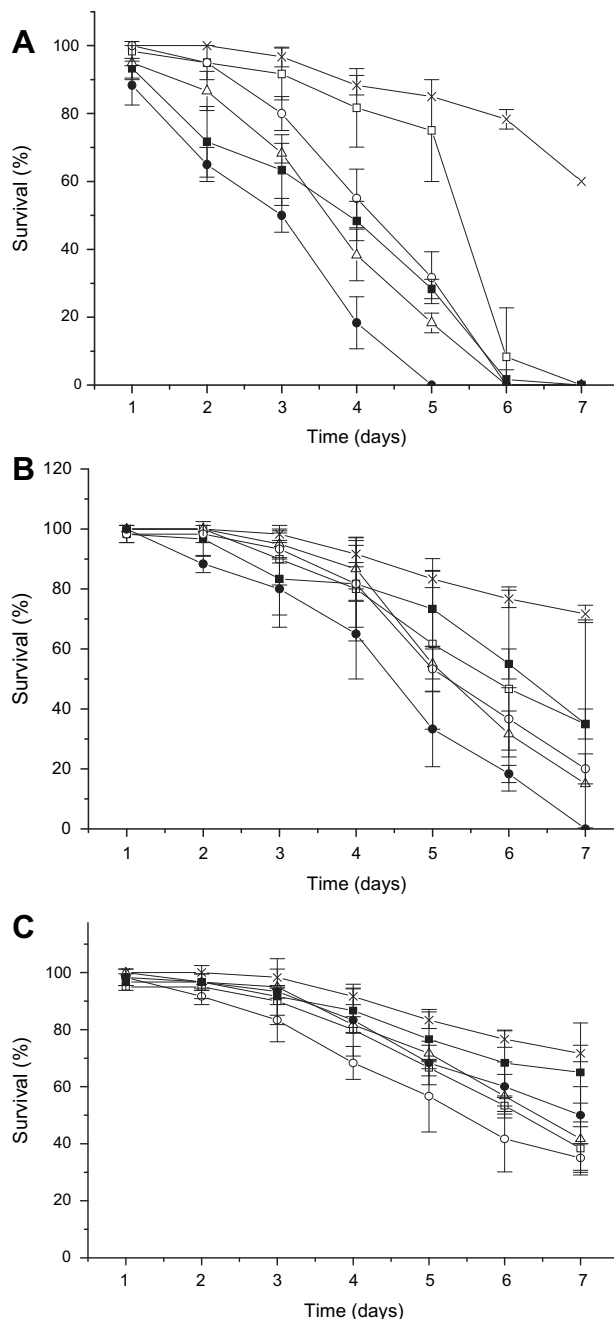


Fig. 3. Effect of contact with *H. stigonocarpa* wood extracts on *N. corniger*. Cyclohexane extract (A) ethyl acetate extract (B) methanol extract (C). Treatments at concentrations of 6.25 (□), 12.5 (■), 25 (△), 50 (○) and 100 (●) mg ml⁻¹. Chloroform was used as negative control (×) in A, acetone (×) in B and C. Each point represents the mean ± S.D. of three experiments.

antifeedant effect against the Formosan subterranean termite (Mao and Henderson, 2007).

B. virgilioides cyclohexane extract, the second most active of all nine extracts, has also presented a repellent effect. The cyclohexane extract of *H. stigonocarpa* showed a very similar toxicity, but no repellence. The same extract obtained from *A. colubrina* was much less toxic, but still the second most active from this plant. The results of phytochemical screening, shown in Table 2, indicated the presence of terpenoids in all three species in the cyclohexane extracts. According to data in the literature, terpenoids (from monoterpenes to triterpenes) have been shown to possess toxic, antifeedant, and

repellent properties against termites and other insects (Lajide et al., 1995; Viegas, 2003; Blaske et al., 2003; Park and Shin, 2005; Watanabe et al., 2005). Thus, the fact that *N. corniger* has been differently affected by these extracts suggests differences in the type and/or amount of terpenoids.

As evidenced by TLC, *A. colubrina* dichloromethane and *H. stigonocarpa* ethyl acetate extracts showed high flavonoid content and presented similar activity against *N. corniger*. Among plant phenolics the best known antifeedants are flavonoids (Simmonds, 2001). Ohmura et al. (2000) suggest that flavonoids have potential as termite control agents because they are widely distributed in plants. Some researchers have assumed that there are significant relationships between antioxidant compounds such as flavonoids and termite behavior. Ragon et al. (2008) hypothesized that termites detect and avoid wood that contains extractives with a minimal level of antioxidants, because they can interfere in the digestion of lignocellulose by termite symbionts.

Our results revealed that the major termiticidal extract of *A. colubrina* was ethyl acetate due to condensed tannin content detected by TLC. Tannins, because of their protein-binding properties and inhibition of several digestive enzymes, are known to be strongly astringent (Monteiro et al., 2005). Ayres et al. (1997) verified that the high mortality of insects treated with condensed tannins seems to be due to the toxic properties of these compounds and not to the inhibition of digestion.

The most polar fraction of *H. stigonocarpa* (methanol) and *A. colubrina* (n-butanol) contained more polar phenolics caused by lower termite toxicity.

In this work the antifeedant effects could not be evaluated directly, because we did not make measurements of substrate consumed. However, the above data are an indication that the extractives from *B. virgilioides*, *H. stigonocarpa*, and *A. colubrina* contain some compounds, or a group of compounds, that show toxic and antifeedant properties against *N. corniger*. Furthermore, it was possible to observe that only *B. virgilioides* cyclohexane extract presented repellent properties against *N. corniger*, although this experiment was not specifically designed for testing repellents effects. Thus, these results corroborate the importance of the alkaloidal, terpenoidal, and phenolic extractives in the resistance of the wood against termites.

Future investigations will focus on the purification of extracts as well as the development of new bioassays, consisting of both choice and no-choice tests, with the fractions and compounds obtained. In this way it will be possible to identify the compound, or group of compounds, that possesses antifeedant, toxic, and repellent properties.

Acknowledgements

The authors are grateful to Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for grants and fellowships, and express their thanks to Prof. Daniela M. A. F. Navarro for permission to use of the Chemical Ecology Laboratory.

References

- Ayres, M.P., Clausen, T.P., MacLean, S.F., Redman, A.M., Reichardt, P.B., 1997. Diversity of structure and anti-herbivore activity in condensed tannins. *Ecology* 78, 1696–1712.
- Barbosa, R.L., Fearnside, P.M., 2004. Wood density of trees in open savannas of the Brazilian Amazon. *Forest Ecology and Management* 199, 115–123.
- Barbosa-Filho, J.M., Almeida, J.R.G.S., Costa, V.C.D., Da-Cunha, E.V.L., Da Silva, M.S., Braz-Filho, R., 2004. Bowdichine, a new diaza-adamantane alkaloid from *Bowdichia virgilioides*. *Journal of Asian Natural Products Research* 6, 11–17.
- Blaske, V.-U., Hertel, H., Forschler, B.T., 2003. Repellent effects of isoborneol on subterranean termites (Isoptera: Rhinotermitidae) in soils of different composition. *Household and Structural Insects* 96, 1267–1274.
- Bourdy, G., DeWalt, S.J., Châvez de Michel, L.R., Roca, A., Deharo, E., Muñoz, V., Balderrama, L., Quenevo, C., Gimenez, A., 2000. Medicinal plants uses of the Tacana, an Amazonian Bolivian ethnic group. *Journal of Ethnopharmacology* 70, 87–109.
- Breznak, J.A., 1982. Intestinal microbiota of termites and other xylophagous insects. *Annual Review of Microbiology* 36, 323–343.
- Breznak, J.A., Brune, A., 1994. Role of microorganisms in the digestion of lignocellulose by termites. *Annual Review of Entomology* 39, 453–487.
- Bultman, J.D., Beal, R.H., Ampom, F.F.K., 1979. Natural resistance of some tropical African woods to *Coptotermes formosanus* Shiraki. *Forest Product Journal* 29, 46–51.
- Cabrera, R.R., Lelis, A.T., Berti-Filho, E., 2001. Ação dos extratos das madeiras de Ipê (*Tabebuia* sp., Bignoniaceae) e de Itaúba (*Mezilaurus* sp., Lauraceae) sobre o cupim-de-madeira-seca *Cryptotermes brevis* (Isoptera, Kalotermitidae). *Arquivos do Instituto Biológico* 68, 103–106.
- Carter, F.L., Farlo, A.M., Stanley, J.B., 1978. Termiticidal components of wood extracts: 7-methyljuglone from *Diospyros virginiana*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 26, 869–873.
- Carvalho, P.E., 2004. Jatobá: espécie adequada para construção e móveis. *Revista da Madeira* 14, 32–36.
- Chang, S.-T., Cheng, S.-S., Wang, S.Y., 2001. Antitermitic activity of essential oils and components from Taiwan (*Taiwania cryptomerioides*). *Journal of Chemical Ecology* 27, 717–724.
- Chen, K., Ohmura, W., Doi, S., Aoyama, M., 2004. Termite feeding deterrent from Japanese Larch wood. *Bioresource Technology* 95, 129–134.
- Cheng, S.-S., Chang, H.-T., Wu, C.-L., Chang, S.-T., 2007. Anti-termite activities of essential oils from coniferous trees against *Coptotermes formosanus*. *Bioresource Technology* 98, 456–459.
- Corrêa, M.P., 1984. Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Imprensa Nacional, Rio de Janeiro.
- Costa, A.F., 1982. Farmacognosia, second ed., vol. 3. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa.
- Deharo, E., Bourdy, G., Quenevo, C., Muñoz, V., Ruiz, G., Sauvian, M., 2001. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. Part V. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by the Tacana Indians. *Journal of Ethnopharmacology* 77, 91–98.
- Deka, M., Saikia, C.N., Baruah, K.K., 2002. Studies on thermal degradation and termite resistant properties of chemically modified wood. *Bioresource Technology* 84, 151–157.
- Delgobo, C.L., Gorin, P.A.J., Jones, C., Iacomini, M., 1998. Gum heteropolysaccharide and free reducing mono- and oligosaccharides of *Anadenanthera colubrina*. *Phytochemistry* 47, 1207–1214.
- Escoubas, P., Lajide, L., Mizutani, J., 1995. Termite antifeedant activity in *Afromomum melegueta*. *Phytochemistry* 40, 1097–1099.
- Fava, F., Monteiro de Barros, M., Stumpp, E., Marceli Jr., F.R., 2006. Aqueous extract to repel or exterminate termites. Patent Application WO 2005-BR173 20050824.
- Ganapaty, S., Thomas, P.S., Fotso, S., Laatsch, H., 2004. Antitermitic quinines from *Diospyros sylvatica*. *Phytochemistry* 65, 1265–1271.
- Kang, H.Y., Matsushima, N., Sameshima, K., Takamura, N., 1990. Termite resistance tests of hardwoods of Kochi growth. The strong termiticidal activity of kagonoki (*Litsea coreana* Léveillé). *Mokuzai Gakkaishi* 36, 78–84.
- Kawaguchi, H., Kim, M., Ishida, M., Ahn, Young-Joon, Yamamoto, T., Yamaoka, R., Kozuka, M., Goto, K., Takhashi, R., 1989. Several antifeedants from *Phellodendron amurense* against *Reticulitermes speratus*. *Agricultural Biology and Chemistry* 53, 2635–2640.
- Korb, J., 2007. Termites. *Current Biology* 17, 995–999.
- Lajide, L., Escoubas, P., Mizutani, J., 1995. Termite antifeedant activity in *Xylopia aethiopica*. *Phytochemistry* 40, 1105–1112.
- Lelis, A.T., 1994. Termite problem in São Paulo City-Brazil. In: Lenoir, A., Arnold, G., Lepage, M. (Eds.), *Proceedings of the 12th Congress of the International Union for the Study of Social Insects-IUSSI*, Paris, pp. 42–46.
- Lorenzi, H., 1998. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. Plantarum, São Paulo.
- Mao, L., Henderson, G., 2007. Antifeedant activity and acute and residual toxicity of alkaloids from *Sophora flavescens* (Leguminosae) against formosan subterranean termites (Isoptera: Rhinotermitidae). *Household and Structural Insects* 100, 866–870.
- Monteiro, J.M., Albuquerque, U.P., Araújo, E.L., Amorim, E.L.C., 2005. Tannins: from chemistry to ecology. *Química Nova* 28, 892–896.
- Morimoto, M., Fukumoto, H., Hiratani, M., Chavasiri, W., Komai, K., 2006. Insect antifeedants, pterocarpol, in heartwood of *Pterocarpus macrocarpus* Kruz. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 70, 1864–1868.
- Neto, G.G., 2006. O saber tradicional pantaneiro: as plantas medicinais e a educação ambiental. *Revista Eletrônica Do Mestrado Em Educação Ambiental* 17, 71–79.
- Ohmura, W., Doi, S., Aoyama, M., 2000. Antifeedant activity of flavonoids and related compounds against the subterranean termite *Coptotermes formosanus* Shiraki. *Journal of Wood Science* 46, 149–153.
- Paes, J.B., Morais, V.M., Sobrinho, D.W., Bakke, O., 2003. Natural resistance of nine Brazilian semi-arid regions tree species to subterranean termites, under laboratory condition. *Cerne* 9, 36–47.
- Park, I.-K., Shin, S.-C., 2005. Fumigant activity of plant essential oils and components from garlic (*Allium sativum*) and clove bud (*Eugenia caryophyllata*) oils against the Japanese termite (*Reticulitermes speratus* Kolbe). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005 (53), 4388–4392.
- Ragon, K.W., Nicholas, D.D., Schultz, T.P., 2008. Termite effect of the non-biocidal antioxidant properties of the extractives (Isoptera: Rhinotermitidae). *Sociobiology* 52, 47–54.

- Reyes-Chilpa, R., Viveros-Rodríguez, N., Gomez-Garibay, F., Alvarez-Solano, D., 1995. Antitermitic activity of *Lonchocarpus castilloi* flavonoids and heartwood extracts. *Journal of Chemical Ecology* 21, 455–463.
- Rodrigues, V.E.G., de Carvalho, D.A., 2001. Ethnobotanical survey of medicinal plants in the dominion of meadows in the region of the Alto Rio Grande – Minas Gerais. *Ciência e Agrotecnologia* 25, 102–103.
- Scheffrahn, R.H., 1991. Allelochemical resistance of wood to termites. *Sociobiology* 19, 257–282.
- Scheffrahn, R.H., Cabrera, B.J., Kern Jr., W.H., Su, N.-Y., 2002. *Nasutitermes costalis* (Isoptera: Termitidae) in Florida: first record of a non-endemic establishment by a higher termite. *Florida Entomologist* 85, 273–275.
- Scheffrahn, R.H., Krecek, J., Szalanski, A.L., Austin, J.W., 2005. Synonymy of the neotropical arboreal termites, *Nasutitermes corniger* and *N. costalis* (Isoptera: Termitidae: Nasutitermitinae), with evidence from morphology, genetics, and biogeography. *Annals of the Entomological Society of America* 98, 273–281.
- Silva, C.A., Monteiro, M.B.B., Brazolin, S., Lopez, G.A.C., Richter, A., Braga, M.R., 2007. Biodeterioration of brazilwood *Caesalpinia echinata* Lam. (Leguminosae–Caesalpinioideae) by rot fungi and termites. *International Biodeterioration and Biodegradation* 60, 285–292.
- Simmonds, M.S.J., 2001. Importance of flavonoids in insect–plant interactions: feeding and oviposition. *Phytochemistry* 56, 245–252.
- Torrenegra, R., Bauereiss, P., Achenbach, H., 1989. Homoomosanine-type alkaloids from *Bowdichia virgilioides*. *Phytochemistry* 28, 2219–2221.
- Veloze, L.S.M., Silva, B.P., Bernardo, R.R., Parente, J.P., 1999. Odoratin-7-O-b-D-glucopyranoside from *Bowdichia virgilioides*. *Phytochemistry* 52, 1473–1477.
- Viegas Jr., C., 2003. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. *Química Nova* 26, 390–400.
- Watanabe, Y., Mihara, R., Mitsunaga, T., Yoshimura, T., 2005. Termite repellent sesquiterpenoids from *Callitris glaucophylla* heartwood. *Journal of Wood Science* 51, 514–519.