

ALICE MARIA DE SOUZA RODRIGUES

**Análise e valorização bioinspirada dos
metabólitos secundários responsáveis pela
durabilidade natural de madeiras exploradas na
Guiana Francesa**

**Brasília
Julho de 2010**

ALICE MARIA DE SOUZA RODRIGUES

**Análise e valorização bioinspirada dos
metabólitos secundários responsáveis pela
durabilidade natural de madeiras exploradas na
Guiana Francesa**

Relatório apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas para obtenção do grau de Doutor em co-tutela entre a Universidade de Brasília, sob a orientação da Prof^a Dr^a Laila Salmen Espindola e a Universidade das Antilhas e da Guiana, sob a orientação do Prof. Dr. Didier Stien.

**Brasília
Julho de 2010**

“Eis o que resta dos sonhos:

Um lenço deixado

Pombos e flores, presentes.

Mas o resto, arrebatado.”

(Cecília Meireles)

Agradecimentos

Agradeço ao Prof. Norberto Peporine Lopes e ao Dr. Georges Massiot por terem sido relatores e participado da banca avaliadora. Agradeço também à Dra. Maria de Fátima Grossi de Sá por ter participado da banca avaliadora desta tese.

Muito obrigada aos alunos (e ex alunos) do Laboratório de Farmacognosia da UnB, Fernanda, Phellippe, Mariana, Everton, Lorena, Thiago entre outros, com os quais eu pude dividir tantas placas de cultura, extratos e alegrias durante os últimos anos.

Obrigada aos colegas da Universidade das Antilhas e da Guiana e da Ecofog, aos colegas do Laboratório, aos colegas de coleta, de HPLC, de colunas, de “labo-bio” e de eventuais “reuniões”.

Muito obrigada aos colegas do Laboratório de Madeiras Tropicais (UR40) em Montpellier, Christine Baudasse e Nicolas Leménager, por terem sido tão atenciosos, bem humorados e eficazes durante a etapa dos testes de durabilidade.

Agradeço em especial à Véronique Eparvier, por ter estado sempre pronta a me ajudar, sempre bem humorada nas descrições de espectros RMN, em tantas correções de francês, em tantas dúvidas e questões.

Muito obrigada à Nadine Amusant, uma das colaboradoras mais importantes deste trabalho com a qual eu aprendi muito sobre durabilidade natural, estatística e força de vontade.

Obrigada ao Jacques Beauchêne, meu co-orientador, por ter tido paciência comigo nos momentos de “perda de dureza”.

Obrigada ao Lucien Raguin, pela confiança e por ter possibilitado a realização deste trabalho.

Muito obrigada aos meus orientadores, Laila Espindola e Didier Stien, que souberam me guiar com tanta sabedoria, por dividirem comigo a experiência de anos de pesquisa, por terem sido tão exigentes e por me motivarem a continuar.

Agradeço toda a compreensão, apoio e amor da minha família, que durante esses três anos vivou o sonho comigo,

E agradeço aos meus pais, à quem dedico esse trabalho, que sempre me deram apoio, carinho e amor, os elementos fundamentais para esse trabalho e para a vida, e sem os quais não teria sido possível vencer essa etapa.

Sumário

Capítulo 1 Introdução.....	16
I Contexto.....	17
II. Durabilidade natural	20
II.1 Madeira	20
II.2 Durabilidade natural e o papel dos metabólitos secundários	21
II.3 Medida da durabilidade natural	23
II.4 Mecanismos de degradação da madeira	24
II.5 Tratamento da madeira: dados numéricos e quadro legislativo	27
II.6 Tratamento da madeira - histórico e avanços	29
II.7 Compostos ligados à durabilidade natural das madeiras	32
II.8 Utilização de extratos ou moléculas provenientes de espécies duráveis para a preservação da madeira	39
III Objetivos	42
IV Doenças fúngicas humanas	43
IV.1 Contexto	43
IV.2 Leveduras.....	44
IV.3 Fungos dermatófitos.....	45
IV.3 Tratamento de micoses	46
IV.4 Plantas e princípios naturais antimicóticos	50
V Espécies selecionadas	55
V.1 Critérios para a seleção das espécies	55
V.2 Conhecimentos sobre as espécies selecionadas	57
Capítulo 2 Avaliação biológica dos extratos	68
I Introdução.....	69
II Extração	70
III Teste de perfuração em ágar	75
IV Índices de atividade antifúngica	78
V Atividades termiticidas – teste de escolha direta.....	81
VI Conclusão.....	83
Capítulo 3 Transferência de resistência à degradação fúngica.....	86
I Introdução.....	87
II Impregnação e ensaio de solo	90
II.1 Plano de amostragem	90
II.2 Impregnação	93
II.3 Eficácia de proteção dos extratos: exposição ao solo florestal	96
II.4 Limiares da eficácia de proteção dos extratos.....	102
III Teste de eficácia de preservantes.....	104
III.1 Plano de amostragem	104
III.2 Impregnação à vácuo	106
III.3 Eficácia protetora dos extratos em exposição a fungos lignívoros.....	107

III.4 Limiares da eficácia de proteção dos extratos.....	111
IV Conclusão.....	112
Capítulo 4 Transferência de resistência à degradação por cupins.....	114
I Introdução.....	115
II Impregnação e resistência induzida ao ataque por cupins.....	117
II.1 Plano de amostragem	117
II.2 Impregnação	118
II.3 Eficácia protetora dos extratos	118
III Eficácia termiticida em tratamento de superfície	121
III.1 Plano de amostragem	121
III.2 Tratamento de superfície.....	122
III.3 Eficácia protetora dos extratos	123
IV Conclusão.....	126
Capítulo 5 Durabilidade natural – uma chave para a descoberta de novas moléculas antifúngicas e termiticidas	128
I Introdução.....	129
II Atividade antifúngica dos extratos obtidos de espécies de grande durabilidade	129
III Fracionamento biomonitorado de <i>Sextonia rubra</i>	135
III.1 Isolamento dos metabólitos secundários antifúngicos	135
III.2 Potencial antifúngico de rubrenolideo e rubrínolideo	136
III.3 Potencial termiticida do rubrenolideo e do rubrínolideo	137
IV Fracionamento biomonitorado do extrato de <i>Andira surinamensis</i>	139
IV.1 Isolamento e caracterização dos constituintes das frações antifúngicas.....	139
IV.2 Estado da arte relativa às atividades biológicas dos compostos isolados.....	148
IV.3 Atividades antifúngicas dos compostos isolados das frações ativas	150
V Conclusão.....	151
Conclusão e perspectivas	153
Material e métodos.....	156
I Generalidades	157
II Extração	158
II.1 Coleta e identificação das plantas	158
II.2 Extração.....	160
III Atividade antifúngica	161
III.1 Fungos lignívoros	161
III.2 Fungos patógenos humanos - dermatófitos e leveduras	161
III.3 Teste de perfuração em ágar	162
III.4 Índice de atividade antifúngica em fungos lignívoros	163
III.5 Teste de microdiluição em dermatófitos e leveduras	166
IV Atividade termiticida	167
IV.2 Teste « sem escolha » sobre papel.....	168

V Transferência da resistência à degradação fúngica.....	170
V.1 Impregnação e ensaio de solo	170
V.2 Transferência da atividade fungicida, ensaio de eficácia de produtos de preservação	178
V.3 Análise estatística	185
VI Transferência de resistência à degradação por térmitas	186
VI.1 Impregnação e resistência induzida ao ataque de cupins.....	186
VI.2 Eficácia termiticida em tratamento de superfície	188
VI.3 Análises estatísticas	191
VII Fracionamento biomonitorado	191
VII.1 Extrato acetato de etila de <i>Sextonia rubra</i>	191
VII.1 Extrato acetato de etila de <i>Andira surinamensis</i>	194
Referências bibliográficas.....	199
Anexos	232
Anexo 1 – Espécies sul americanas para as quais a resistência natural aos fungos lignívoros, aos cupins ou às brocas marinhas foi descrita.	233
Anexo 2 – Espectros de RMN ¹ H do rubrenolídeo (1) em CDCl ₃	242
Anexo 3 – Espectro de RMN ¹³ C do rubrenolídeo (1) em CDCl ₃	243
Anexo 4 – Espectro de RMN ¹ H do rubrinolídeo (2) em CDCl ₃	244
Anexo 5 – Espectro de RMN ¹³ C do rubrinolídeo (2) em CDCl ₃	245
Anexo 6 – Espectro de RMN ¹ H da sativana (3) em CD ₃ OD.	246
Anexo 7 – Espectros de HSQC da sativana (3) em CD ₃ OD	247
Anexo 8 – Espectro de HMBC da sativana (3) em CD ₃ OD.....	248
Anexo 9 – Espectro de RMN ¹ H da maackiaína (4)	249
Anexo 10 – Espectro de HSQC e HMBC da maackiaína (4)	250
Anexo 11 – Espectro de HMBC da maackiaína (4)	251
Anexo 12 – Espectro de RMN ¹ H da medicarpina (5) em CD ₃ OD	252
Anexo 15 – Espectro de RMN ¹ H da biochanina A (6) em CD ₃ OD.....	255
Anexo 16 – Espectro HSQC da biochanina A (6) em CD ₃ OD	256
Anexo 17 – Espectro HMBC da biochanina A (6) em CD ₃ OD	257
Anexo 18 – Espectros de RMN ¹ H da dihydroformononetina (7) em CD ₃ OD	258
Anexo 19 – Espectro HSQC da dihydroformononetina (7) em CD ₃ OD	259
Anexo 20 – Espectro HMBC da dihydroformononetina (7) em CD ₃ OD	260
Anexo 21 – Espectro de RMN ¹ H da bousantina IV (8) em CD ₃ OD	261
Anexo 22 – Espectro HSQC da bousantina IV (8) em CD ₃ OD	262
Anexo 23 – Espectro HMBC da bousantina IV (8) em CD ₃ OD	263
Anexo 24 – Espectro de RMN ¹ H da liquiritigenina (9) em CD ₃ OD	264
Anexo 25 – Espectro HSQC da liquiritigenina (9) em CD ₃ OD.....	265
Anexo 26 – Espectro HMBC da liquiritigenina (9) em CD ₃ OD.....	266

Lista de figuras

Figura 1 – Mapa político-geográfico da Amazônia. Fonte : RAISG - Rede Amazônica de Informação Sócio Ambiental Georreferenciada, 2009 (http://raisg.socioambiental.org/)	18
Figura 2 – Parcelas de floresta administradas pela ONF, 2006. (http://www.onf.fr/old/reg/guyane/index.htm).....	18
Figura 3 – Corte transversal do tronco de <i>Peltogyne</i> sp.	20
Figura 4 – Pé de mesa egípcia esculpida em <i>Diospyros</i> sp. (Ebenaceae), cerca de 700 a.C. (©Musée du Louvre /C. Décamps).....	21
Figura 5 – Podridão branca: zona de decomposição branca causada pela <i>Grifola frondosa</i> nos carvalhos. As zonas deslignificadas (em azul, apontado pelas setas) são cercadas de regiões intactas. Escala 50 µm. (Fonte : Schwarze 2007)	25
Figura 6 – Podridão parda: fissuras nas paredes secundárias de <i>Abies magnifica</i> degradada por <i>Fomitopsis pinicola</i> (setas brancas). A modificação da cor da parede nas proximidades das hifas (sinalizadas pelas setas pretas) indica que os polissacarídeos foram degradados. Escala 10 µm. (Fonte : Schwarze 2007)	25
Figura 7 – Podridão mole : Secção transversal de madeira de plátano atacada por <i>Kretzschmaria deusta</i> . As células do parênquima axial (Ap) e os vasos não foram atacados. Observar as fissuras das paredes celulares. Escala 10 µm. (Fonte : Schwarze 2007)	25
Figura 8 – <i>Nasutitermes macrocephalus</i> (Silvestri, 1903) (Foto: R. Constantino).	26
Figura 9 – Pentaclorofenol.....	29
Figura 10 – Biocidas orgânicos de terceira geração utilizados para a preservação das madeiras.	31
Figura 11 – Resveratrol e oxiresveratrol	33
Figura 12 – Latifolina	33
Figura 13 – Substâncias naturais inseticidas	37
Figura 14 – Via de biossíntese do ergosterol representando os sítios de inibição de diferentes antifúngicos (Fonte: Georgopapadakou & Walsh, 1996)	48
Figura 15 – Estrutura de alguns antifúngicos utilizados contra infecções fúngicas sistêmicas. ..	50
Figura 16 – Compostos antifúngicos isolados de <i>Rheum emodi</i> (rheína e crisofanol), <i>Vernonanthura tweedieana</i> (6-cinnamoiloxi-1-hidroxiudesm-4-en-3-ona) e <i>Piper regnellii</i> (eupomatenóide-5).	53
Figura 17 – Compostos antifúngicos isolados de <i>Heterothalamus alienus</i> (sakuranetina), <i>Chimonanthus praecox</i> (D-calicanthine e L-folicanthine) e <i>Goniothalamus</i> ((R) - e (S)-goniothalamine).....	54
Figura 18 – Compostos voláteis antifúngicos isolados de <i>Origanum</i> sp. (carvacrol e linalol), <i>Syzygium aromaticum</i> (eugenol e geraniol) e <i>Allium sativum</i> (alicina).	55
Figura 19 – Lapachol (esquerda) e dehidrolapachona (centro) isoladas a partir da madeira de <i>Tabebuia serratifolia</i> (à direita)	57
Figura 20 – Goupiolona (à esquerda), tropolona isolada da madeira de <i>Goupia glabra</i> (à direita).	58

Figura 21 – Plumbagina (esquerda) e diospirina (à direita)	59
Figura 22 – Isoflavonas isoladas de <i>Andira surinamensis</i>	59
Figura 23 – Bocoa prouacensis.....	60
Figura 24 – Diplotropina (à esquerda) e diploflavona (à direita).	61
Figura 25 – Umbeliferona (cumarina, à esquerda), isolada dos grãos e o (+)-(3R)-8,2',3'-trihidroxi-7,4'-dimetoxiisoflavana (à direita), isolado da madeira de <i>Dipteryx odorata</i>	61
Figura 26 – Metabólitos secundários de <i>Eperua falcata</i>	62
Figura 27 – Ormosanina (à esquerda) e panamina (à direita), dois alcalóides quinolizidínicos frequentemente encontrados no gênero <i>Ormosia</i>	62
Figura 28 – (+)-peltoginol (à esquerda) e (+) mopanol (ao centro), isolados de <i>Peltogyne</i> sp. (à direita)	63
Figura 29 – Metil vouacapenato (à esquerda), isolado a partir da madeira de <i>V. americana</i> (à direita)	63
Figura 30 – Moracinas e estilbenóides isolados da madeira de tatajuba (<i>B. guianensis</i>).....	65
Figura 31 – Compostos isolados de espécies do gênero <i>Manilkara</i> (à esquerda) e <i>Manilkara huberi</i> (à direita).	66
Figura 32 – Cavidades contendo os extratos metanólico (1) e acetato de etila (2) de <i>B. guianensis</i> e o extrato acetato de etila de <i>Q. rosea</i> (3). Notar os halos de inibição do crescimento fúngico de <i>G. trabeum</i> em torno das cavidades (1) e (2).	75
Figura 33 – Placa de Petri teste contendo o extrato acetato de etila da madeira de <i>S. rubra</i> na concentração de 250 µg.ml ⁻¹ (à esquerda) e o controle negativo (à direita).	78
Figura 34 – Índices de atividade antifúngica (IA) medidos em <i>G. trabeum</i> (em azul) e em <i>P. sanguineus</i> (em vermelho) nas concentrações de 1000, 500 et 250 µg.ml ⁻¹ dos extratos. C = casca do caule, M = madeira do caule (alburno+cerne), A = alburno, CE = cerne externo, CI = cerne interno, a = acetato de etila e m = metanol.	79
Figura 35 – Disco de celulose tratado com o extrato acetato de etila do cerne interno de <i>O. flava</i> , após 72 horas de contato direto com os operários da espécie <i>Nasutitermes macrocephalus</i>	81
Figura 36 – Mortalidades acumuladas observadas para cada extrato nas concentrações de 9,3 (azul), 5,6 (verde) e 1,9 (vermelho) µg.mm ² . M = madeira do caule (alburno+cerne), A = alburno, CE = cerne externo, CI = cerne interno.....	82
Figura 37 – Resumo esquemático das etapas para a determinação dos limiares de eficácia de um produto de preservação antifúngico.	89
Figura 38 –Retenções médias (em kg.m ⁻³) obtidas para os blocos dos lotes de A ₁ a A ₇ . As marcas T1 a T5 representam as retenções visadas.	94
Figura 39 – Tratabilidade de <i>V. surinamensis</i> , em função da polaridade do extrato metanólico aplicado (lotes A1 a A6). No eixo das abscissas, polaridade dos extratos (proporção relativa de extrato MeOH/ extrato AcOEt); no eixo das ordenadas, ordenadas na origem da reta de coeficiente angular 1 e da equação (taxa de retenção real) = (taxa teórica) + b. Esse valor é usado para estimar o deslocamento para cima (b > 0, altos níveis de impregnação real) ou para baixo (b < 0, baixas taxas de impregnação real) dessa reta.....	94
Figura 40 – Retenções médias (em kg.m ⁻³) obtidas para os blocos dos lotes B ₁ a B ₇ . As marcas T1 a T5 representam as retenções visadas.....	95

Figura 41 – Tratabilidade de <i>S. morotoni</i> , em função da polaridade do extrato metanólico aplicado (lotes B1 a B6). No eixo das abscissas, polaridade dos extratos (proporção relativa de extrato MeOH/ extrato AcOEt); no eixo das ordenadas, ordenadas na origem da reta de coeficiente angular 1 e da equação (taxa de retenção real) = (taxa teórica) + b. Esse valor é usado para estimar o deslocamento para cima ($b > 0$, altos níveis de impregnação real) ou para baixo ($b < 0$, baixas taxas de impregnação real) dessa reta.....	96
Figura 42 – Perda de dureza (%), em ordem crescente das medianas, medidas para os lotes de <i>V. surinamensis</i> tratados com 89,6 (T1), 44,8 (T2), 22,4 (T3), 5,6 (T4) e 2,8 (T5) kg.m ⁻³ de cada extrato. (***) muito significativo, (**) significativo, (*) pouco significativo, (ns) não significativo. Os grupos definidos pelo teste de Dunn ($\alpha = 0,05$) são mostrados à direita do gráfico.	99
Figura 43 – Perda de dureza (%), em ordem crescente das medianas, medidas para os lotes de <i>S. morotoni</i> tratados com 72 (T1), 36 (T2), 18 (T3), 4,5 (T4) et 2,25 (T5) kg.m ⁻³ de cada extrato. – (***) muito significativo, (**) significativo, (*) pouco significativo, (ns) não significativo. Os grupos definidos pelo teste de Dunn ($\alpha = 0,05$) são mostrados à direita do gráfico.	101
Figura 44 – Retenções médias dos blocos dos lotes C ₁ a C ₃ (<i>P. sylvestris</i> , à esquerda) e D ₁ a D ₃ (<i>F. sylvatica</i> , à direita). As marcas azuis representam as retenções visadas.	106
Figura 45 – Exposição de blocos do lote D ₆ ao fungo formador de podridão branca <i>T. versicolor</i>	107
Figura 46 – Índices de degradação (%), em ordem crescente das medianas, lotes de <i>P. sylvestris</i> tratados a 60 (T1), 40 (T2), 20 (T3), 10 (T4) e 5 (T5) kg.m ⁻³ de cada extrato. (***) muito significativo, (**) significativo, (*) pouco significativo, (ns) não significativo. Os grupos definidos pelo teste de Dunn ($\alpha = 0,05$) são mostrados à direita do gráfico.....	109
Figura 47 – Índices de degradação (%), em ordem crescente de medianas, lotes de <i>F. sylvatica</i> tratados a 78 (T1), 52 (T2), 26 (T3), 13 (T4) e 6,5 (T5) kg/m ³ de cada extrato. (***) Muito significativo, (**) significativo, (*) pouco significativo, (ns) não significativo. Os grupos definidos pelo teste de Dunn ($\alpha = 0,05$) são mostrados à direita do gráfico.....	110
Figura 48 – Resumo esquemático das etapas para a determinação dos limiares de eficácia de um produto de preservação termiticida.	116
Figura 49 – Blocos expostos ao ataque de cupins.....	119
Figura 50 – (1) Bloco do lote E ₅ (não tratado) ; (2) Bloco do lote E ₂ T2 (tratado com o extrato de <i>S. rubra</i> a 5 kg/m ³) após 15 dias de exposição a <i>N. macrocephalus</i>	119
Figura 51 – Perda de massa média (em %) dos blocos dos lotes E ₁ a E ₅ , após exposição aos cupins durante 15 dias. (***) muito significativo, (**) significativo, (*) pouco significativo, (ns) não significativo. Os grupos definidos pelo teste de Dunn ($\alpha = 0,05$) são mostrados à direita do gráfico.	120
Figura 52 – Dispositivo de ensaio para a avaliação da eficácia do extrato de <i>S. rubra</i> frente a <i>R. flavipes</i> quando aplicado em alburno de <i>P. sylvestris</i>	123
Figura 53 – (1) Bloco do lote F ₂ com uma tentativa de ataque (cotação 1) por <i>R. flavipes</i> . (2) Bloco do lote F ₇ , com forte ataque (cotação 4) por <i>R. flavipes</i>	123
Figura 54 – (1) Bloco do lote F ₅ antes da exposição a <i>R. flavipes</i> . (2) Mesmo bloco após exposição, nota-se a zona de ataque correspondente à perda de uma placa de extrato devido à lavagem.	126
Figura 55 – Rubrenolideo (1) e rubrínlideo (2) isolados do extrato acetato de etila da madeira de <i>S. rubra</i>	135

Figura 56 – Curva de sobrevivência em 3 dias dos cupins <i>N. macrocephalus</i> em contato com os discos tratados nas concentrações 0,14 ; 0,47 e 0,95 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ de rubrenolideo e rubrínolideo.	138
Figura 57 – Compostos isolados das frações ativas do extrato acetato de etila da madeira de <i>A. surinamensis</i>	140
Figura 58 – Interações NOE importantes para a determinação da estrutura do composto 4...	144
Figura 59 – Numeração dos átomos da biochanina A (6) e da dihidroformononetina (7).....	145
Figura 60 – Numeração dos átomos da bolusantina IV (8).....	147
Figura 61 – Numeração dos átomos da liquiritigenina (9).	148
Figura 62 – Dimensões dos blocos de <i>Virola surinamensis</i> e <i>Schefflera morototoni</i>	170
Figura 63 – Tratamento dos blocos de <i>V. surinamensis</i> com o antifúngico tebuconazol.	172
Esquema 1 – Resumo esquemático da organização dos blocos sobre solo com os lotes A _n e B _n , impregnados com um mesmo extrato.	174
Figura 64 – Zonas de indentação para a medida da dureza.	175
Figura 65 – Campânula utilizada para a impregnação dos extratos sobre os blocos de <i>P. sylvestris</i> e <i>F. sylvatica</i>	180
Figura 66 – Blocos de <i>P. sylvestris</i> impregnados com o extrato de <i>Q. rosea</i> durante a secagem em sala climatizada.	182
Figura 67 – Frasco de cultura de <i>G. trabeum</i> contendo blocos teste (dois tratados e dois não tratados).	183
Figura 68 – Dimensões dos blocos de <i>P. sylvestris</i> utilizados no teste de tratamento de superfície.	188
Figura 69 – Prova de lavagem dos blocos tratados com extrato acetato de etila de madeira de <i>S. rubra</i>	189
Figura 70 – Dispositivo teste segundo a norma NF EN 118.	190
Figura 71 – Perfis cromatográficos da fração 3 obtidos em CLAE semi-preparativa, coluna C ¹⁸ em sistema isocrático água/acetonitrila (60/40) a 214 nm (A) e 254 nm (B). As setas vermelhas indicam os picos correspondentes aos compostos 3, 4 e 5.	195
Figura 72 – Perfis cromatográficos da fração 4 ^B em CLAE semi-preparativa, coluna C ¹⁸ em sistema isocrático água/acetonitrila (60/40), a 214 nm (A) e 254 nm (B) ; a seta vermelha indica os picos correspondentes ao composto 6.....	195
Figura 73 – Perfis cromatográficos da fração 4 ^B /VI em CLAE semi-preparativa, coluna C ¹⁸ em sistema isocrático água/acetonitrila (68/32) a 214 nm (A) e 254 nm (B) ; as setas vermelhas indicam os picos correspondentes aos compostos 7 e 8.....	196
Figura 74 – Perfis cromatográficos da fração 7 em CLAE semi-preparativa, coluna C ¹⁸ em sistema isocrático água/acetonitrila (70/30) a 290 nm ; a seta vermelha indica o pico correspondente ao composto 9.	197
Figura 75 – Representação esquemática dos fracionamentos submetidos ao extrato acetato de etila de <i>Andira surinamensis</i> . Os números indicam os compostos identificados. Os valores de CIM foram expressos em $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ e medidos em cepas de <i>Microsporium canis</i> (M.c.) LMGO 22 e <i>Trichophyton rubrum</i> (T.r.) LMGO 06.	198

Lista de tabelas

Tabela 1 – As espécies selecionadas para o estudo, classificadas por famílias.	56
Tabela 2 – Rendimento obtido pela extração das folhas.	70
Tabela 3 – Rendimentos obtidos pela extração das cascas do caule.	72
Tabela 4 – Rendimentos obtidos pela extração das madeiras do caule.	74
Tabela 5 – Medida das zonas de inibição médias do crescimento fúngico (em mm) frente à <i>P. sanguineus</i> e <i>G. trabeum</i>	77
Tabela 6 – Significância da perda de dureza dos lotes A ₁ a A ₁₀ e B ₁ a B ₁₀	97
Tabela 7 – Valores de TR ₅₀ (retenções equivalentes à 50% da perda de dureza dos blocos) dos lotes A ₁ a A ₇ e B ₁ a B ₁₀	103
Tabela 8 – Significância da perda de dureza dos lotes C ₁ a C ₆ e D ₁ a D ₆	108
Tabela 9 – Valores de TR ₅₀ (retenção equivalente à 50% da perda de massa ou dureza dos blocos) para os lotes A ₁ , B ₁ , C ₁ e D ₁ (impregnados com extrato de <i>A. surinamensis</i>), A ₄ , B ₄ , C ₂ e D ₂ (impregnados com extrato de <i>Q. rosea</i>) e A ₅ , B ₅ , C ₃ e D ₃ (impregnados com o extrato de <i>Tabebuia serratifolia</i>).	111
Tabela 10 – Retenções médias (em kg/m ³) e desvios-padrão dos lotes E ₁ e E ₂	118
Tabela 11 – Significância das perdas de massa dos lotes E ₁ a E ₅	119
Tabela 12 – Atividade observada pelos cupins expostos aos blocos tratados dos lotes de F ₁ a F ₈ . A ausência de atividade dentro dos dispositivos (100% de mortalidade) está marcada em cinza.	124
Tabela 13 – Cotações atribuídas aos lotes de blocos F ₁ a F ₈ , expostos durante 8 semanas a <i>R. flavipes</i>	125
Tabela 14 – Zonas de inibição (mm) do crescimento de fungos dermatófitos filamentosos e leveduras sobre meio de cultura solidificado.	131
Tabela 15 – Concentrações inibitórias mínimas (CIM em µg.ml ⁻¹) para os extratos selecionados. Os valores inferiores ou iguais a 125 µg.ml ⁻¹ estão marcados em negrito.	133
Tabela 16 – Valores de concentração inibitória mínima (CIM em µg.ml ⁻¹) e citotoxicidade (IC ₅₀ em µg.ml ⁻¹) do rubrenolideo (1) e do rubrínolideo (2).	136
Tabela 17 – Deslocamentos químicos (δ) e acoplamentos homonucleares ¹ H → ¹ H (COSY) e heteronucleares ¹ H → ¹³ C (HMBC) em CD ₃ OD para o composto 3.	141

Tabela 18 – Deslocamentos químicos (δ) e acoplamentos homonucleares $^1\text{H} \rightarrow ^1\text{H}$ (COSY) e heteronucleares $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$ (HMBC) em CD_3OD para 4 e 5.	143
Tabela 19 – Deslocamentos químicos (δ) e acoplamentos homonucleares $^1\text{H} \rightarrow ^1\text{H}$ (COSY) e heteronucleares $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$ (HMBC) em CD_3OD para os compostos 6 e 7.	145
Tabela 20 – Deslocamentos químicos (δ) e acoplamentos homonucleares $^1\text{H} \rightarrow ^1\text{H}$ (COSY) e heteronucleares $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$ (HMBC) em CD_3OD para 8.	147
Tabela 21 – Deslocamentos químicos (δ) e acoplamentos homonucleares $^1\text{H} \rightarrow ^1\text{H}$ (COSY) e heteronucleares $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$ (HMBC) em CD_3OD para 9.	148
Tabela 22 – Valores de concentração inibitória mínima (CIM em $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) dos compostos 3 a 6 e 8.	150
Tabela 23 – Espécies coletadas em julho de 2007, na primeira saída de campo.	159
Tabela 24 – Rendimento de extração das espécies.	161
Tabela 25 – Índices de atividade antifúngica (IA) sobre <i>G. trabeum</i> e <i>P. sanguineus</i> nas concentrações de extratos 1000, 500 e 250 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$, e IA_{50} (concentração de extrato correspondente ao índice de atividade antifúngica de 50%).	165
Tabela 26 – Mortalidade dos cupins após 72 horas de contato com os discos tratados pelos extratos nas concentrações 9,3 ; 5,6 e 1,9 $\mu\text{g}.\text{mm}^{-2}$ ($P < 0.0001$, $n = 2$).	169
Tabela 27 – Retenções médias (kg/m^3) \pm desvios padrão, para os blocos de <i>V. surinamensis</i> (lotes A_1 a A_7).	172
Tabela 28 – Retenções médias (kg/m^3) \pm desvios padrão, para os blocos de <i>S. morototoni</i> (lotes B_1 a B_7).	172
Tabela 29 – Média das perdas de dureza e desvios padrão correspondentes, para os blocos de <i>V. surinamensis</i> (lotes A_1 a A_{10}) e <i>S. morototoni</i> (lotes B_1 a B_{10}).	177
Tabela 30 – Retenções médias ($\text{kg}.\text{m}^{-3}$) e desvios padrão obtidos para os lotes C_1 a C_3 de <i>P. sylvestris</i>	181
Tabela 31 – Retenções médias ($\text{kg}.\text{m}^{-3}$) e desvios padrão obtidos para os lotes D_1 a D_3 de <i>F. sylvatica</i>	181
Tabela 32 – Índice de degradação e desvios-padrão correspondentes aos blocos de <i>P. sylvestris</i> (lotes C_1 a C_6) e <i>F. sylvatica</i> (lotes D_1 a D_6).	185
Tabela 33 – Avaliação do nível de ataque dos blocos de <i>P. sylvestre</i> expostos ao ataque por <i>Reticulitermes flavipes</i> (Fonte: NF EN 118, 2005).	191
Tabela 34 – Frações obtidas à partir do extrato acetato de etila da madeira de <i>S. rubra</i>	192

Lista de abreviaturas

2-HPNO	<i>n</i> -óxido de 2-hidroxipiridina
Afnor	Association Française de Normalisation (Associação Francesa de Normalização)
ANOVA	Análise de Variância
ASTM	American Society for Testing and Material (Sociedade Norte-americana de Testes e Materiais)
ATCC	American Type Culture Collection (Coleção de Culturas Tipo Norte-americanas)
BHT	2,6-di- <i>tert</i> -butil-4-metilfenol
CCA	Arseniato de Cobre Cromado
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CEE	Comunidade Econômica Europeia
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CIRAD	Centre de Cooperation International en Recherche Agronomique pour le Developpement (Centro de Cooperação Internacional de Pesquisa Agrônômica para o Desenvolvimento)
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
COSY	Correlation Spectroscopy
DCOIT	4,5-dicloro-2- <i>n</i> -octil-isotiazol-3-ona
DDAC	Cloreto de Didecilamônio
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetraacético
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Coherence
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
IA	Índice de Atividade antifúngica
IA ₅₀	Concentração correspondente à um índice de atividade antifúngica de 50%
IRD	Institut de Recherche pour le Développement (Instituto de Pesquisa para o Desenvolvimento)
LMGO	Laboratório de Micologia da Universidade Federal de Goiás
MOPS	Ácido 3-(<i>N</i> -morfolino)propanesulfônico
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards

NOE	Nuclear Overhauser Effect
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
ONF	Office National des Forêts (Ofício Nacional das Florestas)
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
UAG	Universidade das Antilhas e da Guiana

Capítulo 1

Introdução

I Contexto

As florestas desempenham um papel fundamental para a vida no planeta graças a funções ecológicas como: regulação do clima e dos recursos hídricos e habitat para as plantas e os animais. Além disso, elas fornecem um amplo leque de bens essenciais como madeira, alimentos, ervas medicinais e recursos importantes para a pesquisa de medicamentos. Quando as florestas desaparecem ou são gravemente degradadas perde-se também sua capacidade reguladora do ambiente; aumentando os perigos de inundações e de erosão, reduzindo a fertilidade do solo e contribuindo para a perda da vida vegetal e animal (Département des Forêts, 2005).

Dentre todas as florestas do mundo, a Amazônia é a mais rica zona de diversidade biológica, além de ser um dos mais vastos ecossistemas terrestres. A rapidez com que ocorre o desmatamento nesta área – 25.000 km²/ano nos anos 90 dos quais 18.000 km²/ano apenas pelo Brasil e um máximo de 27.400 km² em 2004 – afeta a capacidade de regeneração desta floresta de forma quase irreversível. Isto causa um impacto importante em sua capacidade de regulação climática (Malhi *et al.*, 2008).

A Amazônia compreende nove territórios nacionais, entre os quais o Brasil e a Guiana Francesa (Figura 1), que é um departamento ultramarino da França situado entre o Brasil e o

Suriname. A floresta amazônica na Guiana constitui uma reserva importante de produtos lignosos; com 75.000 km² de um território de 90.000 km² de superfície total (CIRAD, 1983). Em superfície a “Amazônia francesa” equivale a um terço das florestas francesas, sendo a única floresta tropical úmida *européia* e representando 2% da superfície total da Amazônia.

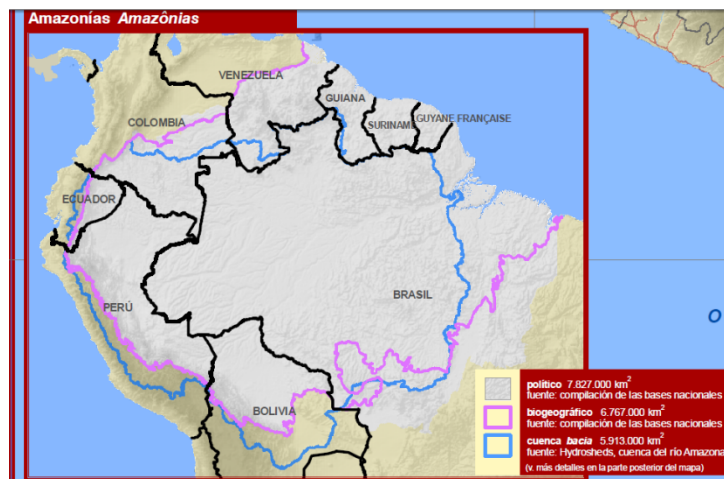


Figura 1 – Mapa político-geográfico da Amazônia. Fonte : RAISG - Rede Amazônica de Informação Sócio Ambiental Georreferenciada, 2009 (<http://raisg.socioambiental.org/>)

A floresta guianense faz parte do domínio privativo do Estado e é administrada pelo “Office National des Forêts” (ONF). A exploração florestal na Guiana francesa está limitada a uma faixa litorânea ao longo da estrada principal que atravessa o território (Figura 2), e é realizada, exclusivamente, por empresas privadas.

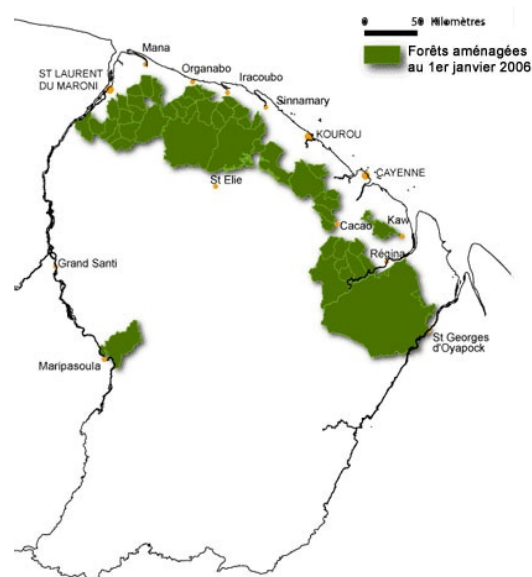


Figura 2 – Parcelas de floresta administradas pela ONF, 2006. (<http://www.onf.fr/old/reg/guyane/index.htm>)

Cerca de 60.000 m³ de madeira são cortadas e transformadas localmente por onze serralherias. Aproximadamente, 200 espécies de árvores de diâmetro superior a 50 cm, dentre elas, apenas cerca de vinte são atualmente exploradas como madeira de lei (Detienne *et al.*, 1989). A maior parte da produção de toras é realizada a partir de 3 espécies: angélico do Pará (*Dycorynia guianensis*, 37%), mandioqueira rosa (*Qualea* spp. e *Ruizterania* spp, 27%) e louro gamela (*Sextonia rubra*, 9%). Um quarto da produção é exportado, principalmente para as Antilhas, e o restante é comercializado no mercado local, como material de estrutura para o setor da construção civil. Ainda que, proporcionalmente, esse departamento seja imensamente rico em matéria-prima, o setor madeireiro representa apenas o quarto setor de atividade em produtos de exportação na Guiana (Office National des Forêts, 2003).

Uma análise global do mercado madeireiro da Guiana francesa não deve ignorar a realidade social do território, que possui umas das maiores taxas de crescimento demográfico do mundo (3,5%/ano) e uma taxa de desemprego correspondente a 21% da população ativa. Além disso, as exportações de madeira procedente desse departamento sofrem concorrência direta com os países vizinhos, dentre os quais o Brasil, onde o custo de mão de obra é duas a três vezes inferiores. Entre o corte e a serragem, mais de 50% da matéria lignosa é perdida, o que representa uma grande quantidade de resíduos produzidos por este setor. Hoje, na Guiana, esses resíduos não são valorizados.

Considerando as dificuldades econômicas da área frente à concorrência internacional e ao fraco mercado local, o investimento na pesquisa de novos produtos de alto valor agregado a partir dos resíduos da exploração florestal pode ser uma solução para estimular o setor madeireiro e aprimorar sua competitividade.

Este trabalho visa, portanto, descobrir novas vias de valorização dos remanescentes da exploração florestal e dos resíduos das serralherias através da pesquisa de moléculas com atividades antifúngicas ou inseticidas. Os resíduos de madeira contem grandes quantidades de matéria com níveis elevados de metabólitos secundários potencialmente valorizáveis.

II. Durabilidade natural

II.1 Madeira

A árvore é um ser vivo constituído principalmente de matéria lignosa estruturada pela justaposição de células organizadas com a precisão e a complexidade próprias aos vegetais superiores. Elas têm a capacidade de reagir face aos agressores exteriores sejam de origem climática como o vento ou a estiagem, seja de origem biológica como os insetos, os fungos ou as bactérias (Rayzal, 1998).

Em um corte transversal do tronco de uma árvore é possível observar que a madeira é de fato constituída por duas entidades distinguíveis: no exterior se encontra o albarno e no interior o cerne, geralmente mais escuro (Figura 3).



Figura 3 – Corte transversal do tronco de *Peltogyne* sp.

O albarno é a parte funcional da madeira, geralmente considerada como a parte viva do tronco. Apesar da presença de células vivas, a maior proporção em massa do albarno é constituída por traqueídios terminais de fibras libriformes não-vivas. As células do parênquima radial e longitudinal podem continuar vivas e funcionais durante muito tempo e uma vez mortas, contribuem para a formação do cerne.

O termo madeira designa, na maior parte das vezes, unicamente o cerne ou madeira perfeita que é a parte interna da tora. Segundo o IAWA (International Association of Wood Anatomists), o cerne é o "conjunto de camadas internas do tronco, que, nas árvores vivas, não contêm células vivas e nas quais a matéria de reserva (por exemplo, o amido) foi consumida ou transformada em metabólitos" (Taylor *et al.*, 2002).

Ainda hoje, o papel específico do cerne continua relativamente desconhecido, mas sua resistência aos ataques de patógenos, bem como sua contribuição ao suporte mecânico das árvores são claramente consideradas suas funções primárias (Plomion *et al.*, 2001).

II.2 Durabilidade natural e o papel dos metabólitos secundários

A capacidade de cada espécie de formar uma madeira capaz de resistir aos agentes de biodegradação é chamada durabilidade natural, e a durabilidade natural das espécies exploradas geralmente são conhecidas. Esse conhecimento orientou a utilização de diversas madeiras para a construção civil, a fabricação de objetos, de móveis, etc. (Figura 4).



Figura 4 – Pé de mesa egípcia esculpida em *Diospyros* sp. (Ebenaceae), cerca de 700 a.C. (©Musée du Louvre /C. Décamps)

“Extrato” é o termo utilizado para descrever todos os compostos ou metabólitos não estruturais presentes na madeira pela capacidade de serem extraídos por dissolução. Algumas dessas substâncias podem ser tóxicas para as células do parênquima e provocar sua morte durante a formação do cerne (Taylor *et al.*, 2002). Foi demonstrado na literatura que

as células cambiais poderiam ser afetadas pela presença de taninos (Taylor *et al.*, 2002) , que são particularmente abundantes no cerne de várias espécies.

Enquanto as células parenquimatosas morrem para formar o cerne, os metabólitos secundários se acumulam nos tecidos e asseguram a durabilidade natural da madeira (Carneiro *et al.*, 2009; Gierlinger *et al.*, 2004; Scheffer & Morrell, 1998; Pearce, 1996). O papel principal dessas substâncias tóxicas é a defesa passiva do cerne contra os agentes de degradação, sendo que vários destes mecanismos de defesa já foram evidenciados.

Entretanto, a quantidade de extrato presente no cerne não está relacionada diretamente à durabilidade natural da madeira. Em certos casos, a produção de metabólitos é orientada especificamente contra os organismos que degradam a madeira; sendo muito ativos e presentes, geralmente, em concentrações fracas. (Ohsawa *et al.*, 1992; Rodrigues *et al.*, 2009). Por outro lado, foi demonstrado que o extrato total é mais ativo que seus constituintes testados separadamente, demonstrando uma sinergia de ação entre os diferentes compostos. (Schultz & Nicholas, 2000; Schultz *et al.*, 1995). *Eperua falcata* (apa) ou certas espécies do gênero *Larix*, por exemplo, são capazes de produzir um cerne muito durável por impregnação de sua madeira com grandes quantidades de extrativos (entre 5 e 30%), os quais não são antifúngicos (Grabner *et al.*, 2005; Royer, 2008).

Existe certa variabilidade intra-específica da durabilidade natural, que resulta de uma variabilidade na distribuição dos extrativos, seja de origem genética ou ambiental. A espécie amazônica *Dycorinia guianensis*, por exemplo, mostra uma resistência variável aos agentes de biodegradação (Amusant *et al.*, 2004). Essas diferenças podem igualmente ser observadas em árvores de cultivo como o cedro japonês *Cryptomeria japonica* (Shibutani *et al.*, 2007).

Em um mesmo indivíduo, a distribuição específica das substâncias extrativas no interior do cerne pode influenciar localmente na durabilidade natural (Kleist & Schmitt, 1999). Por conseguinte, a característica de durabilidade natural não é repartida de forma homogênea na madeira de um mesmo indivíduo. De uma forma geral, as regiões externas, que correspondem ao cerne mais jovem (madeira madura, produzida pela árvore adulta), e

as zonas próximas da base são os lugares onde o cerne é mais durável (Scheffer & Morrell, 1998; Taylor *et al.*, 2002). No centro da árvore, encontra-se o cerne mais antigo (madeira juvenil, fabricado pela árvore jovem), as substâncias extrativas que ele contém são parcialmente degradados e são assim menos eficazes para a proteção da madeira. Por exemplo, diferenças importantes na qualidade e na quantidade de substâncias de extrativas no sentido radial do tronco de um mesmo indivíduo foram descritas no carvalho *Quercus sp.* (Mosedale *et al.*, 1996) ou na noqueira *Juglans sp.* (Burtin *et al.*, 1998). Neste último, os principais extrativos bioativos são compostos polifenólicos presentes em maior concentração na zona de transição entre o cerne e o alburno. O mesmo fenômeno foi descrito para a espécie *Robinia pseudoacacia*, para a qual a madeira jovem (cerne interno) é menos durável e contém menos extrativos ativos que a madeira madura (cerne externo) (Pollet *et al.*, 2008). Segundo Taylor *et al.* (2002), as substâncias extrativas ativas são sintetizadas no momento da formação do cerne e se degradam à medida que a madeira envelhece.

II.3 Medida da durabilidade natural

A durabilidade natural de uma madeira pode ser avaliada por ensaios padronizados de resistência ao ataque de fungos ou de cupins. Por exemplo, na Europa, os testes normatizados descritos pela AFPB (Association Française pour la Préservation du Bois) como a norma NF EN 350-1 (Guia dos princípios de ensaio e de classificação da durabilidade natural da madeira) são utilizados para a medida da durabilidade tanto em laboratório como também em condições naturais (Afnor, 1994a). Por exemplo, a classe da durabilidade contra o ataque dos fungos lignívoros é avaliada entre 1 e 5: classe 1 « muito durável », classe 2 “durável”, classe 3 “medianamente durável”, classe 4 “pouco durável”, classe 5 “não durável” (Guilley *et al.*, 2004; Rayzal, 1998). Cada classe corresponde a uma perda de massa da madeira estudada uma vez que a mesma foi exposta ao ataque dos fungos.

Existem inúmeras fontes de dados relativos à durabilidade natural de madeiras tropicais e temperadas; no entanto, os métodos para a avaliação da durabilidade não são sempre os mesmos (Afnor, 1994b; Aloui *et al.*, 2004; Borges *et al.*, 2008; Bultman & Southwell, 1976; Carneiro *et al.*, 2009; De Jesus *et al.*, 1998; Gonçalves & Oliveira, 2006;

Guilley *et al.*, 2004; Paes *et al.*, 2007; Scheffer & Morrell, 1998). Os dados a respeito da resistência das madeiras da América do sul diante do ataque de fungos, de cupins e de crustáceos avaliados por diversos métodos e publicados na literatura, foram agrupados no anexo 1 (página 232).

II.4 Mecanismos de degradação da madeira

A madeira é um conjunto complexo de polímeros naturais: a celulose, a hemicelulose e a lignina. A celulose representa sozinha aproximadamente 50% da massa total da madeira e se apresenta sob a forma de microfibrilas mais ou menos cristalinas. As hemiceluloses formam uma matriz que liga as microfibrilas de celulose entre si; e a lignina é um polímero hidrofóbico, de alta massa molecular, que impregna as paredes celulares e está associada às celulosas (Fujita & Harada, 1992; Tuor *et al.*, 1995).

Diferentes espécies de insetos e de fungos se alimentam principalmente da celulose e são, portanto, capazes de degradar a madeira, quando esta é encontrada em condições favoráveis de umidade, de temperatura e de exposição (Schultz *et al.*, 2007). A degradação da madeira desempenha um papel fundamental no ciclo do carbono. Em efeito, foi medido que a maior parte do carbono terrestre é armazenada sob a forma de matéria lignocelulósica (Suzuki *et al.*, 2006).

Degradação fúngica:

Os fungos lignívoros – também chamados podridões – pertencem à várias espécies sendo possível classificá-los em três grandes grupos, segundo o mecanismo de degradação envolvido: as podridões brancas e pardas (basidiomicetos), ou moles (ascomicetos e deuteromicetos). A maioria desses fungos é capaz de degradar simultaneamente a lignina e a celulose, porém existem diferenças nas taxas relativas de degradação de acordo com o tipo de ataque (Silva *et al.*, 2007; Tuor *et al.*, 1995).

Foi bem estabelecido na literatura que a maior parte desses fungos secreta enzimas extracelulares, mas que essas possuem um volume muito grande para penetrar a matriz lignocelulósica. Dessa forma, atualmente admitti-se, de forma geral, que os fungos lignívoros

secretam outros metabólitos, que associados ao ferro, podem originar radicais hidroxila (HO^\bullet), hidroperóxido (HOO^\bullet) ou peróxido (ROO^\bullet). Essas espécies reativas são capazes tanto de iniciar a degradação, quanto de perfurar a matriz favorecendo a passagem das enzimas fúngicas (Goodell *et al.*, 1997; Hammel *et al.*, 2002; Suzuki *et al.*, 2006).

Os basidiomicetos causadores da podridão branca secretam peroxidases, lacases e celulases extracelulares. Podem, assim, degradar seletivamente a lignina, e, ao mesmo tempo, consumir a celulose e as hemiceluloses (Hammel *et al.*, 2002; Schwarze, 2007), resultando em um branqueamento da madeira (Figura 5).

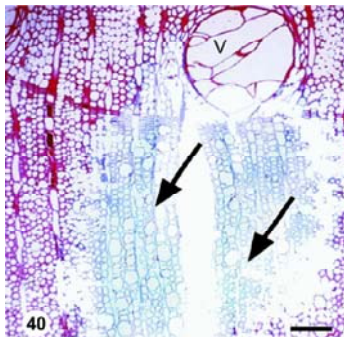


Figura 5 – Podridão branca: zona de decomposição branca causada pela *Grifola frondosa* nos carvalhos. As zonas deslignificadas (em azul, apontado pelas setas) são cercadas de regiões intactas. Escala 50 μm . (Fonte : Schwarze 2007)

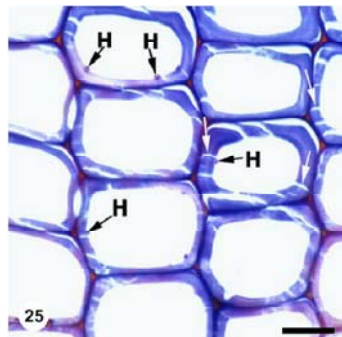


Figura 6 – Podridão parda: fissuras nas paredes secundárias de *Abies magnifica* degradada por *Fomitopsis pinicola* (setas brancas). A modificação da cor da parede nas proximidades das hifas (sinalizadas pelas setas pretas) indica que os polissacarídeos foram degradados. Escala 10 μm . (Fonte : Schwarze 2007)

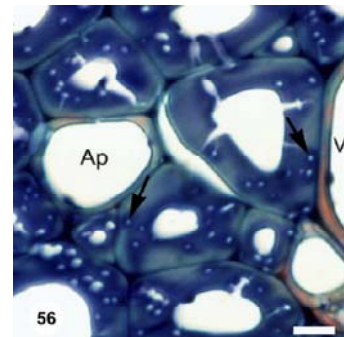


Figura 7 – Podridão mole : Secção transversal de madeira de plátano atacada por *Kretzschmaria deusta*. As células do parênquima axial (Ap) e os vasos não foram atacados. Observar as fissuras das paredes celulares. Escala 10 μm . (Fonte : Schwarze 2007)

Os fungos de podridão parda degradam preferencialmente os polissacarídeos da madeira, deixando traços de zonas amarronzadas onde a lignina se encontra sob uma forma oxidada (Figura 6) (Hammel *et al.*, 2002; Schwarze, 2007). É relevante notar que apenas 6% dos fungos lignívoros são fungos formadores de podridão parda, a maioria pertence à família

Polyporaceae e este tipo de degradação é associado especificamente à madeira das gimnospermas.

Os fungos de podridão mole se assemelham à podridão parda, no sentido em que eles degradam preferencialmente, os polissacarídeos em relação à lignina (Figura 7). Todavia, os mecanismos de degradação continuam relativamente desconhecidos (Hammel *et al.*, 2002).

Cupins:

Dentre os insetos capazes de consumir a madeira, os cupins são os mais importantes em termos de prejuízo econômico causados pelos estragos às obras em madeira. No neotrópico, existe mais de 500 espécies de cupins classificadas em 83 gêneros. As florestas úmidas e as regiões de savana da América do sul são biótopos particularmente ricos em cupins, tanto por sua abundância quanto por sua diversidade (Constantino, 1998; Constantino, 2002). Os cupins são insetos eussociais; eles fazem parte da ordem Isoptera, da qual a subfamília Nasutitermitinae (Figura 8) é mais diversificada (Sá *et al.*, 2008).



Figura 8 – *Nasutitermes macrocephalus* (Silvestri, 1903) (Foto: R. Constantino).

A casta dos cupins encarregadas da alimentação do ninho é a dos operários, que, comumente, é a mais numerosa na colônia. A celulose é a fonte principal de energia para os cupins e esse polímero pode ser obtido, entre outros, a partir da madeira. O mecanismo de digestão da celulose é diferente de acordo com a espécie de cupim considerada; permitindo classificá-los em três grandes grupos (Grassé, 1982):

- Aqueles que alojam protozoários flagelados simbiotes;
- Aqueles que alojam bactérias ou fungos simbiotes;

- Aqueles que são capazes de digerir a celulose sem associação simbiótica.

Foi demonstrado na literatura que os métodos de controle de infestações por cupins podem variar em função do alvo visado: seja o inseto diretamente, seja o organismo simbiote que contribui para a digestão da celulose. Diante disso, os compostos antibióticos podem ter uma ação termiticida ou repulsiva (Shelton & Grace, 2003).

II.5 Tratamento da madeira: dados numéricos e quadro legislativo

As madeiras não duráveis, ou putrescíveis, não podem ser utilizadas em contato direto com o solo já que os agentes de degradação representam uma ameaça para a obra. Dessa forma, as madeiras não duráveis ou insuficientemente duráveis precisam ser tratadas com um produto de preservação adaptados às condições de utilização na obra considerada, com o objetivo de prevenir o ataque de fungos lignívoros ou de insetos xilófagos (Evans, 2003; Freeman *et al.*, 2003; Fougerousse, 1960).

Existem vários métodos de tratamento de madeiras não duráveis: os tratamentos químicos por impregnação, os tratamentos de impermeabilização ou os procedimentos térmicos, entre outros. Os mais utilizados são os tratamentos por impregnação (Rayzal, 1998). O processo de tratamento depende do grau de exposição aos agentes de biodegradação nas condições de utilização da madeira, assim como de sua impregnabilidade (Rayzal, 1998). De acordo com o tratamento e a madeira considerada, o nível de proteção pode ser extremamente variável.

Atualmente, os produtos de preservação da madeira disponíveis no mercado podem ser reagrupados por família (Rayzal, 1998), segundo a seguinte classificação:

- Os compostos minerais fixos ou não fixos. Eles são à base de cromo VI (CrO_3 ou $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, fixador), de cobre II (CuO ou CuSO_4 , antifúngico) e um inseticida mineral como, por exemplo, os óxidos de arsênio (AsO_4^{3-} , As_2O_3) ou o ácido bórico (H_3BO_3). Outros elementos podem igualmente ser empregados como, por exemplo, o flúor ou os sais de mercúrio. Os tratamentos de cobre/cromo/arsênio (CCA) permitem atingir estabilidades excepcionais com

o tempo (boa atividade biológica e pouca lixiviação), com, no entanto, um custo ambiental e um custo em termos tóxicos relativamente altos.

- Os produtos orgânicos lipofílicos que podem ser aplicados sobre a forma de emulsão. Os inseticidas orgânicos empregados para a preservação das madeiras são, por exemplo, a permetrina ou o lindano, e certos azóis como o tebuconazol ou o propiconazol que foram desenvolvidos inicialmente para a agricultura, e são utilizados como fungicidas.
- Os produtos mistos, associando aos compostos minerais e os compostos orgânicos sintéticos.
- O creosoto, que é o produto mais antigo de preservação da madeira. Trata-se de um óleo viscoso destilado da hulha betuminosa. Ela é composta essencialmente de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. Esses compostos são cancerígenos; essa razão, hoje, esse é autorizado apenas para tratar postes telefônicos e os dormentes de linhas férreas.

No Brasil, a produção anual de madeira tratada (dados de 2005) é cerca de 685.000 m³, e apenas 3% desse volume é utilizado para a construção. Em comparação, a produção anual dos Estados Unidos é de 15 milhões de m³, e 70% é utilizada pra a construção civil (Sá *et al.*, 2009).

As legislações nacionais que regulam a comercialização de produtos de preservação da madeiras são divergentes. No Brasil, a lei nº 4.797 de 20 de outubro de 1965 tornou obrigatória a utilização de madeiras tratadas em obras de utilidade pública, construídas por empresas públicas ou privadas, destinadas aos transportes ferroviários e rodoviários, aos serviços telegráficos e telefônicos, e ao fornecimento de eletricidade (Ministério do Meio Ambiente, 1965).

Foi confiado ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) a função de controlar os equipamentos industriais de tratamento da madeira bem como o comércio das madeiras tratadas, de registrar das empresas de tratamento e os fabricantes de produtos de preservação (Ministério do Meio Ambiente, 1972).

Na França, a instância de regularização da indústria de preservação da madeira é a Associação Francesa de Normalização (AFNOR), que se respalda nas diretivas editadas pela AFPB (Associação Francesa para a Preservação da Madeira) e o CTBA (Centro Tecnológico da Madeira e Mobiliário). As principais leis em vigor objetivando a regulamentação da fabricação e a utilização de madeiras tratadas são aquelas utilizadas em toda a Comunidade Europeia. Trata-se da diretiva 89/106/CEE, que harmoniza a regulamentação técnica para os materiais de construção entre todos os países da CE, e da diretiva 98/8/CEE, ou « Biocida », que objetiva assegurar a saúde dos manipuladores de compostos tóxicos e regular a utilização dos biocidas agrícolas.

II.6 Tratamento da madeira - histórico e avanços

Os primeiros tratamentos de preservação de madeira a base de produtos industriais foram o creosoto, o pentaclorofenol, um biocida lipofílico orgânico (Figura 9), bem como as misturas fixantes do arsênico como o arseniato de cobre cromado (CCA) solúvel em água.

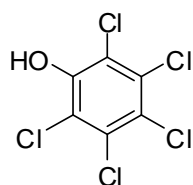


Figura 9 – Pentaclorofenol

Durante muitos anos, o CCA foi o produto de preservação mais empregado na América do Norte, entretanto a utilização desse produto foi proibida para o tratamento em habitações e foi substituído pelos produtos da segunda geração, ricos em cobre e sem arsênico (Schultz *et al.*, 2007). Atualmente, a controvérsia ligada ao emprego desses produtos à base de sais metálicos refere-se a seu impacto negativo sobre os ecossistemas aquáticos ao fim da vida de serviço das madeiras tratadas (Freeman *et al.*, 2006; Hsu *et al.*, 2007). De uma perspectiva legal, na Europa, a diretiva n°76/464/CEE de 4 de maio de 1976, bem como todas as leis resultantes dela, restringe a utilização de substâncias – inclusive o CCA – consideradas como perigosas para os ambientes aquáticos. No Brasil, a

comercialização e a utilização do pentaclorofenol foram proibidas em 1985 (Ministério da Agricultura, 1985), enquanto que a utilização do CCA ainda não possui restrições.

Na Europa, em uma parte da Ásia e na América do norte, os sistemas biocidas que substituíram o CCA, para o tratamento das madeiras de uso residencial. Estes são produtos hidrossolúveis de segunda geração, ricos em cobre (Cu^{II}), e no qual o metal ativo é associado a um biocida capaz de interromper o crescimento dos fungos resistentes ao cobre. Os produtos mais empregados são o amônio cobre quartenário (ACQ), que é associado a um amônio quartenário biocida, ao sulfato de cobre e ao cromato de cobre ácido. No entanto, além de que o cobre apresenta certa toxicidade – inferior ao do arsênico – no que dizem respeito aos ecossistemas aquáticos, esses produtos são relativamente corrosivos, principalmente frente ao alumínio (Shi *et al.*, 2007).

Na segunda geração de biocidas, encontramos igualmente os boratos como o octaborato de sódio ($\text{Na}_2\text{B}_8\text{O}_{13}$); estes são compostos de baixo custo, que têm um largo espectro de atividade contra os insetos e os fungos lignívoros, e não são corrosivos. Os produtos de tratamento a base do boro ou associações do boro com outros biocidas são eficazes contra as podridões da madeira e os cupins ao mesmo tempo (Clausen & Yang, 2007). Sua maior inconveniência vem do fato de que os boratos são facilmente lixiviados e não podem ser utilizados para o tratamento de madeiras expostas à umidade ou em contato com o solo (Preston, 2000).

A terceira geração de produtos de preservação de madeiras são os compostos biocidas orgânicos. Os triazóis como o tebuconazol ou o propiconazol (Figura 10) fazem parte desses novos produtos. Eles têm um largo espectro de atividade contra os fungos basidiomicetos, apresentando uma estabilidade e uma resistência à lixiviação aceitável. Podemos citar igualmente, os piretróides sintéticos como a permetrina (Figura 10) ou os neonicotinóides muito ativos como o imidacloprid ou o tiametoxam, os quais são utilizados particularmente para a proteção das madeiras contra os insetos xilófagos (Evans, 2003).

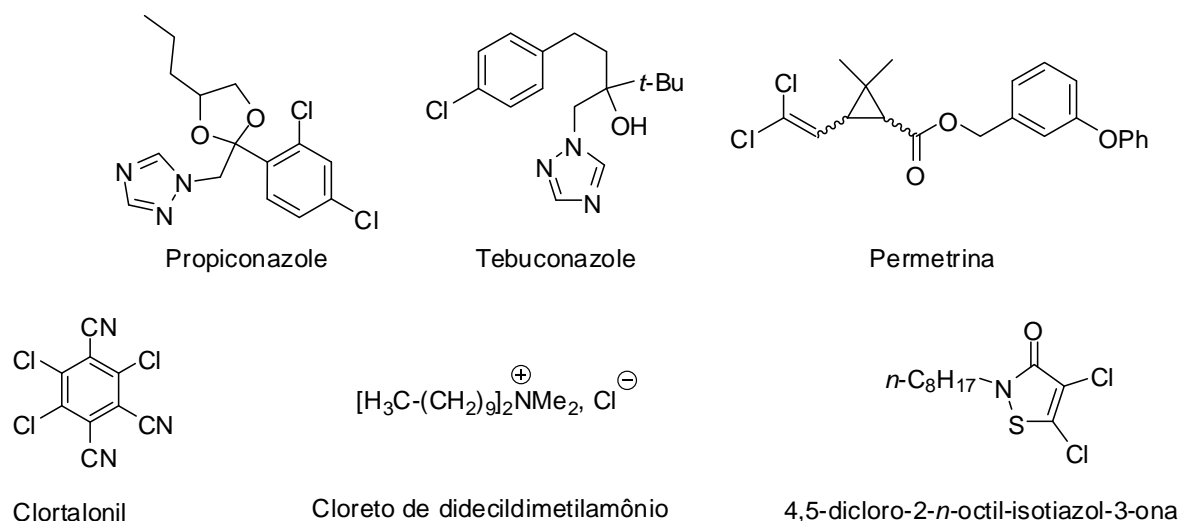


Figura 10 – Biocidas orgânicos de terceira geração utilizados para a preservação das madeiras.

Entretanto, os tratamentos com compostos orgânicos, são geralmente bastante seletivos, impedindo seja exclusivamente a formação de podridões, seja exclusivamente a degradação por insetos xilófagos. Diante disso, esses biocidas devem ser formulados em combinação de dois ou por vezes três derivados de atividades complementares, em função da classe de risco da madeira tratada no produto final (Evans, 2003; Schultz *et al.*, 2007). Dentre eles, poucos são ativos sobre os fungos e os cupins ao mesmo tempo. Podemos citar, por exemplo, o clortalonil (Figura 10) que, entre outros, apresenta um nível tóxico aos mamíferos relativamente fracos, resistindo bem à lixiviação, porém sua formulação é muito difícil na medida em que ele é altamente insolúvel e deve ser preparado em microemulsão. O cloreto de didecildimetilamônio (DDAC, Figura 10) e o 4,5-dicloro-2-n-octil-isotiazol-3-ona (DCOIT, Figura 10) apresentam, da mesma maneira, atividades de largo espectro sobre podridões e insetos, além de apresentarem muito boa estabilidade na madeira.

Por fim, temos que ressaltar que de uma maneira geral, os biocidas orgânicos são impregnados na madeira em índices de retenção relativamente baixos em comparação aos utilizados para os produtos da primeira geração. Por conseguinte, é particularmente importante obter uma aplicação perfeitamente homogênea sobre todo o volume de madeira a tratar a fim de garantir a eficácia do tratamento.

II.7 Compostos ligados à durabilidade natural das madeiras

Além dos tratamentos biocidas citados acima, a estratégia mais eficaz e mais satisfatória ambientalmente para proteger obras em madeira é utilizá-las de forma não tratadas, em função da classe de risco da obra final, aproveitando ao máximo sua durabilidade natural. Há alguns anos, certo número de trabalhos permitiram elucidar os mecanismos da durabilidade natural da madeira. Vários parâmetros parecem estar implicados nesse fenômeno: a densidade, a permeabilidade à água e, sobretudo, razão que nos interessa neste trabalho, os metabólitos secundários impregnada naturalmente nas madeiras (Chave *et al.*, 2006). Assim, podemos presumir que o estudo dos constituintes das madeiras capazes de induzir uma boa resistência ao ataque dos fungos e dos insetos pode permitir a descoberta de novos produtos fungicidas ou inseticidas; e que em um segundo momento, essas descobertas podem ser reinvestidas no quadro da preservação de madeiras não duráveis, para a obtenção de produtos biomiméticos de preservação aceitáveis em termos de toxicidade ao homem e ao ambiente.

II.7.1 Moléculas naturais fungicidas

Foi demonstrado que vários estilbenos, ou 1,2-difeniletilenos, estão presentes em quantidades importantes no cerne de varias espécies norte-americanas– *Robinia pseudoacacia*, *Morus nigra* e *Maclura pomifera* – capazes de tornar a madeira muito durável (Schultz *et al.*, 1995). A presença de estilbenos nessas madeiras foi detectada há cerca de trinta anos (Hart & Shrimpton, 1979). Foi estabelecido que o resveratrol ou o oxiresveratrol (Figura 11) possuem, sobretudo, atividades fungicidas *in vitro*; todavia, Schultz *et al.* (1990) puderam demonstrar que essa atividade não é transferível, uma vez que esses compostos isolados e impregnados em outra madeira, não conferem a durabilidade excepcional da madeira de origem. Nesse caso, foi postulado que esses estilbenos agem em sinergia com outras substâncias presentes na madeira.

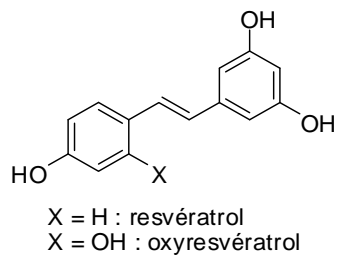


Figura 11 – Resveratrol e oxiresveratrol

Em outras madeiras, são os flavonóides que, segundo os autores, são responsáveis pela durabilidade natural (Amusant *et al.*, 2007; Ohmura *et al.*, 2000; Sekine *et al.*, 2009). Um estudo de relação estrutura-atividade a partir da latifolina (Figura 12), um neoflavonóide isolado de *Dalbergia latifolia*, demonstrou que as hidroxilações e as metoxilações que dão origem à diversidade dos flavonóides permitem modular as atividades inseticidas ou fungicidas desses compostos (Sekine *et al.*, 2009). Por exemplo, foi demonstrado que a presença de um grupamento hidroxila na posição 5 do núcleo A é crucial para a atividade inseticida, pois a presença simultânea de grupamentos hidroxila sobre as posições 5 e 2', localizadas respectivamente sobre os núcleos aromáticos A e B, permitem obter um composto de atividade fungicida.

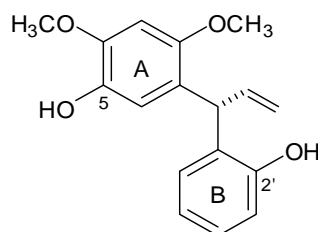


Figura 12 – Latifolina

Outros autores demonstraram, igualmente, a importância em certas espécies da presença de óleos essenciais para o combate contra as podridões da madeira. Esses óleos podem ser encontrados em todos os órgãos vegetais, inclusive na madeira, e possuem quase sempre excelentes atividades biológicas (Bakkali *et al.*, 2008). Por exemplo, o estudo do óleo essencial de folhas de uma canela endêmica de Taiwan, *Cinnamomum osmophloeum*, permitiu demonstrar que essa planta produz uma grande quantidade de cinamaldeído e que esse composto é capaz de inibir o crescimento de dois fungos lignívoros *Trametes versicolor* e *Laetiporus sulphureus* (Cheng *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2005). Outras pesquisas permitiram,

igualmente, colocar em evidência o impacto positivo direto da presença dos óleos essenciais no interior da madeira sobre a resistência face aos agentes de biodegradação. Em um estudo de 2006, vários óleos essenciais e extratos foram impregnados em blocos de alburno de *Cryptomeria japonica* e os blocos assim tratados foram colocados em contato com cupins e fungos lignívoros (Kartal *et al.*, 2006). Foi demonstrado assim que os blocos tratados com uma formulação de ácido cinâmico, de cinamaldeído e de ácido ferrúlico apresentaram uma excelente resistência a degradação fungicida. Segundo Yen *et al.* (2008a), é possível potencializar a ação antifúngica do cinamaldeído quando ele é combinado em uma formulação com de eugenol, um composto de atividade antioxidante. Em outra pesquisa mais recente, foi demonstrado que o óleo essencial de menta bem como seu constituinte principal, o mentol possui uma boa capacidade de proteção da madeira quando aplicados sobre cubos de cerne de seringueira (*Hevea brasiliensis*) expostos ao ataque de fungos lignívoros e de cupins (Matan, 2009). Além disso, várias espécies da família Cupresseceae foram estudadas quanto à relação entre composição química e durabilidade natural. Por exemplo, outra espécie muito durável endêmica de Taiwan, *Calocedrus macrolepis*, produz um óleo essencial antifúngico e termiticida, no qual a atividade está ligada à presença de T-muurolol e de α -cadinol. Além disso, a mesma planta contém a β - e a γ -tujaplicina, os quais apresentam excelentes propriedades antifúngicas devido a sua capacidade de se complexar com os metais; extravasamentos ao nível do citoplasma foram observados nas hifas fúngicas (Yen *et al.*, 2008b).

Os mecanismos de ação dos compostos implicados na forte durabilidade natural das espécies lenhosas foram elucidados através do estudo dos mecanismos da degradação da madeira pelos fungos lignívoros. Assim, foi demonstrado que eles estimulam a formação de radicais livres catalisados pelos metais de transição nos primeiros estágios de decomposição da lignocelulose. Existem, atualmente, numerosas evidências mostrando que os extraíveis de madeiras duráveis atuam por mecanismos de ação complementares: antifúngicos, quelantes de metais e redutores de radicais livres (Ragon *et al.*, 2008; Schultz & Nicholas, 2000). Assim, foi bem estabelecido que os compostos fenólicos polihidroxilados da família dos flavonóides desempenham um papel chave na durabilidade natural mesmo sem possuir por si só atividade antifúngica (Ohmura *et al.*, 2000). Hoje, a pesquisa por novos tratamentos de preservação da madeira visa também, a descoberta de fórmulas ativas nas quais vários

compostos de atividade complementares possam agir em sinergia para proteger de maneira eficaz uma madeira não-durável (Binbuga *et al.*, 2008; Mabicka *et al.*, 2004; Mabicka *et al.*, 2005; Schultz *et al.*, 2002; Schultz *et al.*, 2006). Por exemplo, muitas flavonas e cromonas polihidroxiladas possuem a capacidade de reduzir o ferro III e de se complexar fortemente ao ferro II assim produzido, impedindo assim, a ativação das enzimas ferrosas fúngicas na degradação da madeira (Binbuga *et al.*, 2008).

A mimetização desses mecanismos naturais de autoproteção das madeiras duráveis permite aprimorar de maneira significativa a eficácia das preparações a base de biocidas orgânicos que, podem assim ser utilizadas em menores quantidades, reduzindo o custo ambiental e do tratamento. Dessa forma, foi demonstrado por vários autores que a adição de quelantes ou de antioxidantes nas formulações a base de biocidas orgânicos permite melhorar o nível de proteção de duas a três vezes em comparação com o biocida utilizado sozinho. Por exemplo, Schultz et Nicholas (2000, 2002) mostraram que se associando um antioxidante comercial não fungicida como o hidroxitolueno butilado (2,6-di-*tert*-butil-4-metilfenol, BHT) ou o propil galato com vários biocidas orgânicos, foi possível melhorar sensivelmente a resistência da madeira a degradação fúngica em relação ao tratamento com o antifúngico sozinho. O mesmo resultado foi obtido por Mabicka *et al.* (2005), que demonstraram um efeito de sinergia significativo associando-se um antifúngico, o *N*-óxido de 2-hidroxipiridina (2-HPNO) com o ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) que é um quelante, ou com Irganox® 1076 [octadecil 3-(3,5-di-*tert*-butil-4-hidroxifenil)propanoato] que é um antioxidante fenólico análogo do BHT. Strippoli *et al.* (2000) demonstraram que mesmo quando se trata de fungos patógenos para o homem (*Candida spp.* no artigo considerado) a associação de um antifúngico pouco ativo, o imidazol, com o propil galato reduziu, de acordo com as cepas testadas, a concentração inibidora máxima de 10 a 150 vezes em comparação ao obtido com o imidazol sozinho. Em outro estudo, o octil galato, uma molécula permeável às membranas celulares, foi associada ao cinamaldeído (Hsu *et al.*, 2007). O octil galato é antifúngico e sua atividade foi atribuída ao grupo pirogalhol, capaz de se ligar à superfície hidrofílica das membranas enquanto o octil interfere com a dupla camada lipídica. Esses dois compostos, o octil galato e o cinamaldeído, têm uma atividade antifúngica sinérgica.

Por fim, é preciso destacar que além da ação já conhecida dos metabólitos secundários extraíveis, certos metabólitos primários como as lectinas, proteínas capazes de se ligar aos açúcares, se associam de maneira irreversível aos monos e oligossacarídeos das paredes celulares de vegetais. Foi demonstrado que esse mecanismo poderia explicar a resistência de certas madeiras diante do ataque dos fungos lignívoros e dos insetos (Carlini & Grossi de Sá, 2002; Peumans & Van Damme, 1995; Sá *et al.*, 2009a). Particularmente, a atividade antifúngica de certas lectinas já foi descrita para *Castaneda mollisima* e *Talisia esculenta*, e no caso de *Myracrodruon urundeuva*, a presença de lectinas antibacterianas e antifúngicas parece explicar pelo menos em parte a durabilidade natural da (Sá *et al.*, 2009b).

II.7.2 Moléculas naturais inseticidas

Na classe dos terpenóides, as meliacinas (limonóides) são os compostos que apresentam o maior potencial como inseticidas. Essas meliacinas foram isoladas principalmente das famílias Rutaceae, Cneoraceae e Meliaceae. É dessa última família que os compostos que possuem os mais largos espectros de atividade tanto em termos de diversidade de insetos afetados quanto em termos de diversidade de mecanismos de ação, foram isolados. A espécie *Azadirachta indica* é altamente resistente ao ataque de insetos xilófagos. Cerca de cem triterpénóides já foram caracterizados a partir das sementes, da madeira, das cascas, das folhas e dos frutos (Barbosa *et al.*, 2007). Dentre esses triterpénóides, convém citar a azadiractina (Figura 13), que é uma molécula inseticida capaz de inibir a síntese da quitina e é utilizada como termiticida (Doolittle *et al.*, 2007). Foi demonstrado, que em oito dias de contato, os extratos dessa espécie são capazes de eliminar quase totalmente *Pseudotriconympha grassii*, um simbiote hospedeiro do intestino posterior do cupim *Coptotermes formosanus* (Rhinotermitidae) (Doolittle *et al.*, 2007). Atualmente, várias patentes internacionais descrevem a utilização de extratos, de óleos essenciais ou de substâncias puras provenientes de *Azadirachta indica* como inseticidas (Shin *et al.*, 2003; White, 2003).

Além disso, outros compostos ativos foram isolados a partir de diversas espécies temperadas ou tropicais. Em um estudo de triagem, onze óleos essenciais de origem variada foram testados quanto à sua atividade termiticida diante de *Coptotermes formosanus* (Cheng *et al.*, 2007). Foi demonstrado que os óleos da madeira de *Calocedrus macrolepis* var. *formosana* (Cupressaceae) e *Cryptomeria japonica* (Taxodiaceae) possuem excelentes atividades inseticidas, com 100% de mortalidade em 5 dias a níveis de exposição de 2,5 mg de produto por grama de papel filtro. Por outro lado, os óleos essenciais do cerne e do alburno de outra Cupressaceae, *Taiwania cryptomerioides*, foram também bastante estudados. Estabeleceu-se que dois terpenos que ela contém, o ferruginol e o cedrol, induzem 100% de mortalidade sobre *Coptotermes formosanus* em 7 dias a uma dose de 10 mg/g (Chang *et al.*, 2001).

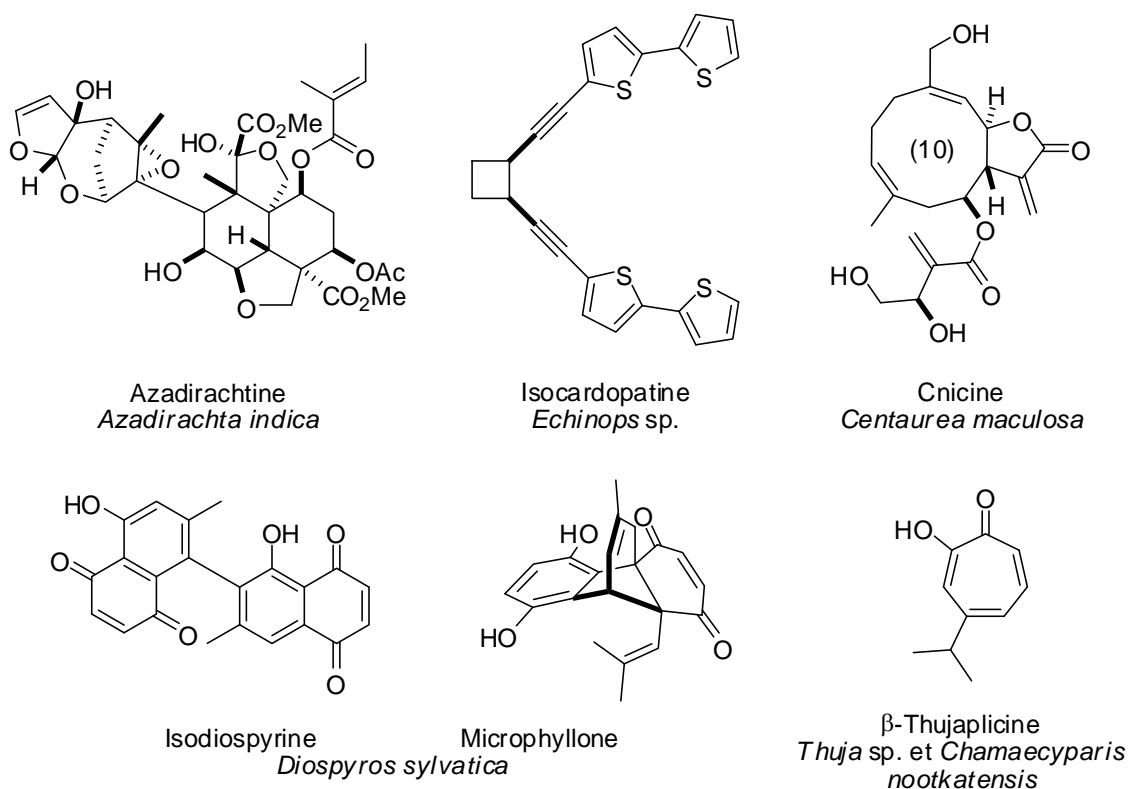


Figura 13 – Substâncias naturais inseticidas

Em 2006, a atividade termiticida de 220 extratos brutos de plantas coletadas no Cazaquistão e na Grécia foi também avaliada em *C. formosanus*. Quatro espécies do gênero *Echinops* (Asteraceae) possuem excelentes atividades inseticidas e antifúngicas e a partir delas, oito tiofenos ativos dentre os quais a isocardopatina (Figura 13) foram isolados (Fokialakis *et al.*, 2006). Um estudo realizado pela equipe de Nova Orleans, uma das cidades dos Estados Unidos onde a degradação das madeiras pelos cupins são muito frequentes, pode demonstrar que três compostos de origem vegetal como o apiol, a vulgarona B e a cnicina (Figura 13) são também termiticidas (Meepagala *et al.*, 2006).

No gênero *Diospyros* (Ebenaceae) conhecido por conter triterpenos e naftoquinonas (Carter *et al.*, 1978), a plumbagina, a isodiospirina e a microfilona (Figura 13), todos termiticidas, foram isolados a partir da espécie *D. celebica*, enquanto a 7-metiljuglona foi isolada de *D. virginiana*, uma espécie altamente resistente à degradação causada pelos cupins subterrâneos *Reticulitermes lucifugus* e *R. flavipes* (Ganapaty *et al.*, 2004, Carter *et al.*, 1978). De outra espécie de madeira que contem quinonas, a teca (*Tectona grandis*, Verbenaceae), foi isolada a tectoquinone (ou 2-metilntraquinona) que possui uma atividade inseticida capaz de conferir esta madeira uma excelente durabilidade natural (Thulasidas & Bhat, 2007).

A partir de *Xylopia aethiopica* (Annonaceae) foram isoladas pela primeira vez em 1995 lignamides fenólicas e terpenos semelhantes ao *ent*-Kaurano que mostrou atividade repulsiva aos cupins (Lajide *et al.*, 1995).

Finalmente, Taylor *et al.* (2006) isolaram o carvacrol, o tujato de metila, o ácido tújico, as γ e β -tujaplicinas (Figura 13) e o β -tujaplicinol a partir do extrato metanólico do cerne da *Thuja plicata* (tuia) e o de *Chamaecyparis nootkatensis*. Estas duas espécies são capazes de se especializar na formação de madeira muito resistente ao ataque dos cupins. De outra espécie (*Thujopsis dolabrata*, Cupressaceae) muito conhecida no Japão por ter sido usada para a construção do templo Konjiki, de 800 anos, foi demonstrado que as mesmas γ - e β -tujaplicinas, assim como a β -dolabrina são fontes excepcionais da durabilidade natural desta madeira e, em especial, sua excelente resistência ao ataque de cupins (Inamori *et al.*, 2000).

Conforme as observações dos estudos dos mecanismos de autopreservação de madeiras duráveis contra a degradação fúngica, é provável que os antioxidantes possam retardar o ataque da madeira pelos cupins, interferindo nos mecanismos de oxidoredução durante a transformação de polissacarídeos em acetato, fonte de energia dos cupins (Kappler & Brune, 2002; Ohkuma, 2003; Ohmura, 2000; Ragon *et al.*, 2008; Schultz *et al.*, 2008). Quando esses mecanismos são alterados, a produção de acetato pode ser retardada ou inibida, induzindo à morte do inseto. Este mecanismo particular tem sido invocado para explicar a boa capacidade termiticida de extratos com alto teor de flavonóides e taninos (Santana *et al.*, 2010). Da mesma forma que as lectinas inibem o consumo da madeira pelos fungos, elas parecem impedir o seu consumo por cupins. Um estudo realizado sobre *Myracrodruon urundeuva* (Anacardiaceae), uma madeira muito usada no Brasil por sua excelente resistência ao ataque de cupins, demonstrou que uma lectina isolada dessa madeira foi tóxica contra operários da espécie *Nasutitermes corniger* (Nasutitermitinae) em uma concentração letal de 50% em quatro dias de 0,248 mg.ml⁻¹ (Sá *et al.*, 2008)

II.8 Utilização de extratos ou moléculas provenientes de espécies duráveis para a preservação da madeira

Existem apenas alguns exemplos de transferência de substâncias extraíveis de espécies capazes de sintetizar madeiras muito resistentes à biodegradação, a fim de proteger madeiras não-duráveis.

Primeiramente, a partir de uma mistura de borato, tiabendazol, voriconazol e β -tujaplicina, foi possível obter um produto ativo contra *Reticulitermes flavipes* (Rhinotermitidae), fungos de podridão mole e os fungos lignívoros *Poria placenta*, *Gloeophyllum trabeum* e *Trametes versicolor* (Clausen & Yang, 2007).

Entre 2000 e 2002, Onuorah tratou cubos de madeira obtidos do alburno de *Antiaris toxicaria* com extratos de metanólicos de *Afzelia africana*, *Milicia excelsa* e *Erythrophleum suaveolens* e, expondo-os em seguida, a fungos lignívoros (Onuorah, 2000; Onuorah, 2002). Todos os extratos testados tiveram eficiência comparável ao CCA quando impregnados com

uma concentração de 144 kg por m³ de madeira. Foi mostrado também, que o extrato de *E. suaveolens* impregnado a 48 kg.m⁻³ inibe o crescimento do fungo *Lenzites trabea* (sin *Gloeophyllum trabeum*) *in vitro* com a mesma eficiência que o CCA, na mesma taxa de retenção. Combinações de extratos de *E. suaveolens*, *Chromolaena odorata* e *Azadirachta indica* foram testados no Gana em ensaios de contato com o solo durante um período de cinco anos. Depreende-se que a formulação mais eficaz foi aquela em que o alburno de *A. toxicaria* foi tratado com uma mistura de extratos de *E. suaveolens* e *C. odorata* (Antwi-Boasiako & Damoah, 2010). Em outro estudo Islam *et al.* (2009) demonstraram que o extrato de *Azadirachta indica* foi capaz de proteger a madeira de *Mangifera indica* (manga) e *Albizia saman* nos testes de solo e em contato com uma cepa de podridão branca, *Schizophyllum commune*.

Em outro estudo, resíduos provenientes da exploração da madeira de *Callitris glaucophylla* (Cupressaceae), na Austrália, conhecido como cipreste branco, foram eficazes na proteção de madeiras não-duráveis (Powell *et al.* 2000). Inicialmente, foi demonstrado que o pó da madeira misturado em 5% de volume de meio de cultura inibiu 100% do crescimento dos fungos *Trametes versicolor* e *Coniophora olivacea*. Por outro lado, o extrato metanólico foi ligeiramente ativo na preservação do pinheiro silvestre (*Pinus sylvestris*), quando exposto à presença de um outro fungo, *Fomitopsis lilicano-gilva* (perda de massa de quase 22% no teste padrão em seis meses a uma taxa de retenção de 112%). A utilização como agente termiticida de um extrato de outra espécie de cipreste (*C. columellaris*), foi protegida por uma patente que indica que este extrato é muito eficaz contra *Coptotermes acinaciformis* (Smith, 2000).

Finalmente, um estudo de algumas espécies amazônicas destacou que extratos da madeira de *Bagassa guianensis*, *Erismia uncinatum*, *Buchenavia parvifolia*, *Pouteria guianensis* e *Dinizia excelsa* foram transferidos para blocos de embaúba (*Cecropia* sp.) e marupá (*Simarouba amara*). Houve uma ligeira resistência ao ataque de cupins *Nasutitermes*, com diminuição da perda de massa dos blocos, por vezes, em mais de 50% (Barbosa *et al.* 2007; Peres Filho *et al.*, 2006).

Uma das principais dificuldades relacionadas ao uso de substâncias naturais extraídas para a proteção de madeira não durável é a solubilização dos compostos. Isto ocorre principalmente, nos extratos brutos em meio aquoso a fim de implementar os métodos de impregnação sob pressão de madeira maciça. Em um estudo de 2007, foi possível solubilizar o cinamaldeído, o óleo de alecrim, o timol, o carvacrol e o citral em água utilizando-se uma polivinilpirrolidona, e os autores demonstraram que a atividade antifúngica destes produtos não foi afetada (Maoz *et al.*, 2007). Este sistema é, portanto, adequado para a realização de tratamento de impregnação com compostos ou extratos lipofílicos.

Em conclusão, estes estudos descrevem em parte, as possibilidades de transferência de durabilidade a partir de madeiras resistentes sobre madeiras não duráveis pela transferência de metabólitos secundários bioativos. Entretanto, a adaptação das condições de impregnação destes compostos frequentemente lipofílicos, parece demonstrar a viabilidade da hipótese de que extrativos da madeira podem se tornar ingredientes ativos naturais para a concepção de novos produtos de preservação da madeira. É provável que a natureza do extrato e a sua concentração na madeira tratada, a natureza desta madeira, assim como as suas condições de exposição sejam também fatores importantes na determinação da eficácia de um produto de preservação.

III Objetivos

Podemos considerar razoável a hipótese segundo a qual os metabólitos secundários utilizados nos vegetais que os produziram como um método de defesa passiva frente os agentes de biodegradação, também possam ser aplicados para fins semelhantes, mais especificamente de fundo tecnológico. Assim, o objetivo deste trabalho é descobrir dentre as árvores da Guiana Francesa, cuja a madeira é excepcionalmente durável, produtos que possam ser valorizados na área da preservação da madeira, tanto para tratamento antifúngico, quanto termiticida. Alguns extratos podem, eventualmente, ter dupla propriedade (inseticida e antifúngica). Estas substâncias ativas podem ser utilizadas para desenvolver novos produtos de preservação da madeira que sejam menos prejudiciais ao meio ambiente e igualmente eficazes nos tratamentos já existentes no mercado.

Além disso, foi proposto testar a hipótese de que se as substâncias de origem vegetal são antifúngicas frente às podridões, podem ser também bons candidatos para o tratamento de afecções dermatológicas e sistêmicas de origem fúngica em seres humanos. Em efeito, é conhecido que certas vias metabólicas, incluindo os alvos de drogas antifúngicas, são ubíquas no reino dos fungos (Martinez-Rossi *et al.*, 2008). Por exemplo, a maioria das drogas antifúngicas interferem em diferentes fases a biossíntese do ergosterol, dependendo da classe do composto. Os azóis inibem o lanosterol 14- α -desmetilase, que participa da fase final de conversão do lanosterol em ergosterol. Esses compostos azólicos são utilizados tanto para o tratamento de doenças humanas quanto para a preservação da madeira. O segundo objetivo deste trabalho é portanto, estudar a correlação entre as atividades fungicidas sobre fungos lignívoros e fungos patogênicos humanos. Finalmente, os extratos mais promissores foram fracionados a fim de isolar os compostos responsáveis por essa atividade antifúngica.

IV Doenças fúngicas humanas

IV.1 Contexto

As infecções fúngicas, desde um simples pé de atleta até infecções sistêmicas graves e debilitantes associadas a altas taxas de mortalidade, representam um dos mais graves problemas de saúde pública mundial. (Hay, 2006, Lupi *et al.*, 2005; Warnock, 2007).

Considera-se que existam três principais classes de micoses: superficiais, subcutâneas ou sistêmicas (Hay, 2006). A presença de pequenas lesões superficiais é relatada no mundo inteiro, mas a alta umidade e o calor induzem a uma maior incidência dessas doenças na zona intertropical, onde são observadas frequentemente, lesões causadas por leveduras do gênero *Malassezia*, causando uma hiper ou hipopigmentação da pele na área afetada, como braços, pescoço ou barriga (Hay, 2006; Giddey *et al.*, 2007).

Com raras exceções, as micoses subcutâneas – micetomas, esporotricoses, cromoblastomicose, etc. – concentram-se nas regiões intertropicais e subtropicais. A transmissão ocorre por meio da inoculação traumática do fungo na pele. O agente patogênico pode permanecer confinado ao tecido subcutâneo ou derme, mas algumas cepas podem causar ferimentos graves, podendo afetar os músculos e ossos; a imunossupressão é também um fator agravante (Lupi *et al.* 2005).

As micoses sistêmicas são relativamente diversificadas e muitas vezes graves. Tratam-se geralmente de infecções fúngicas oportunistas (que afetam principalmente pacientes imunocomprometidos, independentemente da localização) e de lesões relacionadas a agentes patógenos capazes de afetar indivíduos saudáveis (Lupi *et al.*, 2005; Hay, 2006). Estes podem ser geograficamente restritos à algumas regiões como a paracoccidioidomicose ou difundidos em todo o mundo, como a histoplasmose e a criptococose. Estas doenças são freqüentemente contraídas através de inalação e afetam principalmente o sistema respiratório.

A incidência das infecções fúngicas sistêmicas oportunistas vem aumentando significativamente em todo o mundo, e o parâmetro-chave no desenvolvimento dessas doenças é a predisposição do paciente, imunologicamente afetado por uma cirurgia ou doença debilitante (câncer, AIDS , etc.) (Bastert *et al.*, 2001; Nucci & Marr, 2005; Warnock, 2007). Pacientes submetidos à terapia imunossupressora (como transplantes ou doenças auto-imunes) também podem ser afetados.

Hoje, a fraca eficácia relativa, a toxicidade e baixa solubilidade dos antifúngicos comercializados, assim como o aumento da população imunocomprometida e o surgimento de cepas quimio-resistentes fazem com que a pesquisa por novas moléculas antimicóticas seja necessária (Martinez-Rossi, 2008; Sanglard, 2002). É possível supor que a natureza tenha selecionado soluções ao longo do processo de evolução que permitam às plantas constituídas, principalmente de polissacarídeos persistirem em florestas tropicais, até mesmo por centenas de anos. Sendo aplicadas, portanto, como modelos na busca de novas substâncias para o tratamento de doenças fúngicas humanas. Assim, a atividade antifúngica de extratos de madeira ativos sobre fungos lignívoros também serão avaliados sobre cepas patogênicas para os seres humanos como leveduras e fungos dermatófitos.

IV.2 Leveduras

As leveduras patogênicas podem induzir a lesões localizadas ou sistêmicas. Nos trópicos, a incidência de lesões superficiais benignas relacionadas a leveduras do gênero *Malassezia* é crescente (Hay, 2006). Dentre as doenças fúngicas que podem ameaçar a vida dos pacientes, as lesões sistêmicas causadas por espécies do gênero *Candida* – as candidoses – são as mais frequentes (Nucci & Marr, 2005). Em 2003, nos Estados Unidos, o gênero *Candida* foi classificado em quarto lugar entre as causas de doenças nosocomiais (Pappas *et al.*, 2003). Nos anos 80, a principal levedura patogênica responsável por infecções fúngicas invasivas era a *Candida albicans*. *C. albicans* é um fungo polimórfico que coloniza naturalmente o sistema gastrointestinal e reprodutivo humano, não sendo patogênico para indivíduos não-sensíveis. *C. glabrata* foi outrora considerada como um saprófita presente em indivíduos saudáveis. Hoje, a proporção de micoses causadas por *C. glabrata* aumenta muito rapidamente ; este micro-organismo é a terceira espécie mais isolada no diagnóstico

de candidoses (Brown *et al.*, 2007, Li *et al.*, 2007). De fato, durante a última década, verifica-se que a incidência de candidoses tem aumentado devido à maior virulência de espécies não-*albicans*, como *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. dubliniensis* e *C. tropicalis* (Raska *et al.*, 2007; Weig & Brown, 2007). Tem sido demonstrado que as taxas de resistência de isolados sanguíneos de *C. glabrata* ao fluconazol podem atingir níveis de 7 a 14% em hospitais nos Estados Unidos e de 3,7 a 40% em alguns hospitais europeus (Baixench *et al.*, 2007, Matta *et al.*, 2007). Postula-se que este aumento da virulência está ligado à pressão na utilização dos azóis durante os anos 90. Assim, 50% das candidoses hoje são causadas por *Candida* não-*albicans*.

As candidoses podem ser superficiais, localizadas e sistêmicas. Quando são superficiais, as lesões são principalmente mucocutâneas, e a cavidade oral, faringe, esôfago, intestino, bexiga e vagina podem ser afetados (Raska *et al.* 2007, Brown *et al.*, 2007). As formas sistêmicas podem afetar vários órgãos, incluindo o cérebro, o fígado, baço, pulmão, olhos, coração e rins. O tratamento destas patologias ainda é um desafio pois as candidoses só afetam pacientes debilitados e com diagnóstico frequentemente tardio (Bastert *et al.*, 2001). Dessa forma, a taxa de mortalidade dos pacientes com candidoses sistêmicas é de aproximadamente 50% (Pappas *et al.*, 2003).

IV.3 Fungos dermatófitos

As infecções fúngicas superficiais são patologias causadas por fungos dermatófitos parasitas que afetam os tecidos queratinizados (pele, cabelos, unhas), vivos ou inanimados. Os principais agentes etiológicos das dermatofitoses podem ser reagrupados em três gêneros de fungos anamórficos assexuados (ou imperfeitos) – *Epidermophyton*, *Microsporum* e *Trichophyton* – da classe Eurotiomicetos (Weitzman & Summerbell, 1995). Hoje, o *Trichophyton rubrum* é o fungo clinicamente encontrado com maior frequência no Brasil e no mundo (Chan, 2002; Cruz *et al.*, 2007).

As dermatofitoses são comumente chamadas tinhas, com manifestações clínicas resultantes da degradação fúngica da queratina, uma proteína rica em cisteína produzida por estes tecidos especializados devido as suas propriedades impermeabilizantes (Weitzman & Summerbell, 1995). Para consumir a queratina, os dermatófitos secretam exoproteases que hidrolisam as ligações peptídicas produzindo aminoácidos livres, usados como nutrientes. Essas enzimas são consideradas as principais causas de reações imunológicas induzindo uma hipersensibilidade nas imediações da lesão (Giddey *et al.*, 2007). Uma relação direta entre a patogenicidade das cepas e a quantidade de queratinases secretadas foi demonstrada em um estudo com diferentes cepas de *Microsporum canis* (Weitzman & Summerbell, 1995).

As dermatofitoses não são fatais por si só, mas podem ser debilitantes, principalmente em pacientes mais frágeis. As manifestações clínicas variam muito, dependendo do hospedeiro e das espécies de fungo (Vermont *et al.*, 2008). Os dermatófitos estão entre os parasitos mais frequentemente associados aos humanos. Eles persistem ao longo de gerações, apesar das numerosas terapias atualmente disponíveis para o tratamento antifúngico (Weitzman & Summerbell, 1995), devido ao surgimento de mecanismos de resistência aos medicamentos (Martinez-Rossi *et al.*, 2008). Em geral, em indivíduos saudáveis as infecções agudas são eliminadas através de uma resposta imune. Entretanto, algumas espécies de dermatófitos como *Trichophyton rubrum* e *Microsporum canis* são capazes de se adaptar eficazmente ao hospedeiro, podendo causar infecções crônicas com nenhuns ou poucos sintomas (Vermont *et al.*, 2008).

IV.3 Tratamento de micoses

IV.3.1 Histórico

No início do século passado, as doenças infecciosas juntas foram a principal causa de mortalidade em seres humanos (Raska *et al.*, 2007; Badiie *et al.*, 2009). Hoje, a incidência têm caído de forma acentuada devido ao saneamento e à descoberta de vacinas e moléculas antimicrobianas. No entanto, a incidência de doenças fúngicas tem aumentado, pelas razões acima mencionadas.

No final do século XIX, os únicos medicamentos disponíveis eram sais inorgânicos, como o permanganato de potássio, arsênico, cloreto de mercúrio ou iodeto de potássio. Esses sais foram utilizados para o tratamento de micoses superficiais. A acriflavina, violeta genciana e os ácidos benzóico, acetilsalicílico, undecanóico ou undecilênico e outros foram introduzidos nas práticas terapêuticas no começo do século XX, sempre para o tratamento de doenças de pele. Estes foram portanto, os primeiros medicamentos antifúngicos orgânicos de uso tópico (Gupta & Cooper, 2008).

Em geral, deve-se notar que o desenvolvimento de novos tratamentos contra infecções fúngicas está relativamente "atrasado" em relação ao desenvolvimento de novos agentes antibacterianos. Por exemplo, a anfotericina B, a droga mais eficaz para o tratamento de infecções fúngicas graves, foi descoberta em 1956. Uma das principais razões para justificar esse atraso é que as células fúngicas se assemelham às dos mamíferos – fungos e animais são eucariontes – o que implica em que as moléculas identificadas como agentes antifúngicos são muitas vezes tóxicas (Georgopapadakou & Walsh, 1996).

IV.3.2 Medicamentos antifúngicos atuais

Dependendo do mecanismo de ação, podemos distinguir cinco grupos de compostos utilizados no tratamento antifúngico atualmente (Georgopapadakou & Walsh, 1996). Trata-se dos azóis, das alilaminas e dos tiocarbamatos, morfolinis, polienos e pirimidinas. Os três primeiros grupos de compostos atuam interferindo na biossíntese do ergosterol, e os polienos interagem com o ergosterol presente na membrana. O ergosterol é específico das células fúngicas – os animais produzem o colesterol – e, portanto, representam um dos principais alvos para a pesquisa de compostos antifúngicos.

A figura 14 mostra os locais de ação dos antifúngicos que inibem a biossíntese do ergosterol que é um análogo do colesterol e o principal esterol da membrana plasmática de células fúngicas. Em particular, ele mantém a fluidez e permite sua estabilidade. Além disso, o funcionamento das enzimas membranares fúngicas como a quitina sintase, crucial para o crescimento e a divisão celulares é dependente da presença do ergosterol para a manutenção da membrana em sua conformação nativa (Martinez-Rossi *et al.*, 2008).

A figura 15 (página 50) representa as estruturas de alguns dos principais antifúngicos utilizados em terapia.

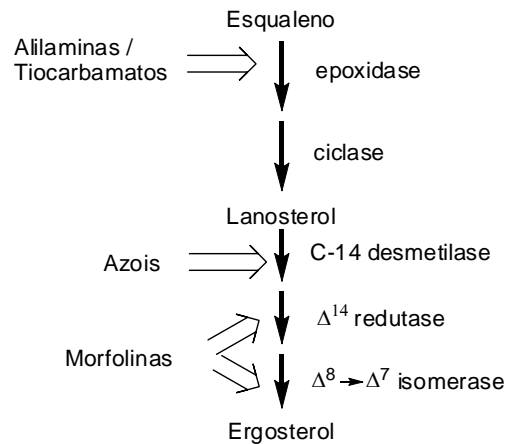


Figura 14 – Via de biossíntese do ergosterol representando os sítios de inibição de diferentes antifúngicos (Fonte: Georgopapadaku & Walsh, 1996)

Polienos:

O polienos são sintetizados por bactérias do gênero *Streptomyces* são os fungicidas de mais amplo espectro de atividade. Eles rompem a membrana plasmática por complexação ao ergosterol, criando poros permeáveis aos cátions que saem do citoplasma (Georgopapadaku & Walsh, 1996). Os antifúngicos polienos são a anfotericina B (Figura 15) e a nistatina.

Azóis:

Os derivados azólicos, descobertos no final dos anos 60, são todos de origem sintética. Eles são ou imidazólicos ou triazóis. As três principais drogas neste grupo, por ordem cronológica de descoberta, são o cetoconazol, o fluconazol e o itraconazol (Figura 15). Os análogos mais antigos só podem ser administrados por via tópica, enquanto que estes três compostos podem também ser administrados por via sistêmica (Bastert *et al.*, 2001).

Alilaminas e tiocarbamatos:

As alilaminas utilizadas atualmente no tratamento contra infecções fúngicas são a terbinafina e a naftifina, e o tolnaftate é um tiocarbamato. Estes compostos são inibidores

reversíveis da esqualeno epoxidase, uma enzima que sintetiza o substrato necessário para a fase de tetraciclicação do esqualeno em lanosterol catalisado pela oxidosqualeno ciclase. Isso resulta em uma diminuição da produção de ergosterol e um acúmulo de esqualeno, o que afeta a estrutura e as funções de transporte de nutrientes na membrana (Georgopapadakou & Walsh, 1996). Estes compostos são altamente ativos contra os dermatófitos e são utilizados para o tratamento das dermatofitoses e onicomicoses (Georgopapadakou & Bertasso, 1992).

Morfolinas:

As morfolinas desenvolvidas na década de 70 são todas de origem sintética e, com exceção da amorolfina, que é administrada topicamente contra as onicomicoses, são todos fungicidas agrícolas. Eles também atuam sobre a via de biossíntese do ergosterol, inibindo a Δ^{14} reductase e a $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ isomerase. Eles são análogos dos carbocátions intermediários de duas transformações catalisadas por estas enzimas. O resultado é um acúmulo de 24-metileno ignosterol na membrana plasmática, cujas propriedades são posteriormente alteradas. Estas morfolinas são fungistáticas (Bastert *et al.*, 2001 ; Georgopapadakou & Walsh, 1996).

Pirimidinas:

A 5-fluorocitosina tem um espectro de atividade relativamente restrito e é utilizado especialmente em combinação com a anfotericina B nos casos de candidoses disseminadas. Ela é transportada para o interior das células fúngicas por uma citosina permease, desaminada em 5-fluorouracila, que é transformada em trifosfato de nucleosídeos e incorporadas ao RNA onde ela induz a erros de codificação. A 5-fluorouracila é igualmente convertida em um desoxinucleosídeo inibindo a timidilato sintase e, portanto, a síntese do DNA. A 5-fluorocitosina é relativamente pouco tóxica para células de mamíferos, devido à ausência ou muito baixa atividade de citosinas desaminases (Georgopapadakou & Walsh, 1996).

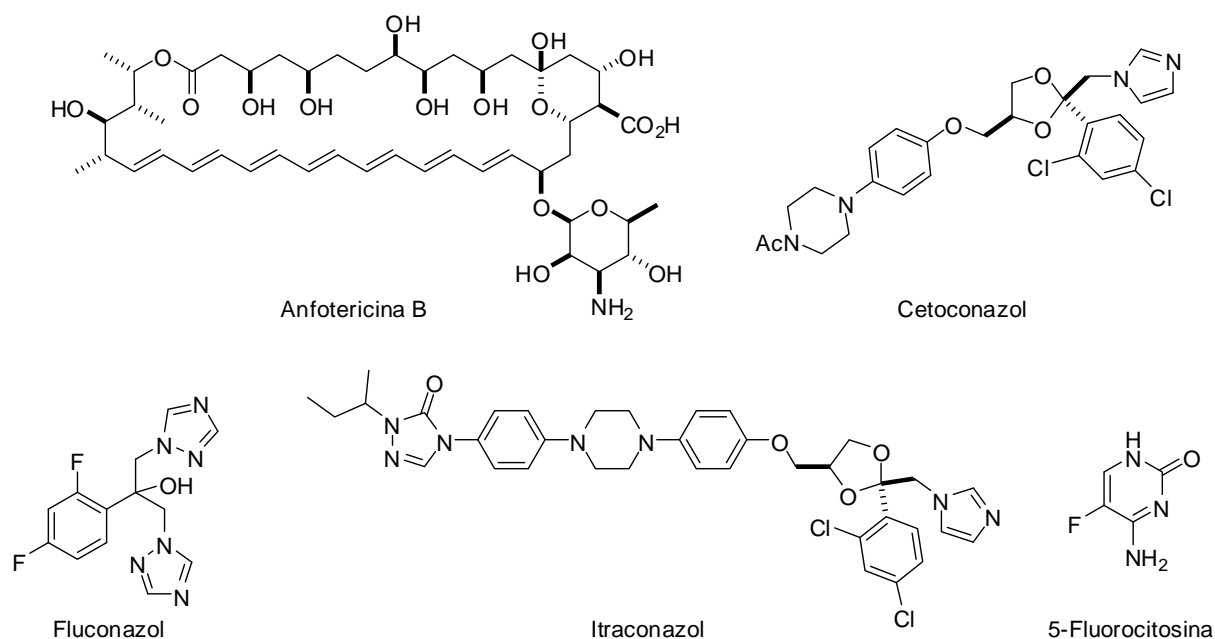


Figura 15 – Estrutura de alguns antifúngicos utilizados contra infecções fúngicas sistêmicas.

IV.4 Plantas e princípios naturais antimicóticos

IV.4.1 Estratégias de pesquisa de substâncias antifúngicas

Entre os anos 1981 e 2006, 29 drogas antifúngicas foram colocadas no mercado. De 2003 a 2006, cinco novos antifúngicos foram aprovados nos Estados Unidos: quatro derivados azólicos sintéticos e um produto da classe das equinocandinas (Newman & Cragg, 2007). Estes novos antimicóticos interferem na síntese da parede celular de fungos pela inibição não competitiva da 1,3- β -D-glucano sintetase, uma enzima encontrada na maioria dos fungos, mas ausente em células de mamíferos. Atualmente, não existem drogas de origem vegetal ou inspiradas a partir de uma substância isolada de uma planta no arsenal de tratamentos antifúngicos. As únicas substâncias naturais em ensaios clínicos de fase I e II em pacientes afetados por infecções fúngicas sistêmicas são de origem bacteriana (derivados da aureofacina e da cispentacina, um β -aminoácido cíclico) (Butler 2005). Já está bem estabelecido na literatura que a concorrência vital entre os microorganismos que ocupam o mesmo nicho ambiental induz o surgimento de mecanismos moleculares de defesa. A busca de substâncias antifúngicas a partir de bactérias é uma abordagem biomimética baseada no papel ecológico desses compostos ativos na sobrevivência das espécies que os produzem (Beghyn *et al.*, 2008).

Embora o relativo fracasso da investigação de substâncias antifúngicas a partir de plantas, o reino vegetal é uma das fontes mais promissoras de compostos antifúngicos. De fato, os vegetais desenvolveram ao longo de sua evolução, mecanismos moleculares complexos de interação com seu meio ambiente, incluindo a produção de metabólitos secundários. O que seriam considerados atrativos para os polinizadores a fim de garantir sua reprodução, e tóxicos para insetos herbívoros na proteção das folhas e caules e, finalmente, compostos de proteção contra infecções microbianas (Demain, 2009). A pesquisa destes compostos pode ser realizada utilizando abordagens etnofarmacológicas ou quimiotaxonômicas, ou pela triagem de bibliotecas de moléculas ou extratos de origem natural. Abordagens do tipo "triagens inteligentes" podem oferecer novas soluções (Havey, 2008; Li & Vederas, 2009).

IV.4.2 Algumas plantas antifúngicas

Vários estudos baseados em dados etnofarmacológicas reportaram informações sobre plantas usadas na medicina tradicional (Gertsch, 2009). De fato, hoje existem muitos estudos cujo objetivo principal é verificar a atividade antifúngica de extratos de plantas para o tratamento de infecções fúngicas (Rios & Recio, 2005). Em particular, um estudo avaliou a atividade de 320 plantas usadas em sete países da América Latina, mostrando que as práticas tradicionais podem melhor orientar a busca de compostos antifúngicos em relação à uma seleção aleatória de plantas, especialmente contra dermatófitos (Svetaz *et al.*, 2010).

No Peru, 24 espécies utilizadas tradicionalmente foram avaliadas em *Candida albicans*, *Trichophyton mentagrophytes* e *Microsporum gypseum* (Rojas *et al.*, 2003). Em outro estudo, 16 espécies utilizadas tradicionalmente na América Latina foram avaliados em 11 cepas de fungos patogênicos (Freixa *et al.*, 1998). Note-se que os extratos da casca de *Andira inermis* e de *A. surinamensis* (Fabaceae), duas espécies que podem se especializar na formação de madeira extremamente durável foram identificadas como ativas nesta publicação. No Paraguai, um estudo da atividade de extratos de várias partes de 14 plantas usadas contra diversas doenças de pele em 11 fungos patogênicos permitiu a identificação de três espécies ativas, dentre as quais *Tabebuia avellanadae* (Bignoniaceae), uma espécie amazônica formadora de madeira resistente (Portillo *et al.*, 2001). No Canadá, demonstrou-

se que dentre 14 espécies utilizadas pelos povos indígenas, o extrato da casca do *Juglans cinerea* (Juglandaceae), uma espécie norte-americana, foi ativo em cinco cepas patogênicas (Omar *et al.*, 2000) .

Infelizmente, esses quatro estudos realizados sobre espécies do Novo Mundo relatam apenas os resultados obtidos pelo método de difusão em ágar, o que não permite uma estimativa confiável da atividade de um extrato (Svetaz *et al.*, 2010) . Deve-se notar, porém, que os trabalhos que visam validar ou não o uso de plantas e utilizam medidas de atividade obtidas por meio de testes em diluições seriadas descrevem os valores de atividade para alguns extratos.

No México, por exemplo, os extratos de 18 plantas utilizadas tradicionalmente para o tratamento de pele foram testados em quatro cepas patogênicas. O extrato hexânico de folhas de *Eupatorium aschenbornianum* (Asteraceae) apresentou um valor de concentração inibitória mínima (CIM) de 30 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ para *Trychophyton mentagrophytes* (Navarro Garcia *et al.*, 2003). No Canadá, um estudo de 14 espécies utilizadas tradicionalmente descreve a atividade antifúngica das espécies *Potentilla simplex* (Rosaceae) e *Epilobium angustifolium* (Onagraceae), com valores de CIM de 25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ em *Candida glabrata* (Webster *et al.*, 2008). Na África do Sul, testes realizados com 350 espécies de plantas permitiram demonstrar a atividade de extratos de folha de *Curtisia dentata* (Cornaceae), *Terminalia sambesiaca* e *Terminalia phanerophlebia* (Combretaceae), em concentrações inferiores à 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ em *Candida albicans* (Shai *et al.*, 2008). No Brasil, um estudo de plantas tradicionalmente usadas no estado de Sergipe demonstrou que extratos de *Ziziphus joazeiro* (Rhamnaceae) e *Caesalpinia pyramidalis* (Fabaceae) foram ativos contra *Trichophyton rubrum* e *Candida guilliermondii* com valores de CIM de 6,25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (Cruz *et al.*, 2007). Num estudo recente sobre espécies do cerrado brasileiro, Melo e Silva *et al.* (2009) também descrevem a atividade antifúngica de *Renealmia Alpinia* (Zingiberaceae) em vários isolados clínicos de *Trichophyton rubrum* (CIM = 23 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). E, finalmente, o extrato aquoso da espécie *Juglans regia* (Juglandaceae) mostrou forte atividade antifúngica (CIM = 0,6 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) em *Trychophyton violaceum* em uma seleção de plantas utilizadas tradicionalmente na Palestina (Ali & Shtayeh Abu Ghdeib, 1999).

IV.4.3 Algumas substâncias antifúngicas de origem vegetal

As substâncias mais frequentemente isoladas em plantas que mostram atividade antifúngica são os alcalóides, flavonóides, quinonas e terpenos – sesquiterpenos, diterpenos e triterpenos (Ríos & Recio, 2005).

Em 2000, quatro antraquinonas foram isoladas do ruibarbo - *Rheum emodi* (Polygonaceae): a rheína, a fisciona, a aloe-emodina e o crisofanol (Figura 16). Estes compostos apresentaram atividade antifúngica (CIM) em *C. albicans*, *C. neoformans* e *Trichophyton mentagrophytes* entre 25 e 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (Agarwal *et al.*, 2000). Em outro estudo, foi demonstrado que o 6-cinamoiloxi-1-hidroxiudesm-4-en-3-ona, um sesquiterpeno isolado de *Vernonanthura tweedieana* (Asteraceae), é ativo em *T. mentagrophytes* a uma concentração de 4 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (CIM) (Portillo *et al.*, 2005). Além disso, o estudo do extrato hidroalcoólico de folhas de *Piper regnellii* (Piperaceae), usado no Peru para o tratamento de lesões dermatológicas, permitiu isolar eupomatenóide-5 (Figura 16), uma neolignana ativa em concentrações entre 15 e 62 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ em *Trichophyton mentagrophytes*, *T. rubrum*, *Microsporum canis* e *M. gypseum* (Koroishi *et al.*, 2008).

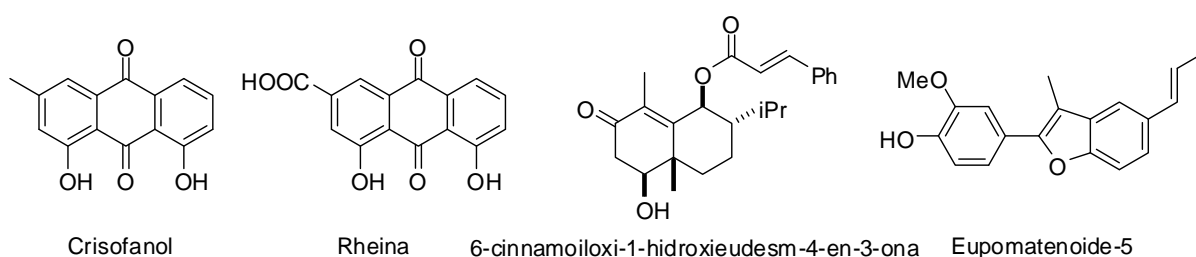


Figura 16 – Compostos antifúngicos isolados de *Rheum emodi* (rheína e crisofanol), *Vernonanthura tweedieana* (6-cinamoiloxi-1-hidroxiudesm-4-en-3-ona) e *Piper regnellii* (eupomatenóide-5).

A sakuranetina, uma flavonona isolada de *Heterothalamus alienus* (Asteraceae), apresenta uma atividade antifúngica em *T. mentagrophytes* e *T. rubrum* a uma concentração de 31,2 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (Pacciaroni *et al.*, 2008). Dois alcalóides diméricos foram isolados de sementes das espécies *Chimonanthus praecox* (Calycanthaceae), a D- calycanthine e L- folicanthine. Estes dois compostos inibem o crescimento de *Sclerotinia sderotiorum*, um fungo patógeno, a uma concentração de 29,3 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (Zhang *et al.*, 2009). A curcumina, isolada do rizoma da *Curcuma longa* (Zingiberaceae) mostrou notável atividade antifúngica

em cepa de *Paracoccidioides brasiliensis* (CIM = 0,5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), e é capaz de inibir 80% da adesão de *Candida* spp. em células epiteliais bucais (Martins *et al.*, 2009a). Sintetizando os dois enantiômeros da goniotalamina (Figura 17), uma molécula isolada de espécies do gênero *Goniothalamus* (Annonaceae), Martins *et al.* (2009b) demonstrou que essas substâncias têm uma atividade antifúngica moderada (CIM entre 32 e 128 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) em cepas de *Candida*.

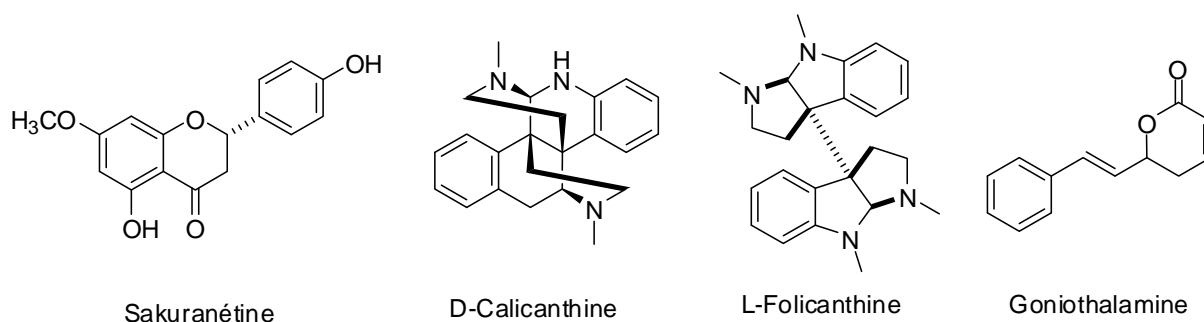


Figura 17 – Compostos antifúngicos isolados de *Heterothalamus alienus* (sakuranetina), *Chimonanthus praecox* (D-calicanthine e L-folicanthine) e *Goniothalamus* ((R) - e (S)-goniothalamine).

IV.4.4 Óleos essenciais antifúngicos

É interessante notar que a atividade antifúngica dos óleos essenciais e seus constituintes, conhecidos por suas propriedades antimicrobianas em geral (Bakkali *et al.*, 2008), têm sido amplamente descritos nos últimos 15 anos (Rios & Recio, 2005).

Gurgel *et al.* (2005) e Fontenelle *et al.* (2008) descreveram a atividade antifúngica do látex de *Croton urucurana* (Euphorbiaceae) e óleo de *C. argyrophylloides* em três cepas de *Microsporum*. Os óleos essenciais de duas espécies endêmicas de orégano da Grécia, *Origanum scabrum* e *O. microphyllum* (Lamiaceae) foram descritos como antifúngicos, enquanto alguns dos componentes majoritários desses óleos – carvacrol, terpin-4-ol, linalol, sabineno, e α - e γ -terpinenos – são conhecidos por possuírem propriedades antifúngicas e, decausarem durabilidade natural de diversas espécies de madeira (Aligiannis *et al.*, 2001; Hsu *et al.*, 2007).

Em um estudo realizado em 2007 sobre os óleos essenciais de *Leptospermum petersonii* e *Syzygium aromaticum* (Myrtaceae) – o cravo-da-índia, cujas utilizações já são

bem documentadas – dois compostos antifúngicos, o eugenol e o geraniol (figura 18) mostrou atividade em três cepas de fungos dermatófitos (Park *et al.*, 2007).

Finalmente, Pyun & Shin (2006) demonstraram a atividade dos óleos essenciais de *Allium sativum* for. *pekinense*, *A. cepa*, *A. fistulosum* e da alicina (Figura 18), isolados destes óleos, em três cepas de *Trichophyton*. Além disso, este estudo mostrou um efeito sinérgico entre a alicina e cetoconazol nas mesmas cepas.

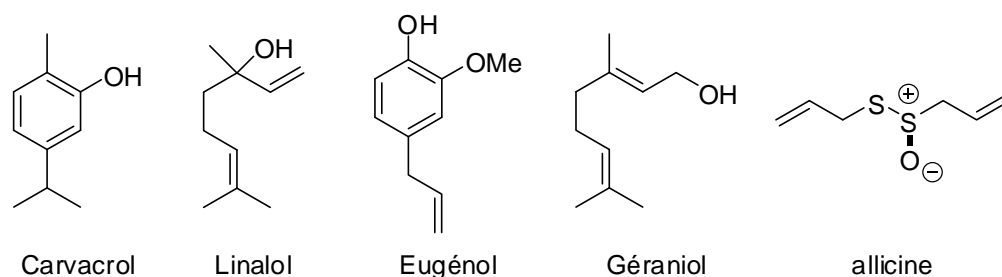


Figura 18 – Compostos voláteis antifúngicos isolados de *Origanum* sp. (carvacrol e linalol), *Syzygium aromaticum* (eugenol e geraniol) e *Allium sativum* (allicina).

V Espécies selecionadas

V.1 Critérios para a seleção das espécies

As espécies selecionadas neste estudo estão listadas na tabela 1 baseadas

- 1) no volume de madeira explorada na Guiana Francesa,
- 2) na durabilidade natural das madeiras consideradas,
- 3) no regime de exploração silvícola gerado pelo Office National des Forêts.

Diospyros dichroa (Ebenaceae) não é uma espécie explorada e foi coletada como uma espécie equivalente ao Boco (*Bocoa prouacensis*, Fabaceae), uma madeira muito densa e muito durável. A espécie (*Apeiba petoumo*, Tiliaceae) foi coletada devido à suposta utilização desta madeira em construções tradicionais ("carbets") por impedir a passagem de cupins (Pierre Charles-Dominique, comunicação pessoal; Otmar N'Gwete, comunicação pessoal).

Tabela 1 – As espécies selecionadas para o estudo, classificadas por famílias.

Nome científico	Família	Durabilidade fungos	Resistência cupins	Nome vernacular francês	Nome vernacular brasileiro	N° herbário
<i>Tabebuia serratifolia</i> (Vahl) Nichols.	Bignoniaceae	1	D	Ebène verte, ipé	Pau d'arco amarelo	RODRIGUES A. 4
<i>Goupia glabra</i> Aubl.	Celastraceae	3	D	Goupi	Cupiúba	RODRIGUES A. 16
<i>Diospyros dichroa</i> Sandw.	Ebenaceae	Ind.	Ind.			RODRIGUES A. 2
<i>Andira surinamensis</i> (Bondt) Splitgerber	Fabaceae	2	D	Saint-martin rouge	Andira-uchi	
<i>Bocoa prouacensis</i> Aubl.	Fabaceae	1	D	Boco	Muirea jibóia	RODRIGUES A. 1
<i>Dicorynia guianensis</i> Amsh.	Fabaceae	2	M	Angélique	Angelico do pará	RODRIGUES A. 8
<i>Diplotropis purpurea</i> (Rich.) Amsh.	Fabaceae	2	D	Cœur dehors	Sucupira	RODRIGUES A. 17
<i>Dipteryx odorata</i> (Aublet) Willd	Fabaceae	1	D	Gaïac de Cayenne, tonka	Cumarú	RODRIGUES A. 14
<i>Eperua falcata</i> Aubl.	Fabaceae	1	D	Wapa	Apa	RODRIGUES A. 3
<i>Hymenolobium flavum</i> Kleinh.	Fabaceae	3	S	Saint-martin jaune	Angelim da mata	RODRIGUES A. 10
<i>Ormosia flava</i> (Ducke) Rudd.	Fabaceae	Ind.	Ind.			RODRIGUES A. 9
<i>Peltogyne</i> sp.	Fabaceae	2-3	D	Amarante, bois violet	Roxinho	RODRIGUES A. 18
<i>Vouacapoua americana</i> Aubl.	Fabaceae	1	D	Wacapou	Acapu	RODRIGUES A. 6
<i>Sextonia rubra</i> (Mez) van der Werff	Lauraceae	2	D	Grignon franc	Louro gamela	RODRIGUES A. 12
<i>Bagassa guianensis</i> Aubl.	Moraceae	1	D	Bagasse	Tatajuba	RODRIGUES A. 13
<i>Manilkara huberi</i> (Ducke) Chevalier	Sapotaceae	1	D	Balata franc	Maçaranduba	
<i>Manilkara paraensis</i> (Huber) Standl.	Sapotaceae	1	D	Balata franc	Maçaranduba	RODRIGUES A. 5
<i>Apeiba petoumo</i> Aubl.	Tiliaceae	Ind.	Ind.	Peigne macaque	Pente de macaco	RODRIGUES A. 11
<i>Qualea rosea</i> Aubl.	Vochysiaceae	3	S	Gonfolo rose	Mandioqueira rosa	RODRIGUES A. 7

^a Classificação tirada da base « Tropix » – <http://tropix.cirad.fr/>. 1 : muito durável ; 2 : durável ; 3 : moderadamente durável ; 4 : pouco durável ; 5 : não durável. Ind : indeterminado.

^b Classificação tirada da base « Tropix » – <http://tropix.cirad.fr/>. Três classes de susceptibilidade são observadas : D : durável ; M : moderadamente durável ; S : sensível.

V.2 Conhecimentos sobre as espécies selecionadas

V.2.1 Espécie da família Bignoniaceae

A única espécie dessa família selecionada para este estudo é a *Tabebuia serratifolia* (Figura 19) que, juntamente com *T. impetiginosa*, é coletada por explorações madeireiras na Guiana Francesa e Brasil, e cuja madeira é comercializada sob o nome de “ipê ou ebène vert”. O ipê é uma das madeiras mais densas e mais duráveis da Amazônia, sendo explorado e exportado devido a estas propriedades únicas. As exportações dessa madeira do Brasil aumentou 500% entre 1998 e 2004. Sabendo-se que toda a produção de ipê é proveniente de atividade extrativista, a pressão sobre as populações naturais de *Tabebuia*, especialmente no Brasil, pode ter consequências importantes para o equilíbrio e regeneração de uma espécie valorizada pela indústria madeireira (Schulze *et al.*, 2008).

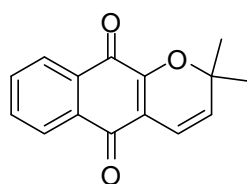
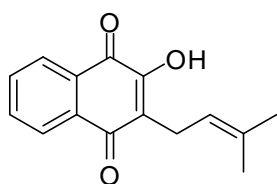


Figura 19 – Lapachol (esquerda) e dehidrolapachona (centro) isoladas a partir da madeira de *Tabebuia serratifolia* (à direita)

Paradoxalmente, apesar da forte reputação do ipê, deve-se notar que *T. serratifolia*, a espécie coletada neste estudo, foi pouco estudada. Algumas quinonas dentre o lapachol e dehidrolapachona (Figura 19) foram identificadas na madeira desta espécie e podem ser responsáveis por sua durabilidade natural excepcional (Vidal-Tessier *et al.*, 1988). No gênero *Tabebuia*, algumas espécies foram estudadas anteriormente, e as atividades biológicas têm sido descritas. Foi demonstrado, por exemplo, que os extratos da casca de *T. cassinoides* e *T. ochracea* possuem atividades antimalárica e citotóxica relacionadas à presença de furanonaftoquinonas (Perez *et al.* 1997, Rao & Kingston, 1982). Outras naftoquinonas também têm sido isoladas de várias *Tabebuia*. De Moura *et al.* (2001) e Pinto *et al.* (2000) constataram que esses compostos possuem atividade tripanocida frente ao *Trypanosoma*

cruzi, agente etiológico da doença de Chagas. O 2-(hidroximetil)antraquinona, isolado de *T. impetiginosa*, mostrou-se fortemente antibacteriano em *Helicobacter pylori* (Park *et al.*, 2006). De forma geral, as espécies do gênero *Tabebuia* têm um histórico de utilização tradicional na Amazônia para o tratamento de uma série de doenças como a sífilis, as febres, a malária e doenças de pele (este termo inclui as infecções fúngicas da pele). Essas atividades estão provavelmente relacionadas à presença de quinonas em todas as espécies deste gênero (Cragg & Newman, 2005).

V.2.2 Espécie da família Celastraceae

Goupia glabra, classificada como Celastraceae ou Goupiaceae de acordo com os autores, é uma espécie de crescimento rápido frequente em florestas secundárias na Guiana Francesa (Lacoste & Alexander, 1991). *Goupia glabra* faz parte de um gênero que abrange apenas quatro espécies, todas nativas da América tropical. Das folhas de *G. glabra*, um estudo na literatura descreve o isolamento de duas tropolonas citotóxicas dentre elas, a goupiolona (Figura 20) (Mesa-Siverio *et al.*, 2003). Nenhum outro estudo fitoquímico foi descrito para *Goupia glabra* ou outra espécie deste gênero.

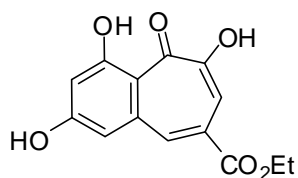


Figura 20 – Goupiolona (à esquerda), tropolona isolada da madeira de *Goupia glabra* (à direita).

V.2.3 Espécie da família Ebenaceae

Esta família inclui três gêneros, *Diospyros* é o que abrange maior número de espécies (mais de 500). A espécie *Diospyros dichroa* nunca havia sido estudada, mas neste gênero, vários estudos têm descrito o isolamento de triterpenos sobretudo a partir das folhas e de naftoquinonas a partir da madeira e das raízes (ver também a Figura 13 na página 37). Tem sido demonstrado que algumas destas naftoquinonas possuem propriedades antifúngicas, antibacterianas ou termiticidas (Babul *et al.*, 2009; Ganapaty *et al.*, 2004). As naftoquinonas

isoladas com maior frequência neste gênero são a plumbagina e a diospirina (Figura 21), cujas atividades biológicas, incluindo inseticidas e fungicidas, têm sido demonstradas (Dzoyem *et al.*, 2007; Ndhlala *et al.*, 2008; Sreelatha *et al.*, 2010).

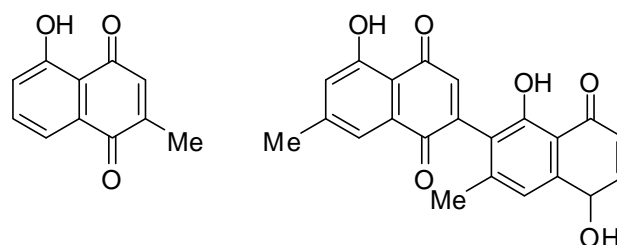


Figura 21 – Plumbagina (esquerda) e diospirina (à direita)

V.2.4 Espécies da família Fabaceae

Andira surinamensis é, juntamente com *Andira coriacea*, a espécie cuja madeira é conhecida como andira uchi ou saint martin rouge. Sua madeira é avermelhada e muito durável. O gênero *Andira* conta com uma centena de espécies; no Brasil, a *Andira* tem sido utilizada tradicionalmente como anti-helmíntico, e tem sido demonstrado que o extrato bruto da casca de *A. surinamensis* possui propriedades fungicidas sobre fungos patogênicos humanos (Freixa *et al.*, 1998). Em outro estudo, Almeida *et al.* (2008) puderam identificar cinco isoflavonóides, incluindo um dímero desta mesma espécie (Figura 22); entretanto nenhum teste biológico foi realizado (Almeida *et al.*, 2008). Estes compostos, com exceção do dímero são bem conhecidos como metabólitos do gênero *Andira*, entre outros, e para os quais numerosas atividades biológicas já foram descritas (Cocker *et al.*, 1962, Kraft *et al.*, 2001 e Kraft *et al.*, 2002; McMurry *et al.*, 1972, Silva *et al.*, 2000, Da Silva *et al.*, 2008).

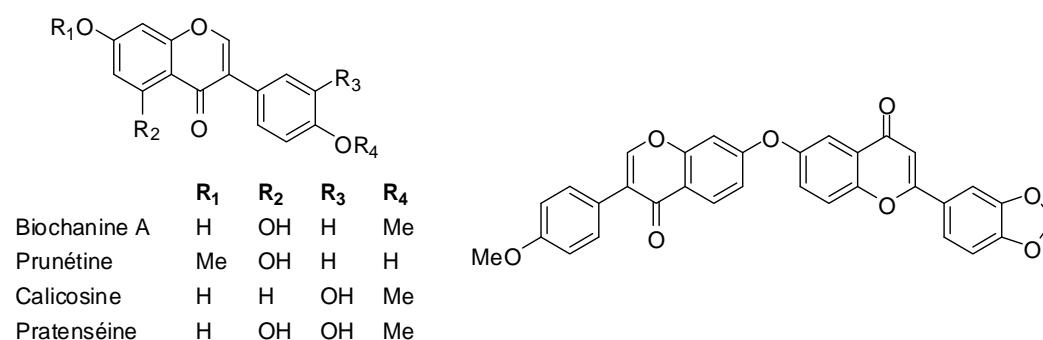


Figura 22 – Isoflavonas isoladas de *Andira surinamensis*.

A madeira de *Bocoa prouacensis* (Figura 23) é considerada uma "madeira preciosa", por razões estéticas e porque sua densidade é excepcionalmente elevada (cerca de 1,2) (Dettienne *et al.*, 1989). Além disso, é uma madeira altamente resistente à degradação de fungos e ao ataque de cupins. É surpreendente constatar que nenhum estudo sobre metabólitos secundários dessa madeira ou outro órgão desta espécie nunca tenha sido publicado. Nenhuma análise fitoquímica foi realizada sobre outra espécie deste gênero, o que abrange dez espécies no total.



Figura 23 – Bocoa prouacensis.

Dicorynia guianensis, cuja madeira é comercializada sob o nome de angelique na Guiana e angelico do Pará no Brasil, é uma das espécies mais exploradas na região amazônica guianense. Globalmente, a madeira de angelique é durável, mas tem sido demonstrado que existe uma certa variabilidade entre indivíduos (Amusant *et al.*, 2004). Os metabólitos secundários responsáveis pela durabilidade natural dessa madeira não foram estudados, e não há estudos de outros órgãos ou de outras espécies desse mesmo gênero.

Não existem estudos fitoquímicos publicados sobre a espécie *Diplotropis purpurea*. Entretanto, sobre o gênero *Diplotropis*, e sua espécie mais estudada, *D. ferruginea*, foi demonstrada a presença de diplotropine (Figura 24), um flavonóide furânico assim como a diploflavona (Lima *et al.*, 2005, Almeida *et al.*, 2005). Esta última substância mostrou citotoxicidade sobre células de carcinoma pulmonar, carcinoma da laringe, e células KB, enquanto a diplotropina é espasmolítica.

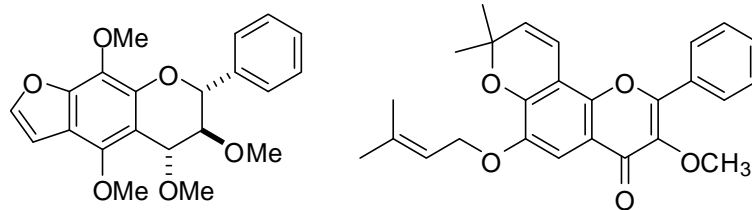


Figura 24 – Diplotropina (à esquerda) e diploflavona (à direita).

Dipteryx odorata é conhecida no Brasil sob o nome de cumaru e na França sob o nome de guaïac Cayenne. A umbelliferona (ou 7-hidroxycumarina) utilizada na indústria agroalimentar é uma das cumarinas isoladas a partir dos grãos desta espécie, que também contém um cassano diterpênico e isoflavonóides (Jang *et al.*, 2003; Sullivan, 1982). Quanto à madeira, muito durável, tem sido demonstrado que contém principalmente isoflavonóides (Figura 25) (Imai *et al.*, 2008). *Dipteryx odorata* é a espécie mais estudado desse gênero com cerca de 30 espécies da América tropical. As isoflavonas foram identificadas em outras espécies deste gênero (*Dipteryx alata*) (Magela V. Júnior *et al.*, 2008).

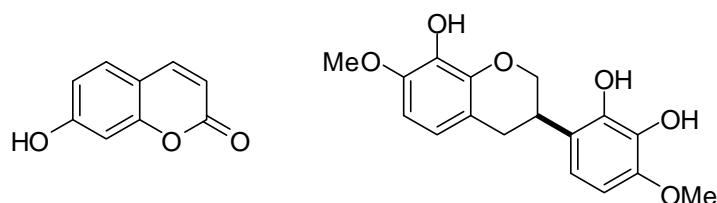


Figura 25 – Umbeliferona (cumarina, à esquerda), isolada dos grãos e o (+)-(3R)-8,2',3'-trihidroxi-7,4'-dimetoxiisoflavana (à direita), isolado da madeira de *Dipteryx odorata*.

Eperua falcata, conhecida como wapa em francês e apa em português, é a espécie arbórea mais abundante da floresta guianense (Detienne *et al.*, 1989). *Eperua* é um gênero relativamente grande contendo vinte espécies das quais apenas quatro estão presentes na Guiana Francesa, *E. grandiflora*, *E. rubiginosa*, *E. schomburgkiana* e *E. falcata*. A madeira dessa última espécie contém uma oleorresina muito rica, composta predominantemente de ácido (\pm)-eperúico (Figura 26), um ácido diterpênico lipofílico, e *E. grandiflora* contém compostos similares (Amusant *et al.*, 2007, Blake & Jones, 1963, King & Jones, 1955, Royer 2008, Royer *et al.*, 2010). Além disso, Royer (2008, 2010) isolou um grande número de flavonóides glicosilados ou não, e pôde constatar que nenhum desses componentes parecem possuir atividade fungicida. Ainda que o rendimento da extração total pode se aproximar de 15% em massa no cerne.

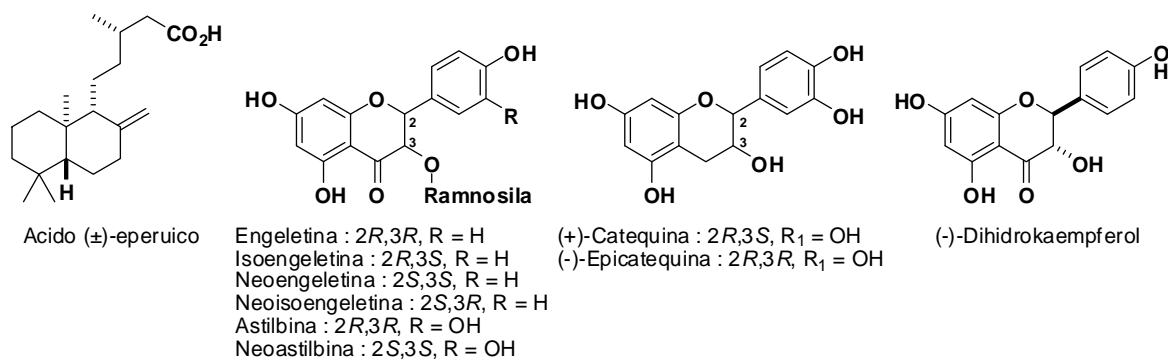


Figura 26 – Metabólitos secundários de *Eperua falcata*

Ormosia é um gênero com cerca de 130 espécies distribuídas principalmente na América tropical e na Ásia. Essa espécie é muitas vezes confundida com *Andira surinamensis* e *Andira coriacea* pela indústria madeireira sob a denominação de saint-martin rouge. Embora não haja estudos fitoquímicos da espécie *Ormosia flava*, o gênero *Ormosia* é conhecido por ser rico em alcalóides quinolizidínicos, como a ormosanine ou panamine (Figura 27), que estão presentes em outros 40 gêneros da família Fabaceae (Dembitsky, 2008, Michael, 2004, Ricker *et al.* 1994; Su *et al.*, 2004). As espécies deste gênero também contém isoflavonas, e tem sido demonstrado que estes compostos presentes em *Ormosia* podem possuir atividade antimicrobiana, antibacteriana e citotóxica.

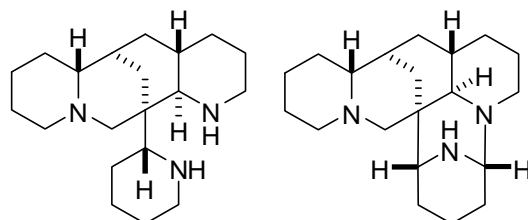


Figura 27 – Ormosanina (à esquerda) e panamina (à direita), dois alcalóides quinolizidínicos frequentemente encontrados no gênero *Ormosia*

A madeira de *Peltogyne* sp. é conhecida sob o nome de roxinho no Brasil, e amarante na França. Ela é bege-marrom no momento do abate, mas torna-se rapidamente violeta, quando exposta à luz. Na madeira, os metabólitos secundários majoritários são duas leucoantocianidinas, o (+) peltoginol e (+) mopanol (Figura 28) (Chan *et al.*, 1958, Malan & Roux, 1974). A madeira desta espécie tem uma alta durabilidade natural (De Jesus *et al.*, 1998), e foi observado que o extrato acetato de etila dessa madeira possui atividade antibacteriana (Granato *et al.*, 2005).

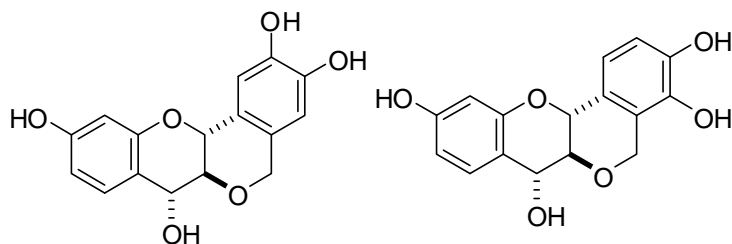


Figura 28 – (+)-peltoginol (à esquerda) e (+)-mopanól (ao centro), isolados de *Peltogyne* sp. (à direita)

Vouacapoua americana é uma espécie rara na Amazônia, mas bastante abundante no platô da Guiana. No entanto, a excepcional qualidade de sua madeira (alta densidade, alta durabilidade natural e estética) são argumentos para a alta pressão de exploração desta espécie, mesmo que sua distribuição seja limitada.

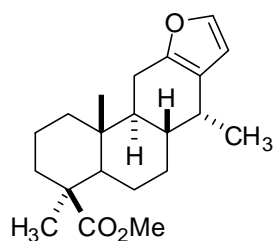


Figura 29 – Metil vouacapenato (à esquerda), isolado a partir da madeira de *V. americana* (à direita)

A partir da madeira desta espécie, Kido *et al.* isolaram diterpenóides furânicos da família dos cassanos como o vouacapenato de metila (Figura 29). Posteriormente, foi demonstrado que estes compostos possuem atividade antibacteriana e antioxidante (Dickson *et al.*, 2007).

V.2.5 Espécies da família Lauraceae

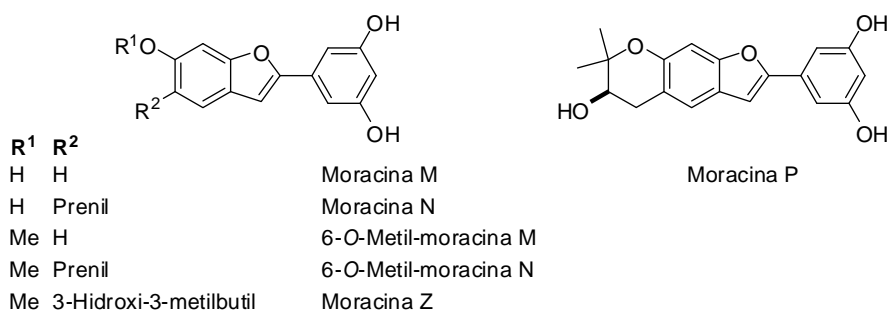
O gênero *Sextonia* foi criado em 1997 para reclassificar duas espécies anteriormente consideradas como *Ocotea*: *Sextonia rubra* e *Sextonia pubescens* (van der Werff, 1997). *S. rubra* é bastante comum no norte da Amazônia, da Venezuela até o Amapá, enquanto *S. pubescens* é uma espécie rara na Amazônia peruana. *S. rubra* fornece uma madeira resistente à degradação por fungos e resistente ao ataque de cupins, comercializado sob o

nome de grignon franc na Guiana Francesa, e louro gamela no Brasil. É, em volume, a terceira espécie mais explorada na Guiana Francesa (Detienne *et al.*, 1989). No início deste trabalho, aparentemente não existiam estudos sobre a composição química das duas espécies de *Sextonia*. Entretanto, a identificação e caracterização de metabólitos da madeira de louro gamela nos permitiu verificar posteriormente um estudo de Franca *et al.* de 1977, quando a *S. rubra* era estudada sob o nome de *Nectandra rubra*.

V.2.6 Espécies da família Moraceae

A família Moraceae, da qual faz parte a figueira, contém algumas espécies formadoras de madeira de grande durabilidade natural. Um exemplo é a *Maclura pomifera* (laranjeira-de-osage ou pau d'arco), muito rica em dihidromorina (um flavanol) e oxiresveratrol (um estilbeno) (Schultz *et al.*, 1995). *Bagassa guianensis*, a única espécie do gênero *Bagassa*, também produz uma madeira extremamente durável, conhecida como tatajuba em português, e é resistente à degradação por fungos e insetos xilófagos (Scheffer e Morrell, 1998). Conforme descrito na página 41, o extrato da madeira de tatajuba pode ser impregnado em outras madeiras a fim de lhes proteger contra cupins. A composição dos extratos de tatajuba foi estudada por Royer (2008) que pôde demonstrar que esta espécie é muito rica em moracinas e estilbenóides (Figura 30), cujas atividades antifúngicas e termiticidas não foram estudadas.

Moracinas



Estilbenoides

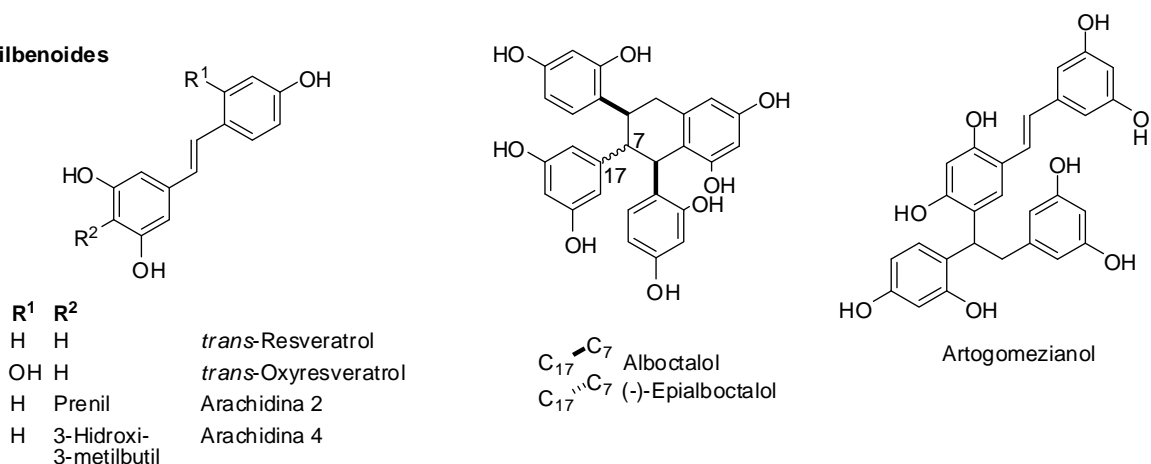


Figura 30 – Moracinas e estilbenóides isolados da madeira de tatajuba (*B. guianensis*)

V.2.7 Espécie da família Sapotaceae

Espécies do gênero *Manilkara* assim como outras Sapotaceae produzem látex abundante e tem uma madeira de cor avermelhada (Mabberley, 1997). O gênero *Manilkara* abrange um grande número de espécies nas regiões mais quentes da América, Ásia, África e Oceania. A madeira de *M. huberi* e *M. bidentata* é explorada na Guiana, sob o nome comum de balata franco. O nome dessa madeira em português é maçaranduba. Ambas as espécies produzem uma madeira extremamente durável, resistente à degradação por cupins e fungos apodrecedores da madeira. Entretanto, nenhuma destas duas espécies foi estudada para a caracterização de metabólitos secundários. O gênero *Manilkara* é muito pouco estudado. Haraguchi *et al.* (2003) isolaram uma série de flavonas C-glicosiladas de *M. indica*, dentre elas a isoaffinetina, que é um inibidor *in vitro* da reductase aldólica. Nos frutos comestíveis de outra espécie (*M. zapota*), Ma *et al.* (2003) isolaram o clorogenato de metila e alguns derivados, juntamente com oito flavonóides conhecidos, dentre eles, a dihidromicetina (Figura 31).

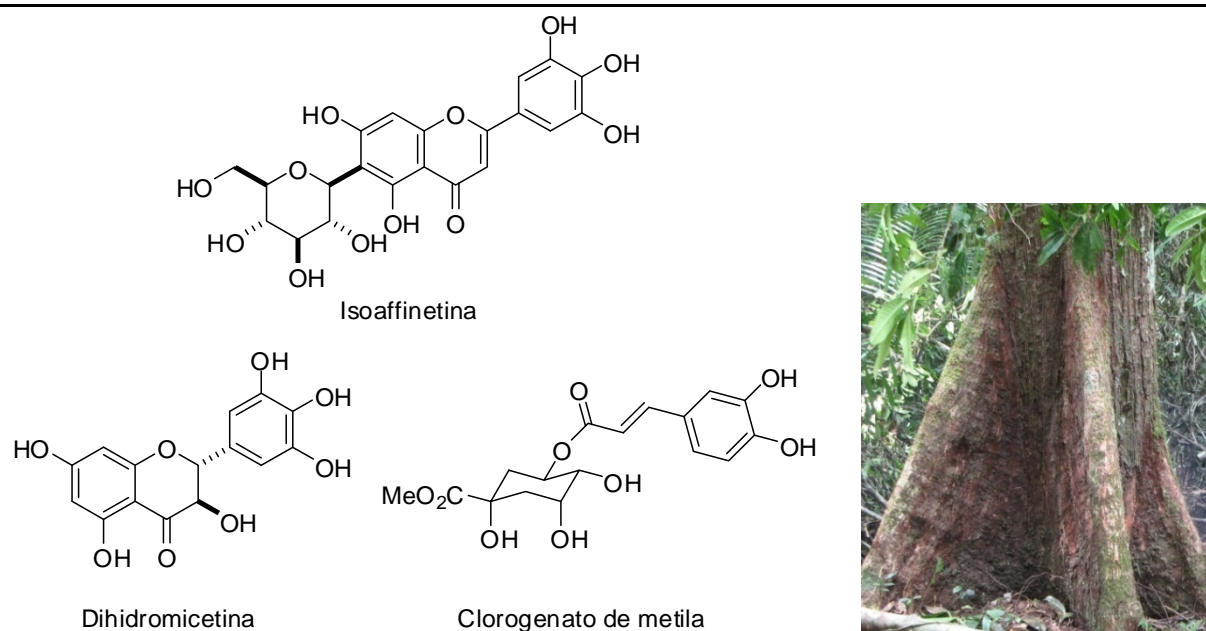


Figura 31 – Compostos isolados de espécies do gênero *Manilkara* (à esquerda) e *Manilkara huberi* (à direita).

V.2.8 Espécies da família Tiliaceae

Apeiba petoumo é conhecida na Guiana Francesa como o pente-de-macaco (peigne macaque em francês). Ela foi citada durante as coletas realizadas neste trabalho como uma espécie que possui a capacidade de repelir cupins em abrigos construídos na floresta. Essa madeira não é explorada comercialmente. Nenhuma análise fitoquímica dessa espécie foi publicada até o momento. Assim como, nenhuma outra espécie do gênero *Apeiba* representada por cerca de vinte espécies da América tropical, não foram estudadas quanto à sua fitoquímica.

V.2.9 Espécies da família Vochysiaceae

Qualea rosea é a segunda espécie mais explorada na Guiana Francesa depois de *Dicorynia guianensis* (Detienne *et al.*, 1989). A madeira é comercializada sob o nome mandioqueira rosa em português – e gonfolo rose em francês - e é usada principalmente em estruturas de edifícios. É moderadamente resistente quanto à degradação fúngica, e é suscetível ao ataque de cupins. Os metabólitos secundários desta espécie não foram descritos na literatura. Do gênero *Qualea*, as espécies mais estudadas são *Q. parviflora* e *Q. grandiflora*, a partir das quais foram isolados principalmente triterpenos - esqualeno, fitol, lupeol, α - e β -amirina, sitosterol, ácido ursólico, etc (Nasser *et al.*, 2006, Ayres *et al.*, 2008). Além disso, foi mostrado que o extrato bruto da casca de *Q. grandiflora* é ligeiramente ativo

sobre várias cepas de fungos patogênicos ao homem (Costa *et al.*, 2008) e a casca *Q. paraensis*, avaliada por Muñoz *et al.* (2000), não mostrou atividade antimalárica interessante.

Capítulo 2

Avaliação biológica dos extratos

I Introdução

As espécies selecionadas para este estudo são conhecidas na Guiana Francesa por sua durabilidade natural. Dezesesseis espécies entre as dezenove que foram coletadas já haviam sido avaliadas previamente por sua resistência ao ataque de vários organismos degradadores da lignocelulose, ou seja, fungos formadores de podridão da madeira, insetos e brocas marinhas (<http://tropix.cirad.com> – ver anexo 1, página 233).

Sabe-se que a durabilidade natural ou a resistência à biodegradação das madeiras pode ser explicada pela presença de compostos bioativos, que podem ser extraídos do tecido lignocelulósico. Esses compostos podem ter propriedades tóxicas, inibindo, assim, o crescimento, agindo como repulsivos, frente aos agentes biológicos de deterioração. O primeiro objetivo deste estudo foi avaliar o potencial de utilização de extratos obtidos de espécies amazônicas capazes de produzir madeira naturalmente durável para a proteção das madeiras não resistentes a fatores de risco (fungos de podridão ou cupins).

Esta primeira parte do trabalho foi dividida em três fases:

1. Coleta e identificação botânica;

2. Extrações com solventes de polaridade crescente das diferentes partes das plantas coletadas;

3. Ensaios biológicos: avaliação dos extratos sobre duas cepas de fungos apodrecedores de madeira e uma espécie de cupim.

II Extração

A partir da coleta realizada em 2007, 140 extratos foram obtidos por maceração das diversas partes das plantas, sucessivamente com acetato de etila e metanol. Os rendimentos de extração das folhas, da casca e da madeira do caule são apresentados nas tabelas 2, 3 e 4.

Tabela 2 – Rendimento obtido pela extração das folhas.

Espécies	Rendimento (%) ^a		Taxa de extração total (%) ^b	Proporção relativa MeOH/AcOEt ^c
	Acetato de etila	Metanol		
<i>Apeiba petoumo</i> Aubl.	6,04	5,64	11,68	0,9
<i>Bagassa guianensis</i> Aubl.	5,19	11,24	16,43	2,2
<i>Bocoa prouacensis</i> Aubl.	5,67	3,76	9,43	0,7
<i>Dicorynia guianensis</i> Amsh.	1,11	5	6,11	4,5
<i>Diospyros dichroa</i> Sandw.	2,99	2,68	5,67	0,9
<i>Diploptropis purpurea</i> (Rich.) Amsh.	5,68	13,28	18,96	2,3
<i>Dipteryx odorata</i> (Aublet) Wild.	4,64	4,61	9,25	1,0
<i>Eperua falcata</i> Aubl.	2,78	5,99	8,77	2,2
<i>Goupia glabra</i> Aubl.	4,85	8,5	13,35	1,8
<i>Hymenolobium flavum</i> Kleinh.	4,33	10,28	14,61	2,4
<i>Manilkara paraensis</i> (Huber) Standl.	9,36	17,91	27,27	1,9
<i>Ormosia flava</i> (Ducke) Rudd.	0,97	4,96	5,93	5,1
<i>Peltogyne</i> sp.	5,84	8,97	14,81	1,5
<i>Qualea rosea</i> Aubl.	1,68	3,76	5,44	2,2
<i>Sextonia rubra</i> (Mez) van der Werff	5,37	10,93	16,3	2,0
<i>Tabebuia serratifolia</i> (Vahl) Nichols.	1,61	4,88	6,49	3,0
<i>Vouacapoua americana</i> Aubl.	5,12	4,59	9,71	0,9
MÉDIAS :	4,31±2,20	7,47±4,12	11,78	

^a Os rendimentos de extração marcados em negrito estão localizados acima do terceiro quartil da taxa de extração com o solvente considerado (AcOEt: $\geq 5,67$, MeOH: $\geq 10,28$; total: $\geq 14,81$).

^b Taxa de extração com acetato de etila + taxa de extração com metanol.

^c Taxa de extração de metanol / taxa de extração com acetato de etila.

Os melhores rendimentos de extração (entre 8,5 e 17,9%) foram obtidos através da extração metanólica das folhas das seguintes espécies: *B. guianensis*, *D. purpurea*, *G. glabra*,

H. flavum, *M. paraensis*, *Peltogyne* sp. e *S. rubra*. Além disso, a extração das folhas de *M. paraensis* em acetato de etila também obteve um alto rendimento em extrato bruto. Para este último, a taxa de extração total (acetato de etila + metanol) obteve um valor notável de 27% em massa. Para as outras espécies, as taxas de extração total foram cerca de 10%. Segundo uma análise dessa tabela, aparentemente para as espécies que tinham um rendimento de extração com acetato de etila acima da média apresentaram igualmente um grande rendimento de extração metanólica.

Em média, apesar de terem sido feitas extrações sucessivas, as extrações metanólicas apresentaram rendimentos superiores às extrações com acetato de etila. As três principais exceções são: *V. americana*, *A. petoumo* e *B. prouacensis*. Sabe-se que o primeiro é rico em cassanos lipofílicos, também presentes nas folhas (ver capítulo 1, V.2.4 espécies da família *Fabaceae*, página 59); é possível postular que os compostos lipofílicos possam contribuir significativamente para a defesa das outras duas espécies. Em contrapartida, observamos que algumas espécies, como *O. flava* e *D. guianensis*, têm uma proporção muito elevada de compostos polares nas folhas.

Quanto aos resultados obtidos com as cascas do caule, os melhores rendimentos foram observados para as extrações com o acetato de etila de *B. guianensis* (14,22%), *E. falcata* (6,6%), *G. glabra* (7,9%), o *M. paraensis* (7,3%) e *V. americana* (13,14%), e para os extratos metanólicos de *E. falcata* (8,51%), o *M. paraensis* (11,26%), *Q. rosea* (6,5%) e *V. americana* (7,8%) (Tabela 3).

Ao contrário da extração das folhas, a proporção relativa de compostos extraídos com acetato de etila e metanol é equivalente nas extrações das cascas do caule. Além disso, as taxas de extração total são inferiores às obtidas pela extração das folhas, assim como para a extração da madeira do caule. As diferenças estão principalmente relacionadas à presença ou não de compostos apolares em quantidades maiores (maior desvio padrão para a extração com acetato de etila). Entretanto, isso é observado em algumas espécies de comportamentos atípicos, em particular a extração da casca do caule de *B. guianensis* com acetato de etila que apresentou um rendimento de 14%. Essa espécie pertence à família *Moraceae* produz um látex branco abundante, aparentemente constituído por compostos

lipofílicos. *V. americana* também se comporta da mesma maneira, com suas folhas, sua casca e sua madeira do caule parecendo conter uma proporção importante de cassanos lipofílicos já descritos na literatura. O extrato total de *A. surinamensis* é altamente apolar em termos de proporção, mas o rendimento da extração dessa espécie é relativamente baixo.

Em contraste, as cascas de outras espécies são ricas em compostos polares solúveis em metanol. Isso se aplica, por exemplo, às cascas de *M. paraensis*, *Q. rosea* ou *B. prouacensis*. Nesta última espécie, o comportamento da casca do caule é oposto ao das folhas.

Tabela 3 – Rendimentos obtidos pela extração das cascas do caule.

Espécies	Rendimento (%) ^a		Taxa de extração total (%) ^b	Proporção relativa MeOH/AcOEt ^c
	Acetato de etila	Metanol		
<i>Andira surinamensis</i> (Bondt) Splitg. ex Pulle	3,87	1,32	5,19	0,3
<i>Apeiba petoumo</i> Aubl.	1,97	1,25	3,22	0,6
<i>Bagassa guianensis</i> Aubl.	14,22	2,78	17	0,2
<i>Bocoa prouacensis</i> Aubl.	0,31	3,41	3,72	11,0
<i>Dicorynia guianensis</i> Amsh.	0,76	3,75	4,51	4,9
<i>Diospyros dichroa</i> Sandw.	0,31	2,33	2,64	7,5
<i>Diplostropis purpurea</i> (Rich.) Amsh.	2,73	3,67	6,4	1,3
<i>Dipteryx odorata</i> (Aublet) Wild.	2,36	4,54	6,9	1,9
<i>Eperua falcata</i> Aubl.	6,63	8,51	15,14	1,3
<i>Goupia glabra</i> Aubl.	7,92	4,85	12,77	0,6
<i>Hymenolobium flavum</i> Kleinh.	3,19	5,18	8,37	1,6
<i>Manilkara paraensis</i> (Huber) Standl.	7,33	11,26	18,59	1,5
<i>Ormosia flava</i> (Ducke) Rudd.	0,82	2,5	3,32	3,0
<i>Peltogyne</i> sp.	3,79	4,47	8,26	1,2
<i>Qualea rosea</i> Aubl.	0,46	6,51	6,97	14,2
<i>Sextonia rubra</i> (Mez) van der Werff	2,31	3,26	5,57	1,4
<i>Tabebuia serratifolia</i> (Vahl) Nichols.	0,87	5,54	6,41	6,4
<i>Vouacapoua americana</i> Aubl.	13,14	7,85	20,99	0,6
MÉDIAS:	4,06±4,23	4,61±2,60	8,67	

^a Os rendimentos de extração marcados em negrito estão localizados acima do terceiro quartil da taxa de extração com o solvente considerado (AcOEt : ≥ 5,94 ; MeOH: ≥ 5,45 ; total : ≥ 11,67).

^b Taxa de extração com acetato de etila + taxa de extração com metanol.

^c Taxa de extração de metanol / taxa de extração com acetato de etila.

Durante o processo de secagem, na medida do possível, as madeiras do caule foram separadas em alborno e cerne, separando ao máximo os cernes interno e externo. Os

resultados de extração (Tabela 4) mostram que os rendimentos de extração das madeiras são geralmente mais baixos do que aqueles obtidos para as cascas do caule e folhas. As extrações em que foram obtidos os melhores rendimentos são aquelas realizadas com acetato de etila do alburno + cerne exterior de *D. odorata* (6,1%), de madeira de *E. falcata* (6,0%), do alburno + cerne externo de *G. glabra* (6,3%), *T. serratifolia* (10,4%) e do alburno + cernes interno e externo de *V. americana* (6,1; 7,4 e 8,7% respectivamente) e *O. flava* (3,4; 9,9 e 12,1%).

Proporcionalmente, o extrato mais apolar é proveniente do cerne interno de *S. rubra*, ao passo que outros extratos, como os obtidos do cerne interno de *B. guianensis* ou dos cernes de *Q. rosea*, são muito polares

Em conclusão, convém notar que os mecanismos de defesa das plantas parecem relativamente diversificados, qualitativa e quantitativamente. Os rendimentos de extração obtidos a partir das folhas são maiores que aqueles provenientes da casca e da madeira do caule, sugerindo que as folhas parecem ser os órgãos mais vulneráveis e mais expostos, precisando ser mais protegidos (McKey, 1974). No entanto, é provável que essa proteção suplementar seja dirigida principalmente ao combate dos insetos herbívoros, que são os animais que causam os maiores danos às folhas. Em particular, tem-se demonstrado na literatura que os taninos induzem a precipitação de proteínas, tornando as folhas menos atrativas aos insetos (Bryant *et al.*, 1983, Iaconelli & Simmen, 2002; Rasman & Agrawal, 2009). Assim, a maior proporção de compostos polares nas folhas poderia resultar principalmente da necessidade em se reduzir o seu consumo por herbívoros.

Tabela 4 – Rendimentos obtidos pela extração das madeiras do caule.

Espécies	Parte da madeira ^a	Rendimento (%) ^b		Taxa de extração total (%) ^b	Proporção relativa MeOH/AcOEt ^c
		Acetato de etila	Metanol		
<i>Andira surinamensis</i> (Bondt) Splitg. ex Pulle	M	5,07	5,44	10,51	1,1
	A	1,73	2,22	3,95	1,3
<i>Apeiba petoumo</i> Aubl.	Ci	1,3	2,51	3,81	1,9
	Ce	1,62	2,25	3,87	1,4
<i>Bagassa guianensis</i> Aubl.	A+Ce	1,47	3,48	4,95	2,4
	Ci	1,11	6,19	7,3	5,6
<i>Bocoa prouacensis</i> Aubl.	M	0,46	1,19	1,65	2,6
	A	0,61	1,64	2,25	2,7
<i>Dicorynia guianensis</i> Amsh.	Ce	0,91	3,16	4,07	3,5
	Ci	0,25	1,06	1,31	4,2
<i>Diospyros dichroa</i> Sandw.	M	0,51	0,48	0,99	0,9
<i>Diploptropis purpurea</i> (Rich.) Amsh.	M	3,46	2,37	5,83	0,7
<i>Dipteryx odorata</i> (Aublet) Wild	A+Ce	6,15	3,28	9,43	0,5
	Ci	5,9	5,51	11,41	0,9
<i>Eperua falcata</i> Aubl.	M	6,02	3,17	9,19	0,5
<i>Goupia glabra</i> Aubl.	A+Ce	6,26	4,27	10,53	0,7
	Ci	1,67	2,42	4,09	1,4
<i>Hymenolobium flavum</i> Kleinh.	A+Ce	2,1	1,58	3,68	0,8
	Ci	4,76	4,17	8,93	0,9
<i>Manilkara paraensis</i> (Huber) Standl.	A	1,41	2,96	4,37	2,1
	Ce+Ci	1,33	3,99	5,32	3,0
<i>Ormosia flava</i> (Ducke) Rudd.	A	3,36	2,74	6,1	0,8
	Ci	9,87	8,53	18,4	0,9
	Ce	12,11	5,82	17,93	0,5
<i>Peltogyne</i> sp.	A+Ce	1,71	3,56	5,27	2,1
	Ci	3,41	4,45	7,86	1,3
<i>Qualea rosea</i> Aubl.	A+Ce	0,46	0,61	1,07	1,3
	Ci	0,24	0,86	1,1	3,6
	Ce	0,24	1,02	1,26	4,3
<i>Sextonia rubra</i> (Mez) van der Werff	A+Ce	4,18	1,45	5,63	0,3
	Ci	2,87	0,35	3,22	0,1
<i>Tabebuia serratifolia</i> (Vahl) Nichols.	M	10,42	5,16	15,58	0,5
	A	6,14	1,31	7,45	0,2
<i>Vouacapoua americana</i> Aubl.	Ci	7,43	4,16	11,59	0,6
	Ce	8,67	6,63	15,3	0,8
MÉDIAS :		3,58±3,24	3,14±1,97	6,72	

^a M = madeira (alburno + cerne), A = alburno, Ci = cerne interno, Ce = cerne externo.

^b Os rendimentos de extração marcados em negrito estão localizados acima do terceiro quartil da taxa de extração com o solvente considerado (AcOEt : $\geq 5,96$; MeOH: $\geq 4,22$; total : $\geq 9,31$).

^c Taxa de extração com acetato de etila + taxa de extração com metanol.

^d Taxa de extração de metanol / taxa de extração com acetato de etila.

III Teste de perfuração em ágar

A fim de avaliar a atividade antifúngica, os extratos brutos obtidos com acetato de etila e metanol foram testados pelo método de perfuração em ágar (figura 32). Esse teste consiste em colocar em contato o extrato depositado em uma cavidade perfurada no meio de cultura sólido com o fungo inoculado sobre a superfície do meio. Para os extratos ativos, é possível observar um halo de inibição do crescimento fúngico cujo diâmetro depende da atividade do extrato, da espessura do meio e da capacidade de difusão dos constituintes ativos no meio ágar. Assim, é possível obter uma avaliação qualitativa da atividade antifúngica dos extratos brutos. Esse teste é adequado para a detecção rápida da atividade dos extratos, que em seguida serão submetidos a um teste que visa medir a concentração inibitória por um método quantitativo.

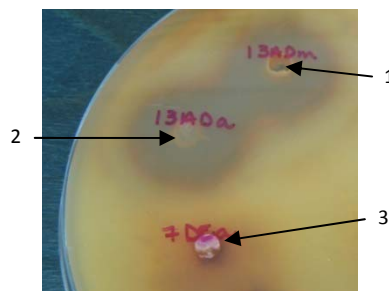


Figura 32 – Cavidades contendo os extratos metanólico (1) e acetato de etila (2) de *B. guianensis* e o extrato acetato de etila de *Q. rosea* (3). Notar os halos de inibição do crescimento fúngico de *G. trabeum* em torno das cavidades (1) e (2).

Como resultado, um total de 32,8% dos extratos foram ativos em *Pycnoporus sanguineus* (podridão branca) e 25% em *Gloeophyllum trabeum* (podridão parda). Na tabela 5, somente os extratos ativos foram mencionados. Em uma primeira análise, é possível observar que os 24 extratos obtidos por extração com acetato de etila foram ativos em *P. sanguineus*, enquanto apenas 11 mostraram inibição do crescimento em *G. trabeum*, o que demonstra que *P. sanguineus* foi mais sensível que *G. trabeum* nesse teste.

Além disso, apenas quatro das 17 espécies (23%) (*D. purpurea*, *Peltogyne* sp., *Q. rosea* e *V. americana*) apresentaram atividade antifúngica dentre os extratos de folhas. Se

compararmos esse valor com a proporção de extratos ativos, apresentada pelos extratos de casca (14/36) e de madeira (27/68), é possível corroborar a hipótese já mencionada de que as folhas resistem prioritariamente contra o ataque de herbívoros. A sua curta duração de vida assim como sua posição – pelo menos para as espécies deste estudo – não exigem o investimento na biossíntese de compostos de defesa contra o ataque fúngico. Essa hipótese está de acordo com a teoria da defesa optimal de McKey (1974). Em contrapartida, uma vez que a degradação da madeira e da casca parecem mais difíceis devido tanto à dureza desses órgãos, quanto à inacessibilidade física, (e podemos constatar pelos resultados apresentados posteriormente), esses órgãos devem suportar condições ambientais adversas, logo, são mais bem protegidos contra a degradação por fungos.

Todas as espécies testadas, com exceção de *E. falcata* e *A. petoumo*, apresentaram pelo menos um extrato ativo em um dos dois fungos testados. *A. petoumo* é uma espécie que foi coletada a partir de informações de utilização local da madeira, indicando uma resistência ao ataque de cupins. Esta espécie, porém, não é conhecida pela produção de madeira resistente frente à degradação fúngica. Logo, não é surpreendente o fato de que os extratos produzidos a partir de *A. petoumo* não sejam ativos em fungos. Já *E. falcata* é uma espécie conhecida por produzir uma madeira extremamente durável (Amusant *et al.*, 2007). Contudo, os compostos responsáveis pela atividade antifúngica dessa espécie provavelmente não foram extraídos, ou porque são insolúveis no solvente utilizado, ou porque estão covalentemente ligados à matriz lignocelulósica.

Finalmente, as outras 17 espécies selecionadas para este estudo apresentaram pelo menos um extrato ativo. Os extratos que mostraram atividade em pelo menos uma das duas cepas foram selecionados para a continuidade do estudo. Esse resultado confirma que a durabilidade natural dessas espécies, demonstrada anteriormente por outros estudos, está relacionada à presença de compostos antifúngicos contidos na madeira e na casca e que poderiam ser utilizados como princípios ativos para o tratamento de preservação de madeiras não duráveis.

Tabela 5 – Medida das zonas de inibição médias do crescimento fúngico (em mm) frente à *P. sanguineus* e *G. trabeum*.

Espécie	Órgão ^a	Zonas de inibição (mm) do crescimento de :			
		<i>P. sanguineus</i>		<i>G. trabeum</i>	
		AcOEt	MeOH	AcOEt	MeOH
<i>Andira surinamensis</i>	C	16	9	0	0
	B	13	15	0	0
<i>Bagassa guianensis</i>	C	15	25	0	0
	A+Ce	43	36	40	39
	Ci	25	34	35	34
<i>Bocoa prouacensis</i>	C	16	0	0	0
<i>Dicorynia guianensis</i>	C	35	0	0	0
<i>Diospyros dichroa</i>	M	0	0	18	0
<i>Diploptropis purpurea</i>	F	19	0	0	0
	M	20	0	18	0
<i>Dipteryx odorata</i>	C	18	0	0	0
	A+Ce	19	16	15	0
	Ci	17	17	0	0
<i>Goupia glabra</i>	C	0	15	0	0
<i>Hymenolobium flavum</i>	A+Ce	23	16	15	0
	Ci	24	0	0	0
<i>Manilkara paraensis</i>	A	0	0	0	17
	Ce+Ci	25	0	0	17
<i>Ormosia flava</i>	C	0	0	14	17
	A	15	0	10	14
<i>Peltogyne</i> sp.	F	16	0	0	0
	C	31	0	13	0
	A+Ce	45	0	0	0
<i>Qualea rosea</i>	F	0	0	15	22
	C	0	0	0	24
	A+Ce	16	0	0	0
<i>Sextonia rubra</i>	C	15	0	0	0
	A+Ce	23	0	17	0
	Ci	18	14	0	0
<i>Tabebuia serratifolia</i>	M	0	0	33	45
<i>Vouacapoua americana</i>	F	28	0	0	0
	C	0	0	0	11
	Ci	0	20	0	12
	Ce	0	0	0	13

^a C = casca do caule, M = madeira ou alburno+cerne, F = folha, A = alburno, Ci = cerne interno, Ce = cerne externo.

IV Índices de atividade antifúngica

As medidas dos índices de atividade antifúngica (IA) dos extratos selecionados a partir dos resultados obtidos do teste de perfuração em ágar, foram realizados comparando-se o crescimento radial dos micélios de *Pycnoporus sanguineus* e *Gloeophyllum trabeum* em meio de cultura tratado com os extratos, e o crescimento dos micélios em meio de cultura não tratado (figura 33). Os resultados são mostrados na figura 34.



Figura 33 – Placa de Petri teste contendo o extrato acetato de etila da madeira de *S. rubra* na concentração de $250 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (à esquerda) e o controle negativo (à direita).

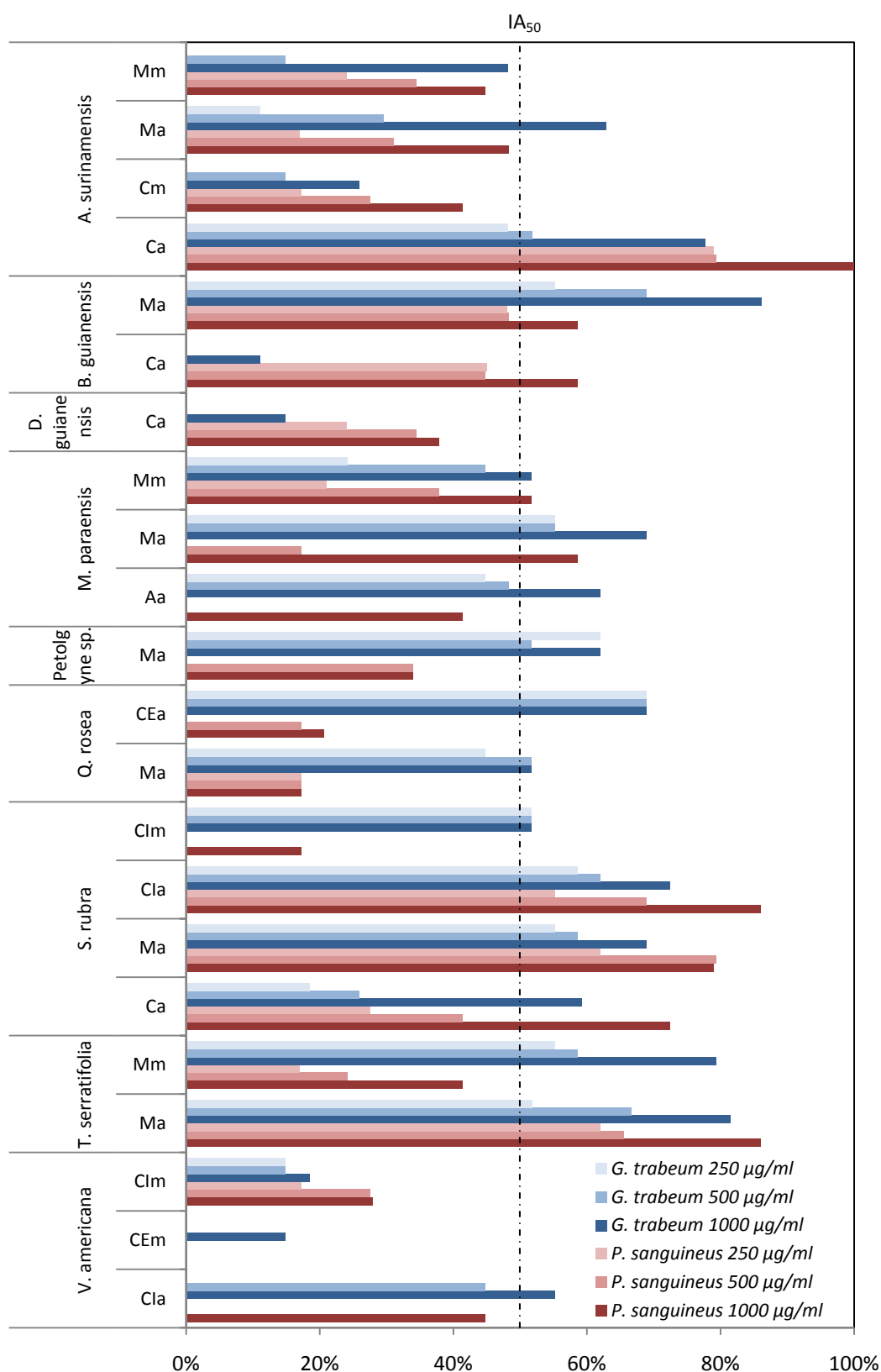


Figura 34 – Índices de atividade antifúngica (IA) medidos em *G. trabeum* (em azul) e em *P. sanguineus* (em vermelho) nas concentrações de 1000, 500 e 250 µg.ml⁻¹ dos extratos. C = casca do caule, M = madeira do caule (alburno+cerne), A = alburno, CE = cerne externo, CI = cerne interno, a = acetato de etila e m = metanol.

De maneira global, os índices de atividade antifúngica são bastante semelhantes para as duas cepas de fungos lignívoros testadas, embora os valores sejam ligeiramente superiores para *G. trabeum* sugerindo que este fungo não seja sensível apenas ao teste qualitativo de perfuração em ágar. Nove dos vinte extratos apresentaram um índice antifúngico superior a 50% quando testados a uma concentração de 250 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ em *G. trabeum*. Os extratos que mostraram forte inibição nas as duas cepas testadas ao mesmo tempo foram: o extrato acetato de etila da madeira de *T. serratifolia* e *S. rubra*, e o da casca de *A. surinamensis*. Esses extratos apresentaram entre 62 e 79% de inibição em *P. sanguineus* e entre 42 e 55% de inibição em *G. trabeum* a uma concentração de 250 $\text{mg}.\text{ml}^{-1}$.

Considerando que o rendimento médio de extração da madeira das espécies selecionadas é cerca de 3% (com a utilização dos dois solventes, sucessivamente) e a densidade da madeira no estado verde (umidade > ponto de saturação da fibra) deve ser aproximadamente igual a 1 $\text{g}.\text{cm}^{-3}$, em média, a concentração dos compostos extraídos da madeira é em torno de 30 $\text{mg}.\text{cm}^{-3}$, o que é 30 vezes superior à concentração máxima desse teste. Dessa forma, é provável que mesmo um extrato que tenha tido um valor de IA_{50} superior a 1 $\text{mg}.\text{ml}^{-1}$, mas com algum grau de inibição de crescimento de *P. sanguineus* ou *G. trabeum*, possa conter metabólitos secundários relacionados à durabilidade natural de sua madeira. Por essa razão, é razoável considerarmos tanto a atividade biológica quanto o grau de exploração de uma espécie (ou seja, a quantidade de remanescentes produzidos a partir da exploração comercial de determinada madeira) para analisarmos a tabela com os valores de atividade biológica. De fato, nosso objetivo é identificar os extratos ao mesmo tempo ativos como antifúngicos e facilmente obtidos pela recuperação de remanescentes da exploração florestal.

As três espécies mais exploradas são *Q. rosea*, *D. guianensis* e *S. rubra*. Para a primeira espécie, embora os rendimentos de extração sejam baixos, as atividades biológicas observadas são interessantes. Para a segunda, somente a casca parece ter atividade antifúngica significativa, pelo menos, nestas concentrações, apesar de que, o valor de IA_{50} do extrato da casca permanece superior a 1 $\text{mg}.\text{ml}^{-1}$ sobre as duas espécies de fungos testadas. Quanto aos extratos acetato de etila da madeira de *S. rubra*, observa-se que há uma

atividade antifúngica notável, além de o rendimento da extração ser relativamente alto (em torno de 4%). Esta é uma espécie muito explorada.

Dentre as outras espécies testadas, a única que mostra índices de atividade realmente baixos é *V. americana*. As atividades biológicas medidas para os extratos de *A. surinamensis*, *B. guianensis* e *T. serratifolia* são excelentes. No caso desta última espécie, os dois tipos de extrato testados (acetato de etila e metanol) são muito ativos, com valores de IA_{50} inferiores a $250 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para três das quatro medidas efetuadas, além do rendimento de extração ser excepcionalmente elevado (15%). Vale notar que essa espécie é bastante explorada na Amazônia, sendo que sua madeira é exportada para vários países na Europa e América do Norte. Considerando ainda sua atividade antifúngica, o extrato total de *T. serratifolia* pode ser interessante para futuros estudos, juntamente com as espécies mais exploradas da Guiana Francesa.

V Atividades termiticidas – teste de escolha direta

A atividade termiticida dos extratos foi medida pelo método de contato direto dos cupins *Nasutitermes macrocephalus* (Nasutitermitinae) com discos de papel de filtro impregnados com as concentrações de 1,9 ; 5,6 e 9,3 $\mu\text{g}\cdot\text{mm}^{-2}$ de extrato (figura 35). A mortalidade média acumulada observada após 72 horas de contato direto dos cupins operários com os discos impregnados é mostrada na figura 36.



Figura 35 – Disco de celulose tratado com o extrato acetato de etila do cerne interno de *O. flava*, após 72 horas de contato direto com os operários da espécie *Nasutitermes macrocephalus*.

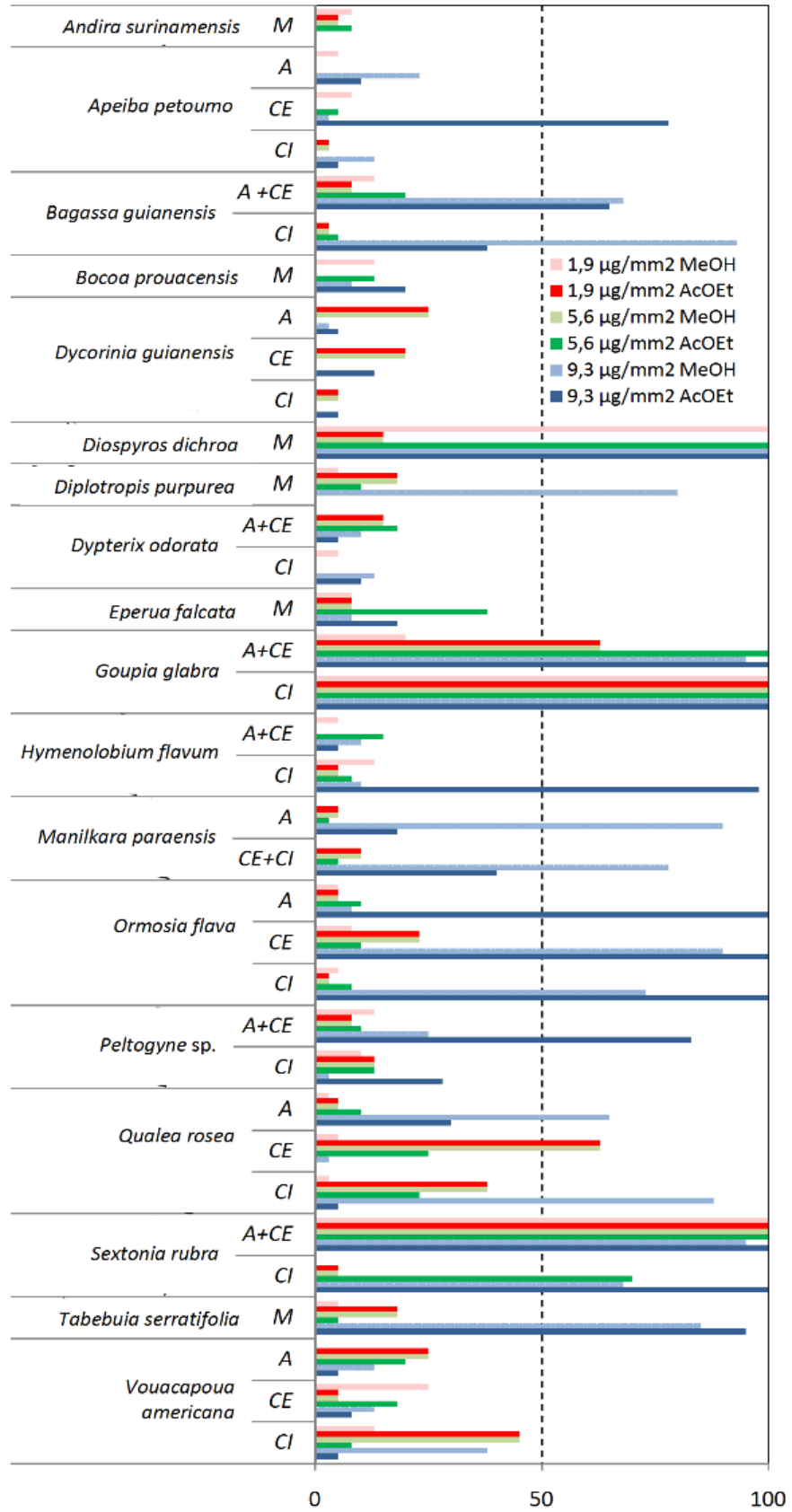


Figura 36 – Mortalidades acumuladas observadas para cada extrato nas concentrações de 9,3 (azul), 5,6 (verde) e 1,9 (vermelho) $\mu\text{g}\cdot\text{mm}^{-2}$. M = madeira do caule (alburno+cerne), A = alburno, CE = cerne externo, CI = cerne interno.

Por meio de análise estatística (Kruskal-Wallis) de todos os dados de mortalidade foi possível demonstrar que o valor de P foi inferior a 0,0001, o que indica que a um valor de $\alpha = 0,05$, as medianas variaram significativamente. Dessa forma, a hipótese nula pode ser rejeitada, confirmando que as diferenças de mortalidade não são devidas ao acaso e que alguns extratos são efetivamente mais ativos que outros.

A maioria dos extratos mostrou toxicidade aos cupins a uma concentração de 9,3 g.mm². No entanto, apenas os extratos metanólico da madeira do caule de *D. dichroa* e os extratos acetato de etila e metanólico da madeira do caule de *S. rubra* e cerne interior de *G. glabra* induziram a uma mortalidade de 100%, mesmo na concentração mais baixa (1,9 mg.mm²). Podemos afirmar a partir destes resultados que a reputação de termiticida da espécie *A. petoumo* não foi confirmada, e seria necessária a avaliação de sua atividade repulsiva em teste de dupla escolha. Além disso, dentre as três espécies identificadas como as mais ativas, apenas uma (*S. rubra*) foi identificada como antifúngica.

VI Conclusão

O fato de a sobreposição das atividades antifúngica e termiticida ser pequena (apenas uma espécie apresentou as duas atividades ao mesmo tempo), sugere-se que os metabólitos produzidos por essas plantas não sejam altamente citotóxicos, e sim moléculas ativas com um alvo biológico mais específico. Além disso, os rendimentos de extração obtidos pelos diferentes órgãos de cada espécie parecem demonstrar que os metabólitos de atividade biológica definida são produzidos em cada órgão a fim de resistir aos agressores de forma específica.

Por outro lado, os resultados dos testes biológicos sobre os fungos lignívoros não só confirmam o potencial antifúngico dos extratos de madeiras duráveis, mas também mostram que os extratos de casca possuem um potencial antifúngico interessante. Atualmente, as cascas de todas as espécies exploradas pela indústria madeireira na Guiana são descartadas, e observando os resultados dos testes de atividade antifúngica, poderíamos

imaginar que os extratos das cascas do caule de espécies de madeiras duráveis poderiam ser interessantes para avaliações futuras.

A atividade dos extratos pode variar dependendo da espécie de fungo utilizada no teste. Ainda assim, os extratos de *A. surinamensis*, *T. serratifolia* e *S. rubra* mostraram resultados bastante semelhantes para as duas cepas de fungos lignívoros testadas, o que pode ser interpretado como uma possível presença de compostos com largo espectro de atividade. No caso de *S. rubra*, a forte atividade termiticida sugere que, ou os compostos termiticidas seriam diferentes dos antifúngicos, ou os compostos ativos podem apresentar uma toxicidade celular significativa. Os extratos da madeira de *S. rubra*, *T. serratifolia*, *A. surinamensis*, *Q. rosea*, *B. guianensis* e *M. paraensis* apresentaram os melhores valores de IA sobre *P. sanguineus* e *G. trabeum*. Essas espécies, assim como *V. americana*, foram selecionadas para a segunda fase deste estudo não apenas porque seus extratos mostraram atividade antifúngica, mas também porque algumas delas são bastante exploradas.

Os ensaios de atividade termiticida tiveram por objetivo caracterizar a toxicidade a curto prazo dos extratos sobre os cupins operários. As espécies *D. dichroa*, *S. rubra* e *G. glabra* apresentaram a maior taxa de mortalidade sobre *N. macrocephalus*. O mecanismo de ação desses extratos não foi determinado. No entanto, durante o período de exposição dos cupins aos discos tratados, observou-se que os operários mortos não se alimentaram a partir do papel tratado. Ao mesmo tempo, os discos dos controles negativos sofreram ataque mesmo que moderado durante as 72 horas de exposição. Logo, podemos concluir que a mortalidade relacionada aos extratos de *D. dichroa*, *S. rubra* e *G. glabra* foi induzida pelo contato com os cupins que foram forçados a permanecer sobre os discos tratados.

Há vários estudos publicados que descrevem a atividade termiticida de espécies do gênero *Diospyros*, a partir das quais algumas substâncias foram isoladas: a plumbagina, a microfilona, e a isodiospirina da espécie *D. celebica*, assim como a 7-metiljuglona da espécie *D. virginiana* (Carter *et al.*, 1978; Ganapaty *et al.* 2004, ver capítulo 1 – II.7.2 moléculas naturais inseticidas, página 36). O gênero *Diospyros* é bastante comum na Guiana e trata-se de uma espécie que atualmente não é valorizada. A atividade termiticida demonstrada neste estudo poderia incentivar a utilização de madeiras de Ebenaceae. Nesse contexto de

exploração de uma floresta tão heterogênea, qualquer possibilidade de diversificação das espécies exploradas pode melhorar o caráter sustentável da exploração, favorecendo o restabelecimento das populações nativas e reduzindo a pressão de exploração de cada uma especificamente.

Capítulo 3

Transferência de resistência à degradação fúngica

I Introdução

A pressão exercida pela exploração madeireira sobre algumas espécies tropicais nativas de grande durabilidade, pode colocar em risco dentro de alguns anos sua existência. Na floresta tropical úmida, valorizar o conjunto das espécies presentes nos sítios de exploração madeireira é uma necessidade fundamental para a utilização dos recursos florestais de forma sustentável.

Engajar-se a tal estratégia de exploração não é algo simples, principalmente porque a proporção relativa de espécies não duráveis, cujas propriedades físicas e tecnológicas são desconhecidas, é muito superior em relação às espécies conhecidas pela grande durabilidade. Assim, a adequação do uso e da classe de durabilidade das espécies exploradas torna-se necessária, assim como a valorização das espécies menos duráveis em meio tropical, onde o risco de degradação por podridões ou insetos é permanente, passando obrigatoriamente pelo processo de tratamento para melhorar o tempo de serviço das estruturas construídas a partir dessas madeiras.

Há muito tempo, os produtos de tratamento baseados em moléculas sintéticas orgânicas (piretroides, azóis, etc) ou minerais (cobre, boro, etc) são os princípios ativos mais

utilizados nos produtos de tratamento da madeira, devido ao baixo custo. Entretanto, o uso desses princípios atualmente encontra-se em declínio, face a pressões ambientalistas e regulamentares que impuseram restrições de uso aos principais produtos (como o arseniato de cobre cromado - CCA) trazendo ao mercado de preservação da madeira a necessidade de novas alternativas ambientalmente mais seguras. É nesse contexto que foi concebida a ideia de tirar proveito dos mecanismos intrínsecos desenvolvidos pelas árvores vivas para se defenderem de organismos predadores.

Observamos anteriormente que os extratos metanólicos de *A. surinamensis*, *B. guianensis*, *M. Huber*, *Q. rosea*, *T. serratifolia* e *V. americana* e o extrato acetato de etila *S. rubra* possuem atividade antifúngica interessante, provavelmente em baixas taxas de impregnação, comparando-se com os rendimentos obtidos da extração destas espécies (Capítulo 2). O objetivo neste capítulo é determinar a possibilidade de transferir a resistência a partir de madeiras duráveis contra fungos lignívoros, sobre outras não resistentes. Para tanto, foi verificado que, uma vez que madeiras não duráveis são impregnadas com os extratos de espécies resistentes. Estes tornam-se significativamente duráveis, primeiramente em um teste de exposição ao solo, e em seguida, em um teste padronizado de avaliação da eficácia de um produto de preservação. A abordagem utilizada é descrita na figura 37.

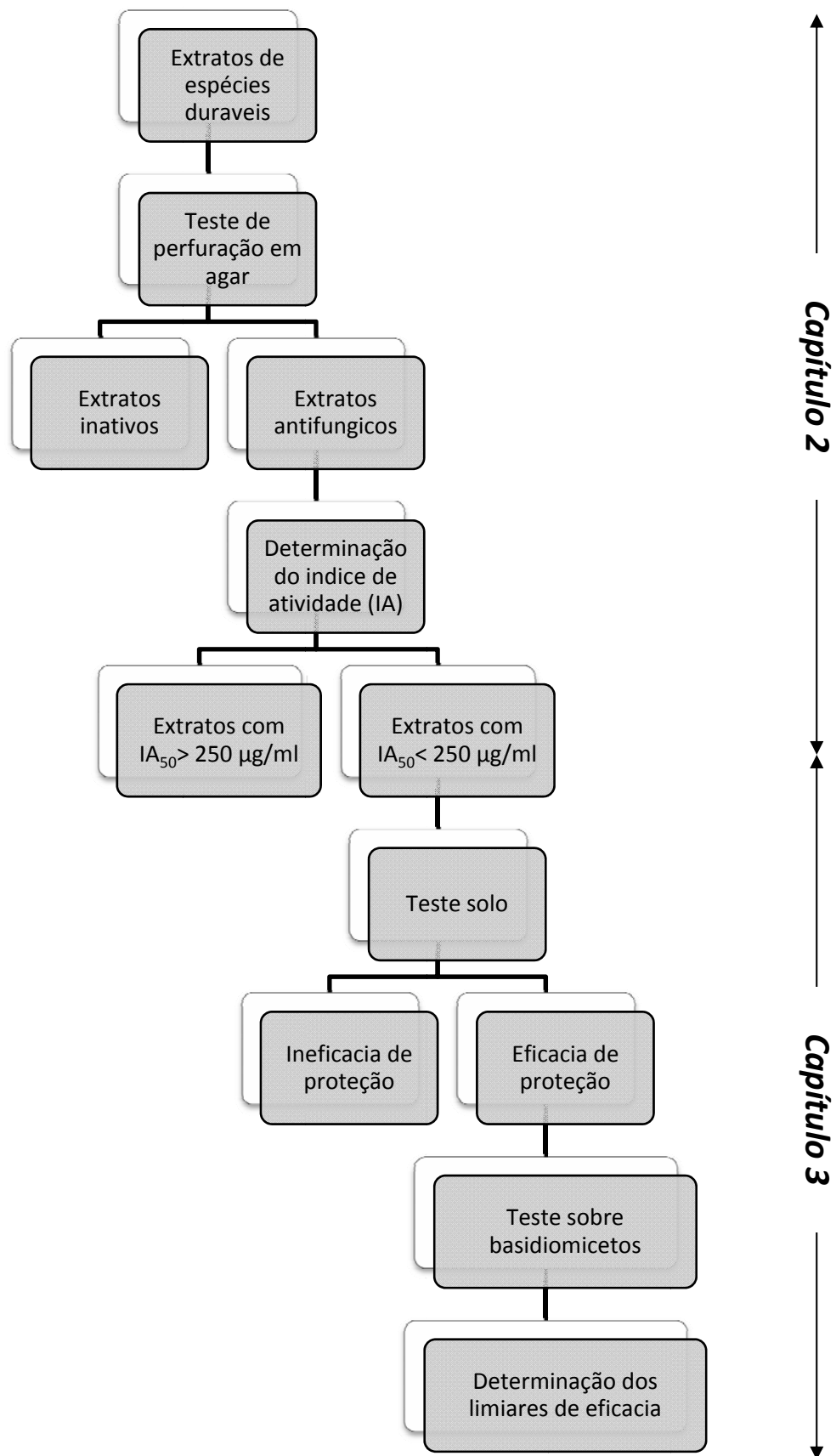


Figura 37 – Resumo esquemático das etapas para a determinação dos limiares de eficácia de um produto de preservação antifúngico.

II Impregnação e ensaio de solo

Para a obtenção de uma grande quantidade de extrato, a madeira (alburno + cerne) de *A. surinamensis*, *B. guianensis*, *M. huberi*, *Q. rosea*, *T. serratifolia* e *V. americana* foi extraída diretamente com metanol, estimando-se que este solvente pode obter um desempenho semelhante ao da extração total (AcOEt + MeOH) do material vegetal. Para essas seis espécies, a atividade antifúngica havia sido detectada em diferentes partes anatômicas da madeira (alburno, cerne externo e interno) e em extratos obtidos tanto com metanol, como com acetato de etila. No caso de *S. rubra*, apenas o extrato acetato de etila mostrou atividade antifúngica e portanto, foi escolhido para a continuação dos estudos.

Inicialmente, o efeito protetor desses extratos foi avaliado por meio de um tratamento por impregnação em madeira não durável. Uma vez impregnadas, as madeiras não duráveis foram expostas à microbiota do solo florestal. O método utilizado foi adaptado da norma ASTM D2017/81 (86), da American Society for Testing and Materials (ASTM) - método padronizado de ensaio laboratorial acelerado da resistência natural à deterioração da madeira.

II.1 Plano de amostragem

Os testes foram realizados com amostras provenientes do alburno de duas espécies amazônicas não duráveis: *Virola surinamensis* (Rol. Rottb ex.) Warb. (Myristicaceae) e *Schefflera morototoni* (Aubl.) Maguire, Steyerm. & Frodin (Araliaceae). *V. surinamensis* foi descrita como suscetível ao ataque de cupins, ainda que estas duas espécies sejam classificadas como não resistentes frente a fungos basidiomicetos (classe 5). Estas duas espécies, além de escolhidas por serem bem adaptadas a este teste, são relativamente bem impregnáveis e com uma densidade média do alburno de cerca de 0 para madeira *V. surinamensis* e 0,43 para *S. morototoni* para os indivíduos coletados neste estudo.

Para testar a eficácia dos extratos sobre os blocos de *V. surinamensis*, foi realizado o seguinte plano de amostragem:

A₁ – Lote de 40 blocos tratados com o extrato metanólico de *A. surinamensis*, as retenções teóricas de 89,6, 44,8, 22,4, 5,6 e 2,8 kg.m⁻³ (oito blocos por concentração);

A₂ – lote de 40 blocos tratados com o extrato metanólico de *B. guianensis*, as retenções teóricas de 89,6, 44,8, 22,4, 5,6 e 2,8 kg.m⁻³ (oito blocos por concentração);

A₃ – lote de 40 blocos tratados com o extrato metanólico de *M. huberi*, as retenções teóricas de 89,6, 44,8, 22,4, 5,6 e 2,8 kg.m⁻³ (oito amostras por concentração);

A₄ - lote de 40 blocos tratados com o extrato metanólico de *Q. rosea*, as retenções teóricas de 89,6, 44,8, 22,4, 5,6 e 2,8 kg.m⁻³ (oito blocos por concentração);

A₅ – lote de 40 blocos tratados com o extrato metanólico de *T. serratifolia*, as retenções teóricas de 89,6, 44,8, 22,4, 5,6 e 2,8 kg.m⁻³ (oito blocos por concentração);

A₆ – lote de 40 blocos tratados com o extrato metanólico de *V. americana*, as retenções teóricas de 89,6, 44,8, 22,4, 5,6 e 2,8 kg.m⁻³ (oito blocos por concentração);

A₇ - lote de 40 blocos tratados com extrato acetato de etila de *S. rubra*, as retenções teóricas de 89,6, 44,8, 22,4, 5,6 e 2,8 kg.m⁻³ (oito blocos por concentração);

A₈ – lote de 24 blocos tratados com o antifúngico **clortalonil**, as retenções teóricas de 2,6, 1,3 e 0,65 kg.m⁻³ (oito blocos por concentração), utilizados como controle positivo;

A₉ – lote de 24 blocos tratados com o antifúngico **tebuconazol**, as retenções teóricas de 2,6, 1,3 e 0,65 kg.m⁻³ (oito blocos por concentração), utilizados como controle positivo;

A₁₀ – lote de 12 blocos não tratados, usados como controle da virulência do solo.

Para testar a eficácia dos extratos sobre os blocos de *S. morototoni*, foi realizado o seguinte plano de amostragem:

B₁ – Lote de 40 blocos tratados com o extrato metanólico de *A. surinamensis*, as retenções teóricas de 72, 36, 18, 4,5 e 2,25 kg.m⁻³ (oito blocos por concentração);

B₂ – Lote de 40 blocos tratados com o extrato metanólico de *B. guianensis*, as retenções teóricas de 72, 36, 18, 4,5 e 2,25 kg.m⁻³ (oito blocos por concentração);

B₃ – Lote de 40 blocos tratados com o extrato metanólico de *M. Huberi*, as retenções teóricas de 72, 36, 18, 4,5 e 2,25 kg.m⁻³ (oito blocos por concentração);

B₄ – Lote de 40 blocos tratados com o extrato metanólico de *Q. rosea*, as retenções teóricas de 72, 36, 18, 4,5 e 2,25 kg.m⁻³ (oito blocos por concentração);

B₅ – Lote de 40 blocos tratados com o extrato metanólico de *T. serratifolia*, as retenções teóricas de 72, 36, 18, 4,5 e 2,25 kg.m⁻³ (oito blocos por concentração);

B₆ – Lote de 40 blocos tratados com extrato metanólico de *V. americana*, as retenções teóricas de 72, 36, 18, 4,5 e 2,25 kg.m⁻³ (oito blocos por concentração);

B₇ – Lote de 40 blocos tratados com extrato acetato de etila de *S. rubra*, as retenções teóricas de 72, 36, 18, 4,5 e 2,25 kg.m⁻³ (oito blocos por concentração);

B₈ – Lote de 24 blocos tratados com o antifúngico **clortalonil**, as retenções teóricas de 2,75, 1,38 e 0,69 kg.m⁻³ (oito blocos por concentração), utilizados como controle positivo;

B₉ – Lote de 24 blocos tratados com o antifúngico **tebuconazol**, as retenções teóricas de 2,75, 1,38 e 0,69 kg.m⁻³ (oito blocos por concentração), utilizados como controle positivo;

B₁₀ – Lote de 12 blocos não tratados, usados para como controle da virulência do solo.

II.2 Impregnação

Para estabelecer as taxas de retenção teóricas utilizadas neste estudo, levamos em consideração os rendimentos da extração obtidos das espécies duráveis. As extrações de maior rendimento são de cerca de 16%, o que corresponde a uma taxa de retenção de 89,6 kg.m⁻³ de *V. surinamensis* (lotes A) e 72 kg.m⁻³ de *S. morototoni* (lotes B). Para os lotes de A₁ a A₇ foram visadas as retenções 89,6 (T1), 44,8 (T2), 22,4 (T3), 5,6 (T4) e 2,8 (T5) kg.m⁻³, e para os lotes B₁ a B₇ foram visadas as retenções 72 (T1), 36 (T2), 18 (T3), 4,5 (T4) e 2,25 (T5) kg.m⁻³. Foi realizada uma impregnação através da seção transversal dos blocos de todos os lotes testados.

As taxas de retenção obtidas para os lotes A₁ a A₇ são mostradas na figura 38. Os valores são bastante homogêneos e confirmam que *V. surinamensis* é uma espécie de madeira bem impregnável. Também é possível constatar que as taxas de retenção real obtidas para os lotes A₆ e A₇ são frequentemente inferiores às retenções visadas. Se considerarmos que o extrato metanólico total é o resultado da soma dos dois extratos acetato de etila e metanol obtidos sucessivamente, a proporção relativa destes dois extratos (Tabela 4, página 74) nos permite estimar a polaridade aproximada do extrato total em metanol. Para este cálculo, o extrato acetato de etila de *S. rubra* não pode ser considerado. Além disso, o deslocamento acima ou abaixo de uma reta de coeficiente de angular 1 e da equação,

$$(Retenção\ real) = (retenção\ teórica) + constante,$$

nos permite estimar a tratabilidade da madeira com os extratos utilizados. Se a constante for positiva, a madeira será impregnada com uma média acima da retenção teórica e, se a constante for negativa, a taxa de retenção real média é inferior à retenção teórica visada. O gráfico obtido a partir dos valores dessa constante em função da polaridade do extrato (figura 39) mostra que as maiores taxas de retenção foram obtidas com os extratos mais polares. Isso pode ser explicado pela afinidade dos extrativos aos componentes estruturais da madeira (paredes celulares, lúmens ou pontuações).

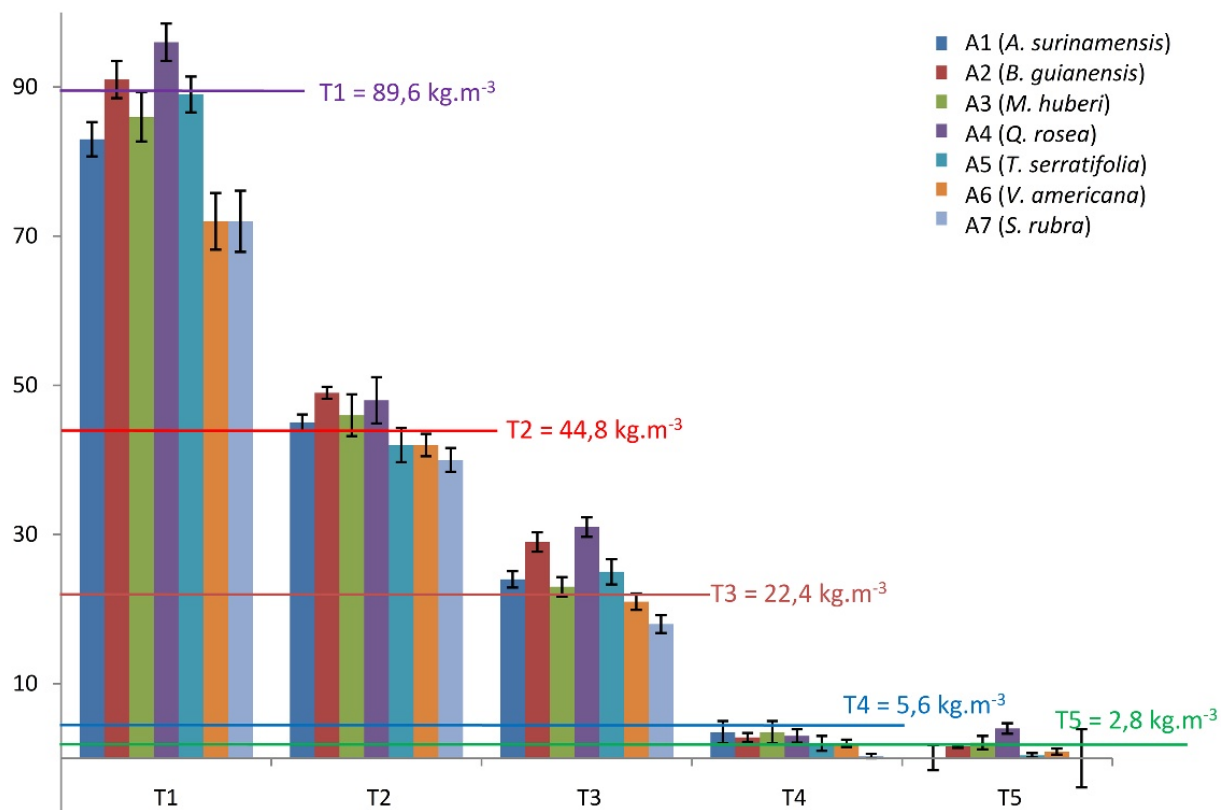


Figura 38 – Retenções médias (em kg.m^{-3}) obtidas para os blocos dos lotes de A₁ a A₇. As marcas T1 a T5 representam as retenções visadas.

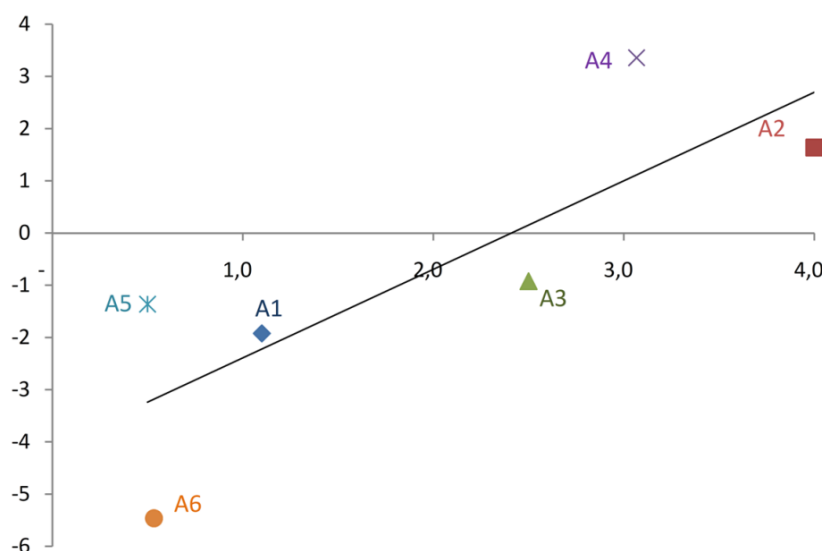


Figura 39 – Tratabilidade de *V. surinamensis*, em função da polaridade do extrato metanólico aplicado (lotes A1 a A6). No eixo das abscissas, polaridade dos extratos (proporção relativa de extrato MeOH/ extrato AcOEt); no eixo das ordenadas, ordenadas na origem da reta de coeficiente angular 1 e da equação (taxa de retenção real) = (taxa teórica) + b. Esse valor é usado para estimar o deslocamento para cima ($b > 0$, altos níveis de impregnação real) ou para baixo ($b < 0$, baixas taxas de impregnação real) dessa reta.

Para os tratamentos T4 e, especialmente T5, os blocos apresentam os maiores desvios em relação ao valor da taxa de impregnação média, indicando que o tratamento foi menos homogêneo.

As taxas de retenção obtidas para os lotes de B₁ a B₇ são apresentadas na figura 40, e a relação entre a polaridade e grau de impregnação é mostrada na figura 41. Ao contrário do que foi observado para *V. surinamensis*, para os blocos de *S. morototoni* não há nenhuma ligação entre esses dois parâmetros. Nesse caso, os lotes B₂, B₅ e, em menor grau B₁, apresentaram frequentemente uma retenção real acima da retenção visada. Foi possível observarmos também que em baixas taxas de retenção, os valores reais obtidos foram próximos aos valores teóricos visados, e os desvios-padrão correspondentes são relativamente baixos. Apenas nas taxas de retenção superiores, os extratos apolares de *V. americana* (B₆) e *S. rubra* (B₇) apresentam uma impregnação menos eficiente sobre os blocos. Assim, a madeira de *S. morototoni* parece mais permeável do que a de *V. surinamensis*.

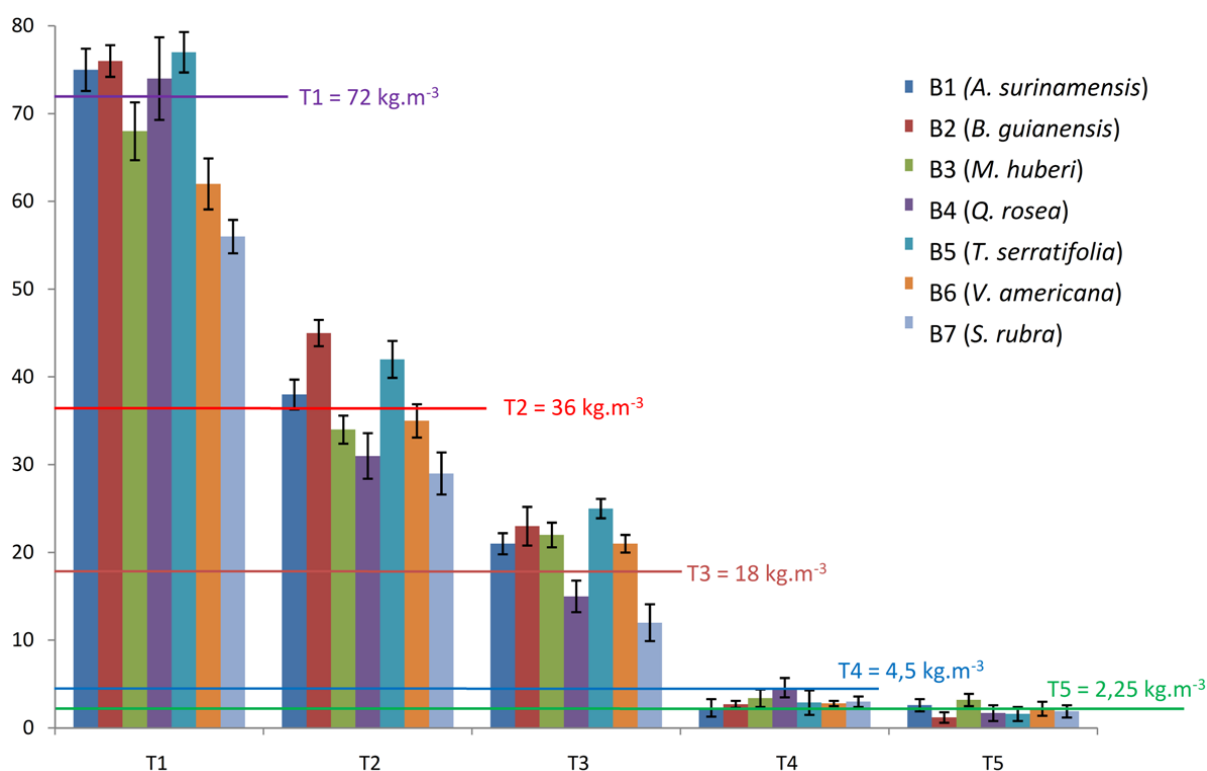


Figura 40 – Retenções médias (em kg.m⁻³) obtidas para os blocos dos lotes B₁ a B₇. As marcas T₁ a T₅ representam as retenções visadas.

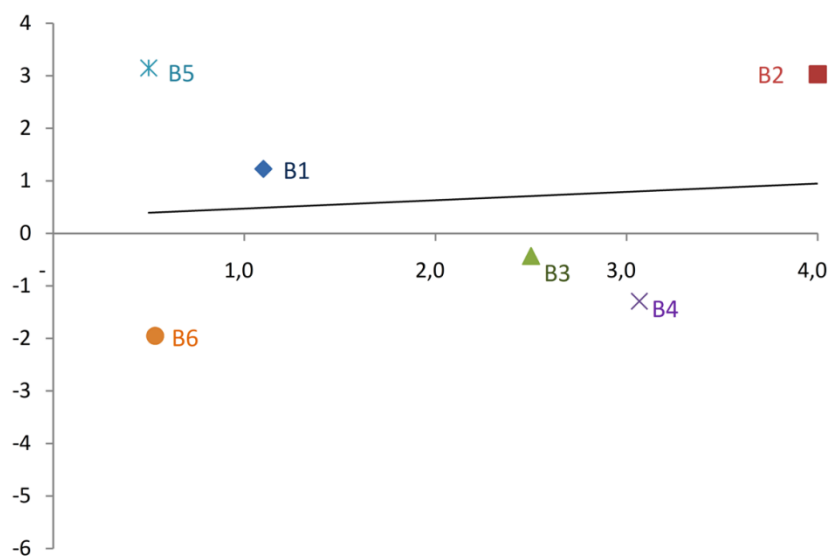


Figura 41 – Tratabilidade de *S. morototoni*, em função da polaridade do extrato metanólico aplicado (lotes B1 a B6). No eixo das abscissas, polaridade dos extratos (proporção relativa de extrato MeOH/ extrato AcOEt); no eixo das ordenadas, ordenadas na origem da reta de coeficiente angular 1 e da equação (taxa de retenção real) = (taxa teórica) + b. Esse valor é usado para estimar o deslocamento para cima (b > 0, altos níveis de impregnação real) ou para baixo (b < 0, baixas taxas de impregnação real) dessa reta.

Em conclusão, esses resultados sugerem que as taxas de retenção obtidas pelo método de impregnação de superfície são diretamente influenciadas pela afinidade dos extratos pela madeira impregnada. Para *V. surinamensis*, as taxas de retenção foram menos homogêneas e dependem diretamente da polaridade dos extratos. A uma retenção teórica de 2,8 kg.m⁻³, as taxas de retenção médias obtidas são por vezes muito baixas e, os desvios muito grandes, logo podemos esperar uma maior variabilidade dos resultados do teste de degradação em contato com o solo. Para *S. morototoni*, as impregnações foram homogêneas e próximas dos valores esperados, mesmo nas retenções mais baixas.

II.3 Eficácia de proteção dos extratos: exposição ao solo florestal

Os lotes de blocos A₁ a A₁₀ e B₁ a B₁₀, após secagem, foram expostos ao solo florestal naturalmente contaminado por seis semanas. Após esse período, a degradação sofrida pelos blocos foi determinada a partir da medida da perda da dureza das madeiras impregnadas. Os fungos presentes no solo degradam tanto a celulose quanto a lignina, induzindo a perda das propriedades mecânicas da madeira (resistência à compressão, resistência à flexão,

tenacidade, elasticidade e dureza). A perda das propriedades mecânicas é proporcional à degradação causada pelo ataque fúngico e pode ser utilizada como uma medida do nível de degradação (Faraji, 2005; Nicholas & Crawford, 2003). A análise dos resultados nos permitiu avaliar a importância relativa de três parâmetros: a atividade antifúngica do extrato, a taxa de retenção e as relações entre a madeira e o tratamento aplicado.

Os valores de perda de dureza obtidos foram comparados pelo teste *one way* ANOVA, sendo o intervalo de confiança de 0,05. Os valores de F (tabela 6) foram muito superiores ao valor correspondente à Lei de Fisher ($F = 1,42$), para 41 graus de liberdade no numerador e, respectivamente, 421 e 416 graus de liberdade no denominador, indicando que os tratamentos produziram um efeito significativo na perda de dureza sofrida pelos blocos impregnados.

Tabela 6 – Significância da perda de dureza dos lotes A₁ a A₁₀ e B₁ a B₁₀.

ANOVA	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados	F	Valor de P
Entre grupos (A ₁ a A ₁₀)	31390	41	765,5	18,82	P<0.0001
Dentro dos grupos (A ₁ a A ₁₀) ^a	17130	421	40,68		
Total	48510	462			
Entre grupos (B ₁ a B ₁₀)	33820	41	824,8	19,22	P<0.0001
Dentro dos grupos (B ₁ a B ₁₀) ^a	17860	416	42,92		
Total	51670	457			

^a Cada taxa de retenção de cada lote constitui um grupo.

Os resultados para os lotes de A₁ a A₁₀ de cada retenção (T1 a T5) são mostrados na figura 42. Após seis semanas de exposição, os blocos do lote de testemunhas, não impregnados (A₁₀), mostraram uma perda de dureza de aproximadamente 24%, o que valida as condições de teste.

Comparando-se os valores de perda de dureza sofridos pelos lotes de A₁ a A₇ com os valores de A₈ e A₉, utilizados como controle positivo do teste, e A₁₀ como controle negativo, é possível comparar a eficácia de proteção de cada extrato sobre os blocos de *V. surinamensis*. Para facilitar a leitura dos resultados, a significância de P de cada tratamento em comparação aos lotes não tratados A₁₀ foi avaliada segundo o teste de Tukey (de muito

significativo – ***, a não significativo – ns), e as séries de amostragem foram classificadas por grupos, por meio de uma análise de comparações múltiplas (teste de Dunn bilateral). Os controles negativos pertencem ao grupo I.

Ao observarmos os resultados, podemos constatar que os extratos impregnados nas retenções T4 e T5 não conduziram a uma perda de dureza significativamente diferente dos controles negativos. Esse resultado está relacionado à alta variabilidade na perda de dureza observada para cada retenção, o que pode ocorrer devido à grande variabilidade observada durante a impregnação.

Os tratamentos obtidos a partir de T1 com os extratos de *T. serratifolia*, *B. guianensis*, *V. americana* e *M. huberi* impediram completamente a degradação da madeira, pois as perdas de dureza correspondentes foram nulas. Esses tratamentos foram reunidos em grupos A, AB e ABC. Ainda que o tratamento T1 corresponda a uma impregnação de proporção relativamente grande (16% em massa), é importante notar que a madeira de *V. surinamensis* é excepcionalmente não durável. Além disso, temos que destacar que o nível de proteção obtido a partir da impregnação com o extrato de *Q. rosea* para as retenções T1, T2 e T3 foi elevado. Da mesma forma, os blocos tratados com o extrato de *B. guianensis* nas taxas de retenção T2 e T3, e os blocos tratados com o extrato de *T. serratifolia* na taxa de retenção T2 atingiram bons níveis de proteção contra a degradação, uma vez que esses blocos pertencem a grupos sem o caractere "I" dos blocos testemunha. O extrato desta última espécie na taxa de retenção T3 mostrou ser significativamente eficaz.

Assim, os extratos de *T. serratifolia* e *B. guianensis* mostraram ser os mais eficazes para a proteção da madeira de *V. surinamensis*. De forma menos importante, os extratos de *Q. rosea*, *V. americana* e *M. huberi* podem também ser valorizados para a preservação de madeiras não duráveis. Para a maioria dessas espécies, exceto *Q. rosea*, o rendimento de extração é razoavelmente bom (até 15% para *T. serratifolia* e *V. americana*). Entretanto, mesmo que o rendimento de extração de *Qualea rosea* seja baixo (cerca de 1%), esta é a segunda espécie mais explorada na Guiana Francesa após *Dicorynia guianensis*.

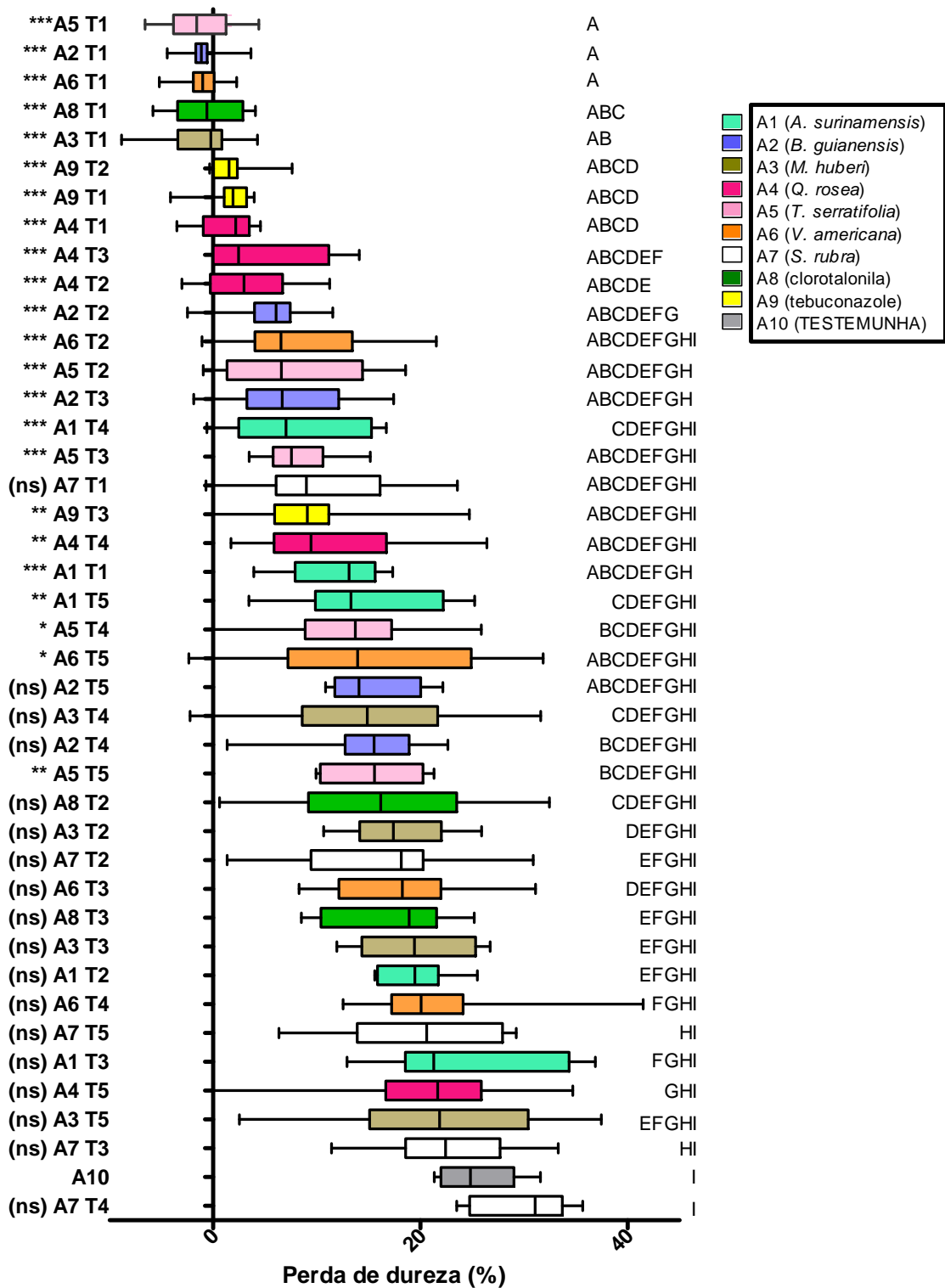


Figura 42 – Perda de dureza (%), em ordem crescente das medianas, medidas para os lotes de *V. surinamensis* tratados com 89,6 (T1), 44,8 (T2), 22,4 (T3), 5,6 (T4) e 2,8 (T5) kg.m⁻³ de cada extrato. (***) muito significativo, (**) significativo, (*) pouco significativo, (ns) não significativo. Os grupos definidos pelo teste de Dunn ($\alpha = 0,05$) são mostrados à direita do gráfico.

Os resultados de perda de dureza registrados para os lotes de B₁ a B₁₀ para cada retenção (T1 a T5) são mostrados na figura 43. Em seis semanas, os blocos do grupo controle B₁₀ apresentaram perda de dureza igual a 24% em média, validando as condições de teste. Como descrito anteriormente, realizamos comparações estatísticas entre os valores de perda de dureza dos lotes de B₁ a B₁₀. Os resultados destes testes são mostrados no gráfico.

Novamente, os blocos tratados nas taxas de retenção T4 e T5 não atingiram níveis de proteção significativamente diferentes dos controles negativos. Entretanto, vários tratamentos classificados em grupos AB e ABC apresentaram proteção muito satisfatória de *S. morototoni*, e em particular, os extratos de *T. serratifolia*, *S. rubra* e *B. guianensis* em T1, os tratamentos com extratos de *T. serratifolia*, *B. guianensis* e *V. americana* em T2 e, finalmente, o tratamento com *B. guianensis* em T3.

Para esses testes, podemos observar uma variabilidade relativamente grande mesmo para as maiores taxas de retenção, aparentemente maiores do que as obtidas com os blocos de *V. surinamensis*. Este resultado pode estar relacionado a uma distribuição desigual do extrato no interior da madeira ou a uma variabilidade intraindivíduo de madeira de *S. morototoni* – o que induziu a diferenças significativas entre os blocos impregnados. Essa madeira é conhecida por ser bastante heterogênea e apresenta poros e vasos visíveis a olho nu, irregulares sob o plano tangencial, podendo distorcer as medidas de perda de dureza por indentação. Esse fenômeno pode explicar porque, neste caso, nenhum tratamento mostrou perda de dureza nula para *S. morototoni*. Apesar disso, é possível concluir que os extratos de *T. serratifolia*, *B. guianensis* e, em menor medida, *S. rubra* e *V. americana* são capazes de proteger a madeira de forma eficaz.

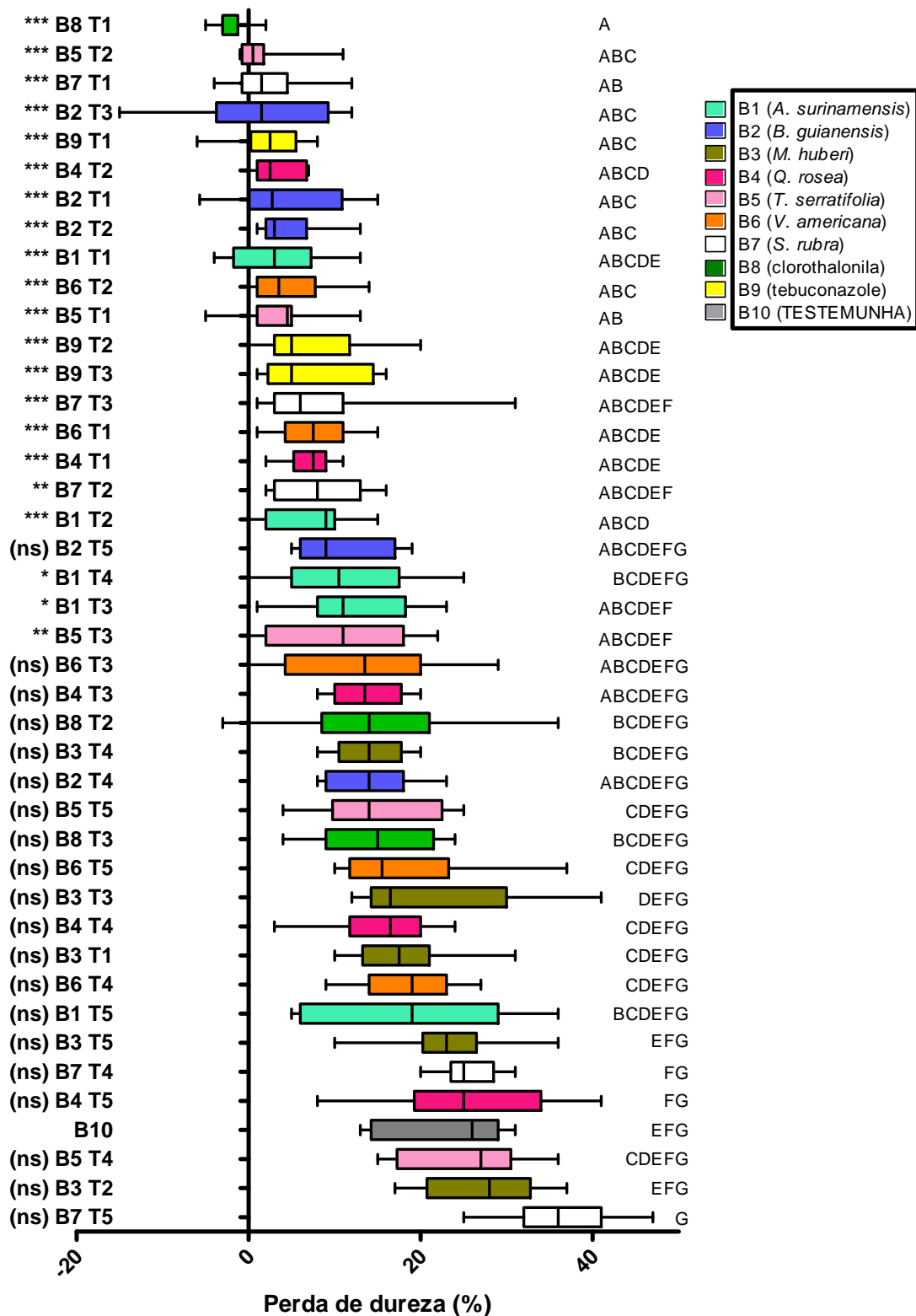


Figura 43 – Perda de dureza (%), em ordem crescente das medianas, medidas para os lotes de *S. morototoni* tratados com 72 (T1), 36 (T2), 18 (T3), 4,5 (T4) e 2,25 (T5) kg.m⁻³ de cada extrato. – (***) muito significativo, (**) significativo, (*) pouco significativo, (ns) não significativo. Os grupos definidos pelo teste de Dunn ($\alpha = 0,05$) são mostrados à direita do gráfico.

Esses resultados nos permitem concluir que a atividade antifúngica dos extratos de madeiras amazônicas duráveis, observada a partir dos resultados obtidos pelo cálculo do índice de atividade antifúngica, pode ser transferida para madeiras não duráveis expostas a fungos lignívoros. Entretanto, o impacto dessa impregnação é limitado pela tratabilidade da madeira e pela afinidade dos extratos pelos componentes estruturais da madeira tratada. A formulação de um produto e o aperfeiçoamento de um método adequado de impregnação poderiam melhorar os níveis de proteção das madeiras tratadas.

Em geral, os extratos de *T. serratifolia* e *B. guianensis* induziram a uma melhor durabilidade da madeira tratada. Deve ser enfatizado que esta segunda espécie é relativamente rara na floresta natural, e embora seja explorada, seria difícil assegurar a disponibilidade dos recursos naturais suficientes, mesmo para um nicho de mercado na preservação da madeira. As outras espécies que podem induzir uma proteção completa da madeira tratada são *S. rubra*, *V. americana*, *Q. rosea* e *M. huberi*, mas, para esses extratos, a eficácia do tratamento depende da madeira.

II.4 Limiares da eficácia de proteção dos extratos

A retenção dos extratos para a obtenção de um nível de proteção da madeira foi estimada a partir do cálculo dos valores de TR_{50} , onde a concentração efetiva (medida da taxa de impregnação real) é definida como aquela na qual um determinado lote induz a uma perda de dureza equivalente a 50% da perda sofrida pelos grupos controle A_{10} e B_{10} (lotes de controle da virulência do solo). Esses valores são obtidos graficamente a partir da curva obtida pelas perdas de dureza relativas em função das taxas de retenção de cada bloco, e são apresentados na tabela 7.

Tabela 7 – Valores de TR₅₀ (retenções equivalentes à 50% da perda de dureza dos blocos) dos lotes A₁ a A₇ e B₁ a B₁₀

Lotes	Espécies	Lotes A _n (<i>V. surinamensis</i>)	Lotes B _n (<i>S. morototoni</i>)
		TR ₅₀ (kg.m ⁻³)	TR ₅₀ (kg.m ⁻³)
A ₁ /B ₁	<i>Andira surinamensis</i>	67±20	18±4
A ₂ /B ₂	<i>Bagassa guianensis</i>	8±3	3±1
A ₃ /B ₃	<i>Manilkara huberi</i>	62±8	> 68
A ₄ /B ₄	<i>Qualea rosea</i>	4±1	18±4
A ₅ /B ₅	<i>Tabebuia serratifolia</i>	11±4	20±5
A ₆ /B ₆	<i>Vouacapoua americana</i>	32±5	21±4
A ₇ /B ₇	<i>Sextonia rubra</i>	50±10	18±6

Os lotes A₂ (8 kg.m⁻³) e B₂ (3 kg.m⁻³), impregnados com o extrato de *B. guianensis*, A₄ (4 kg.m⁻³) e B₄ (18 kg.m⁻³), impregnados com o extrato de *Q. rosea*, e A₅ (11 kg.m⁻³) e B₅ (20 kg.m⁻³), impregnados com o extrato de *T. serratifolia*, apresentaram os valores mais baixos de TR₅₀ – e esses valores são semelhantes para ambas as madeiras utilizadas. Logo, é possível concluir que os três extratos acima descritos apresentaram os melhores níveis de proteção efetiva, de acordo com os valores de TR₅₀, e que a eficácia de proteção não é influenciada pelo tipo de madeira tratada. De acordo com essa medida, em comparação aos os níveis de proteção avaliados anteriormente, ao contrário dos extratos de *T. serratifolia* e *B. guianensis*, o extrato de *Q. rosea* é bastante eficaz para a preservação da madeira, mas não permite uma proteção completa contra o ataque fúngico, mesmo se utilizarmos o extrato em uma taxa de retenção T1.

Por outro lado, o valor da TR₅₀ do lote B₁ (18 kg.m⁻³) mostra que a eficácia da proteção, decorrente da impregnação do extrato de *A. surinamensis* está relacionada ao tipo da madeira utilizado. Modificações no método de impregnação ou da espécie de madeira a ser tratada poderiam permitir a redução da variabilidade e aprimorar os níveis de proteção. Os lotes A₆ (32 kg.m⁻³) e B₆ (21 kg.m⁻³), impregnados com o extrato de *V. americana* e B₇ (50 kg.m⁻³) e B₇ (18 kg.m⁻³), impregnados com o extrato de *S. rubra*, mostraram uma eficácia de proteção moderada e menos pronunciada que a dos três extratos mais ativos. O extrato de *M. huberi* é o menos eficaz.

III Teste de eficácia de preservantes

Um segundo teste foi realizado afim de avaliar a eficácia dos extratos metanólicos de *A. surinamensis*, *Q. rosea* e *T. serratifolia* usados como tratamento de preservação por impregnação. A espécie *B. guianensis* não foi selecionada para esse teste, pois a espécie é relativamente rara, e o rendimento de extração é baixo. O método utilizado foi adaptado da norma europeia NF EN 113 – Preservantes da madeira – Método de ensaio para determinar a eficácia de protecção frente a fungos lignívoros basidiomicetos – Determinação dos limiares de eficácia (Afnor, 1996a). Na norma EN 113, os testes devem ser feitos com blocos de madeira com volume de 18,7 cm³, e o nível de eficácia estabelecido em torno da taxa de retenção correspondente à perda de massa de 3%. As amostras utilizadas neste estudo têm um volume 12,5 vezes inferior (1,5 cm³). A diferença de volume entre os blocos repercute obrigatoriamente na velocidade de degradação, sendo que um bloco de menor volume é degradado mais rapidamente. Os resultados devem ser validados por comparação com o controle negativo. Os valores absolutos de perda de massa não foram considerados.

III.1 Plano de amostragem

Os testes foram realizados a partir de blocos cortados de espécies de clima temperado: da madeira de *Fagus sylvatica* L. (Fagaceae, faia) e do alburno de *Pinus sylvestris* (Pinaceae, pinho). O alburno de ambas as espécies é classificado como não durável frente a fungos basidiomicetos lignívoros (classe 5). A madeira de *F. sylvatica* apresenta uma densidade média de cerca de 0,7 e da madeira de *P. sylvestris* 0,55; o alburno de ambas as espécies são relativamente bem impregnáveis.

Para testar a eficácia da atividade antifúngica dos extratos selecionados impregnados ao *P. sylvestris*, foi realizada a amostragem a seguir :

C₁ – Lote de 100 blocos tratados com o extrato metanólico de ***A. surinamensis***, as retenções teóricas de 60, 40, 20, 10 e 5 kg.m⁻³ (vinte blocos por concentração);

C₂ – lote de 100 blocos tratados com o extrato metanólico de ***Q. rosea***, as retenções teóricas de 60, 40, 20, 10 e 5 kg.m⁻³ (vinte blocos por concentração);

C₃ – lote de 100 blocos tratados com o extrato metanólico de *T. serratifolia*, as retenções teóricas de 60, 40, 20, 10 e 5 kg.m⁻³ (vinte blocos por concentração);

C₄ – lote de 20 blocos tratados com um produto antifúngico [mistura de tebuconazol (24% em massa) e propiconazol (76% em massa)] de eficácia conhecida, a taxa de retenção teórica de 12,6 kg.m⁻³ (vinte blocos);

C₅ – lote de 20 blocos tratados apenas com o solvente utilizado para a impregnação dos extratos (metanol), utilizado como controle de toxicidade do solvente ;

C₆ – lote de 300 blocos não tratados utilizados para o controle da virulência em cada frasco de ensaio.

Para testar a eficácia da atividade antifúngica dos extratos selecionados impregnados ao *F. sylvatica*, foi realizada a seguinte amostragem :

D₁ – Lote de 100 blocos tratados com o extrato metanólico de *A. surinamensis*, as retenções teóricas de 78, 52, 26, 13, 6,5 kg.m⁻³ (vinte blocos por concentração) ;

D₂ – lote 100 blocos tratados com o extrato metanólico de *Q. rosea*, as retenções teóricas de 78, 52, 26, 13, 6,5 kg.m⁻³ (vinte blocos por concentração) ;

D₃ – lote 100 blocos tratados com o extrato metanólico de *T. serratifolia*, as retenções teóricas de 78, 52, 26, 13, 6,5 kg.m⁻³ (vinte blocos por concentração) ;

D₄ – lote de 20 blocos tratados com um produto antifúngico [mistura de tebuconazol (24% em massa) e propiconazol (76% em massa)] de eficácia conhecida, a taxa de retenção teórica de 6,3 kg.m⁻³ (vinte blocos);

D₅ – lote de 20 blocos tratados apenas com o solvente utilizado para a impregnação dos extratos (metanol), utilizado como controle de toxicidade do solvente ;

D₆ – lote de 300 blocos não tratados utilizados para o controle da virulência em cada frasco de ensaio.

III.2 Impregnação à vácuo

Para determinar as taxas de retenção visadas neste estudo, levamos em consideração as taxas de retenção consideradas eficazes para cada extrato no ensaio de solo e a densidade da madeira utilizada. Para os lotes de C₁ a C₃ (pinho) foram visadas as retenções de 60 (T1), 40 (T2), 20 (T3), 10 (T4) e 5 (T5) kg.m⁻³ para os lotes de D₁ a D₃ (faia) foram visadas as retenções de 78 (T1), 52 (T2), 26 (T3), 13 (T4) 6,5 (T5) kg.m⁻³ para a impregnação dos extratos. As impregnações foram realizadas à vácuo para todos os lotes testados.

O método de impregnação da madeira à vácuo (*full cell impregnation*, em inglês) consiste em sugar o ar presente no interior da madeira por um ciclo de vácuo antes da introdução da solução a ser impregnada. Esse método permitiu a obtenção de melhores retenções nas madeiras impregnadas a partir das soluções de tratamento e, embora, segundo Islam *et al.* (2008), não existam diferenças significativas na retenção obtida a partir da impregnação pelos métodos à vácuo e de imersão.

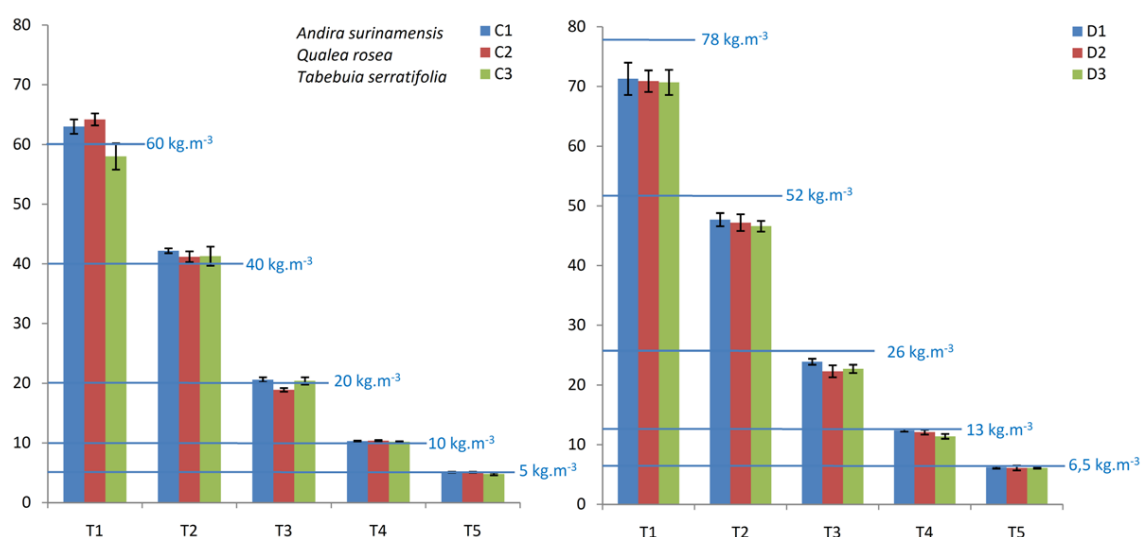


Figura 44 –Retenções médias dos blocos dos lotes C₁ a C₃ (*P. sylvestris*, à esquerda) e D₁ a D₃ (*F. sylvatica*, à direita). As marcas azuis representam as retenções visadas.

O gráfico da figura 44 representa as taxas de retenção médias obtidas a partir da impregnação dos extratos sobre *P. sylvestris* e *F. sylvatica*. Por esse gráfico, podemos observar claramente que o método de impregnação utilizado possibilitou atingir retenções mais próximas às taxas visadas, além dos resultados obtidos mostrarem menor variabilidade em comparação ao tratamento de depósito sobre superfície desenvolvido durante o teste solo. Nenhuma diferença foi observada entre as taxas de retenção dos diferentes extratos para uma mesma madeira.

Entretanto, as taxas de retenção para os lotes de D₁ a D₃ são invariavelmente 10% inferiores às taxas visadas. Esse fato mostra que *F. sylvatica* é ligeiramente menos permeável que o *P. sylvestris*.

III.3 Eficácia protetora dos extratos em exposição a fungos lignívoros

Os lotes de C₁ a C₆ e de D₁ a D₆ secos foram expostos ao ataque, respectivamente de *Gloeophyllum trabeum* e *Trametes versicolor* durante oito semanas (Figura 45). Após esse período, o dano sofrido pelas madeiras foi analisado com base em suas perdas de massa.

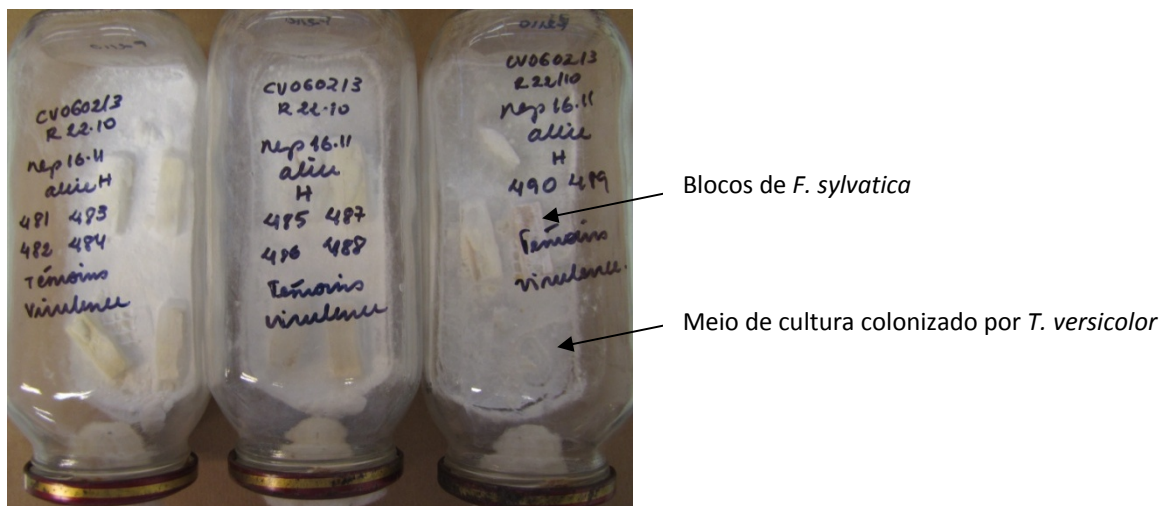


Figura 45 – Exposição de blocos do lote D₆ ao fungo formador de podridão branca *T. versicolor*.

As perdas de massa são expressas em índices de degradação médios, que são a relação (expressa em%) entre a perda de massa sofrida pelos grupos tratados (C₁ a C₅, D₁ a D₅) e a perda de massa dos grupos não tratados (C₆ e D₆). Quanto maior o índice de degradação, menor a eficácia do tratamento.

Os valores de índice de degradação obtidos foram comparados por *one way ANOVA* com um intervalo de confiança de 0,05. Os valores de F são mais elevados que os valores correspondentes na Lei Fisher (1,67 para 1,66 para *P. sylvestris* e *F. sylvatica*) para o grau de liberdade utilizado nesse modelo, o que indica que o tratamento afetou significativamente a perda de massa experimentada pelos blocos.

Tabela 8 – Significância da perda de dureza dos lotes C₁ a C₆ e D₁ a D₆.

ANOVA	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados	F	Valor de P
Entre grupos (C ₁ a C ₆) ^a	372400	17	21900	10,85	P<0.0001
Dentro dos grupos (C ₁ a C ₆)	476500	236	2019		
Total	848800	253			
Entre grupos (D ₁ a D ₆) ^a	572900	17	33700	63,08	P<0.0001
Dentro dos grupos (D ₁ a D ₆)	140500	263	534,3		
Total	713400	280			

^a As retenções de cada lote constitui um grupo.

Os índices de degradação dos lotes de C₁ a C₅ para cada retenção (T1 a T5) são mostrados na Figura 46. Ao final de oito semanas, os blocos do lote C₆ apresentaram 24% de perda de massa média, validando assim as condições de teste. Por definição, o índice de degradação dos blocos do lote C₆ é de 100%, mas C₆, foi representado no gráfico para ilustrar a variabilidade obtida nas amostras sem tratamento. Além disso, os graus de significância de Tukey foram determinados por comparação entre cada lote e C₆. Os blocos do lote C₅ mostraram um índice de degradação de 85%, não sendo significativamente diferentes dos controles, indicando que o efeito do solvente utilizado para as impregnações é insignificante em comparação aos blocos não tratados, ou seja, utilização do metanol não tem influência sobre a toxicidade dos extratos frente aos fungos.

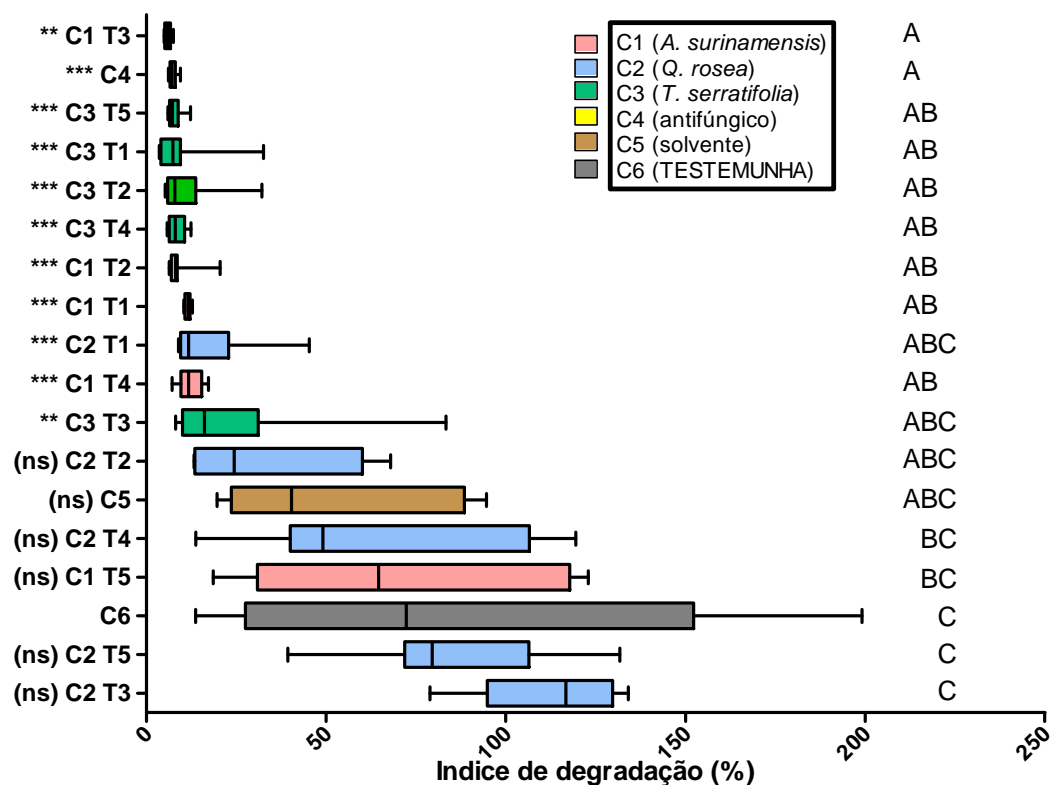


Figura 46 – Índices de degradação (%), em ordem crescente das medianas, lotes de *P. sylvestris* tratados a 60 (T1), 40 (T2), 20 (T3), 10 (T4) e 5 (T5) kg.m⁻³ de cada extrato. (***) muito significativo, (**) significativo, (*) pouco significativo, (ns) não significativo. Os grupos definidos pelo teste de Dunn ($\alpha = 0,05$) são mostrados à direita do gráfico.

O extrato mais eficaz para a proteção contra a degradação do pinho por *Gloeophyllum trabeum* é o extrato de *T. serratifolia*, que mostrou ser ativo em todas as concentrações testadas. Dessa forma, o TR₅₀ para esse extrato, nessas condições, é inferior à menor taxa de retenção utilizada, ou seja, 4,8 kg.m⁻³ e a uma retenção equivalente, é tão eficaz quanto o antifúngico de referência. O extrato de *A. surinamensis* é igualmente eficaz até a taxa de retenção T4, inclusive. Todos os blocos do lote C₁ entre T1 a T4 pertencem aos grupos A ou AB de acordo com o teste de Dunn. Já a retenção T5, não protege significativamente o alburno de *P. sylvestris*. Essas análises mostram que o extrato de *A. surinamensis* é eficaz o suficiente para proteger o pinho nessas condições. Os valores de atividade registrados nesse ensaio são semelhantes – e excedem – ao efeito protetor desse extrato observado na madeira de *S. morototoni* no teste solo. O efeito da impregnação com o extrato do *Q. rosea* é significativo apenas na maior taxa de retenção (T1), e ainda assim, os blocos de pinho impregnados nessa retenção pertencem ao grupo ABC.

Os resultados do índice de degradação dos lotes de D₁ a D₆ são mostrados na figura 47. Após oito semanas, o lote D₆ mostrou uma redução média da massa em torno de 39%, enquanto o D₅ apresentou um índice de degradação de 120% para uma série de blocos que não são significativamente diferentes dos controles negativos, o que valida a escolha do solvente e as condições de impregnação do teste. É importante notar também que, com base na baixa variabilidade relativa dos blocos testemunha, provavelmente os blocos de *F. sylvatica* são degradados mais homoganeamente em comparação aos blocos de *P. sylvestris*.

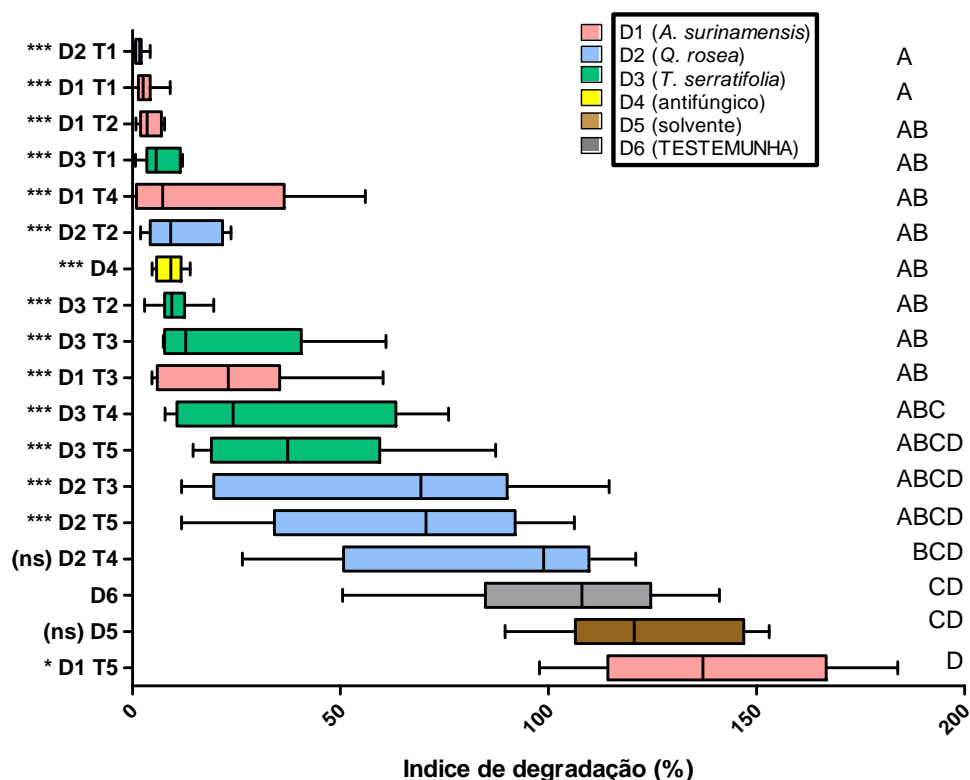


Figura 47 – Índices de degradação (%), em ordem crescente de medianas, lotes de *F. sylvatica* tratados a 78 (T1), 52 (T2), 26 (T3), 13 (T4) e 6,5 (T5) kg/m³ de cada extrato. (***) Muito significativo, (**) significativo, (*) pouco significativo, (ns) não significativo. Os grupos definidos pelo teste de Dunn ($\alpha = 0,05$) são mostrados à direita do gráfico.

O extrato de *A. surinamensis* é muito eficaz na proteção dos blocos de *F. sylvatica* nas taxas de retenção T1 e T2. A variabilidade dos resultados aumenta em T3 e T4, indicando que a proteção se torna menos eficaz nessas taxas de retenção. No entanto, os lotes de amostras D₁ T3 e D₁ T4 pertencem ao grupo AB. O extrato de *Q. rosea* mostrou ser muito ativo em T1 e T2, mas o nível de proteção é bastante reduzido a partir da retenção T3. Em

relação ao extrato de *T. serratifolia*, a eficácia do tratamento pode ser observada nas retenções T1, T2 e com menor impacto, T3. Globalmente, os resultados obtidos sobre os blocos de *P. sylvestris* e *F. sylvatica* são comparáveis.

III.4 Limiares da eficácia de proteção dos extratos

Os limiares de concentrações eficazes de cada extrato foram estimados a partir do cálculo do TR₅₀, onde a concentração eficaz é estabelecida como aquela em que um lote específico mostra índice de degradação de 50% (equivalente à perda de massa sofrida pelos grupos controle C₆ e D₆) (Tabela 9). Como descrito anteriormente, esses valores são obtidos graficamente a partir das curvas que representam o índice de degradação e as taxas de retenção correspondentes. Essa tabela recorda os valores obtidos anteriormente pela medição de perda de dureza da madeira após exposição ao solo.

Tabela 9 – Valores de TR₅₀ (retenção equivalente à 50% da perda de massa ou dureza dos blocos) para os lotes A₁, B₁, C₁ e D₁ (impregnados com extrato de *A. surinamensis*), A₄, B₄, C₂ e D₂ (impregnados com extrato de *Q. rosea*) e A₅, B₅, C₃ e D₃ (impregnados com o extrato de *Tabebuia serratifolia*).

Lotes	Extrato	TR ₅₀ (kg.m ⁻³)			
		Lotes A _n (<i>V. surinamensis</i>) Ensaio solo	Lotes B _n (<i>S. morototoni</i>) Ensaio solo	Lotes C _n (<i>P. sylvestris</i>) Ensaio <i>G. trabeum</i>	Lotes D _n (<i>F. sylvatica</i>) Ensaio <i>T. versicolor</i>
A ₁ /B ₁ /C ₁ /D ₁	<i>Andira surinamensis</i>	67±20	18±2	6±1	11±4
A ₄ /B ₄ /C ₂ /D ₂	<i>Qualea rosea</i>	4±1	18±2	18±9	24±5
A ₅ /B ₅ /C ₃ /D ₃	<i>Tabebuia serratifolia</i>	11±4	20±2	<4,8	<6

Esses resultados mostram que os métodos – tanto o de medição da perda de dureza quanto o de perda de massa – obtiveram resultados relativamente próximos, com uma virulência ligeiramente maior para os blocos expostos ao solo. O extrato de *T. serratifolia* mostrou melhor eficácia em todos os testes e valores de TR₅₀ que variaram de 4,8 a 20 kg.m⁻³. O extrato de *Q. rosea* parece ser igualmente ativo quando consideramos apenas as concentrações do TR₅₀. Entretanto, o conjunto de resultados obtidos a propósito da atividade desse extrato para a proteção contra a degradação da madeira mostrou que, frequentemente, este extrato atinge níveis modestos de proteção, mesmo com altas taxas de retenção; e o extrato de *A. surinamensis* é ativo nas taxas de retenção quase sempre maiores.

IV Conclusão

A capacidade de transferir a durabilidade de madeiras amazônicas resistentes para madeiras não duráveis foi demonstrada, observando-se em parte, a perda da dureza de blocos de madeira tratados expostos à microbiota do solo. Por outro lado, observa-se a perda de massa sofrida por blocos tratados expostos a uma cultura pura de fungos apodrecedores de madeira.

O extrato acetato de etila de *Sextonia rubra* mostrou pouca eficácia na proteção da madeira, apesar dos excelentes resultados em índice de atividade antifúngica. Além disso, este é o único extrato de acetato de etila utilizado nesse teste. Dessa forma, é possível que a polaridade seja um fator realmente importante para a capacidade de proteção de um extrato. Não podemos ignorar, porém, que possíveis heterogeneidades na distribuição do extrato sejam decorrentes do método de impregnação utilizado para o teste solo. Por outro lado, tem sido demonstrado que taninos antioxidantes podem atuar sinergicamente com compostos antifúngicos para melhorar a eficiência global do tratamento de impregnação (Schultz & Nicholas, 2000; Schultz *et al.*, 1995), e os extratos metanólicos contêm maiores quantidades relativas de compostos polifenólicos. Embora não necessariamente possuam atividade antifúngica, e podem retardar a degradação por fungos, quando impregnados juntamente com um princípio ativo. Esse fenômeno pode explicar a relativa baixa atividade do extrato de *S. rubra* quando utilizado no tratamento de proteção, e demonstra que provavelmente essa espécie deveria ser extraída por um solvente anfifílico.

Os extratos de *B. guianensis*, *T. serratifolia* e, em menor escala, *Q. rosea* demonstraram serem os mais eficazes para o tratamento de preservação tanto de *V. surinamensis* quanto de *S. morototoni*. Esses extratos, especialmente os dois primeiros, possuem atividades antifúngicas muito semelhantes, independentemente da madeira tratada. Embora estes testes não possam representar fielmente o risco biológico a que uma madeira tratada e exposta às intempéries tropicais é submetida, foi possível demonstrar que os extratos antifúngicos provenientes de madeiras amazônicas duráveis possuem um verdadeiro potencial de proteção para o tratamento de madeiras não duráveis. Os extratos

de *T. serratifolia* e *B. guianensis* são os mais eficazes contra a degradação por fungos lignívoros.

Resultados semelhantes a esses já foram descritos na literatura para extratos de *Tectona grandis* (teca, Thévenon *et al.*, 2001) e *Neobalanocarpus heimii* (Yamamoto & Hong, 1988). E da mesma forma que para esses extratos, a lixiviabilidade, a degradação química e a toxicidade ambiental devem ser determinados para os extratos de *T. serratifolia*, *B. guianensis* e *Q. rosea* para a continuação dessa pesquisa. Em nosso conhecimento, este estudo descreve pela primeira vez, ensaios de transferência de durabilidade de espécies amazônicas muito resistentes sobre outras não duráveis, expostas à degradação fúngica.

Capítulo 4

Transferência de resistência à degradação por cupins

I Introdução

Existem vários estudos publicados sobre espécies de madeira naturalmente resistentes à degradação por insetos xilófagos, com o objetivo de identificar novos compostos inseticidas ou repelentes (Blaske & Hertel, 2001; Ganapaty *et al.* 2004; Kondo *et al.* 1963; Ohmura, 2000; Scheffrahn, 1991). A eficácia dessas substâncias é, por vezes, equivalente aos produtos disponíveis atualmente para o tratamento de proteção da madeira contra o ataque de cupins, como por exemplo, o óleo essencial obtido a partir da madeira de *Callitris glaucophylla*. Este óleo, rico em sesquiterpenos, incluindo os ácidos cóstico e citronílico, mostrou ter uma atividade repulsiva frente ao cupim *Coptotermes formosanus* (Watanabe *et al.*, 2005), além de ser duas vezes mais ativo do que o cloreto de amônio alquila utilizado na mesma concentração (0,5% m/m).

Algumas espécies da Amazônia são conhecidas por sua alta resistência à degradação por cupins (Barbosa *et al.* 2007; Bultman Southwell & 1976; Fokialakis *et al.* 2006; Labosky e Harun, 1985; Lajide *et al.* 1995; Peres Filho *et al.* 2006; Sá *et al.*, 2008, Santana *et al.* 2010, Verma *et al.*, 2009), e, como demonstrado no capítulo 2, os extratos de *Goupia glabra*, *Diospyros dichroa* e *Sextonia rubra* possuem boa atividade termiticida. A espécie *Diospyros dichroa* é relativamente rara e inexplorada. Por essa razão, foi avaliada a atividade termiticida apenas dos extratos metanólico de *G. glabra* e acetato de etila de *S. rubra* utilizados em tratamento por impregnação

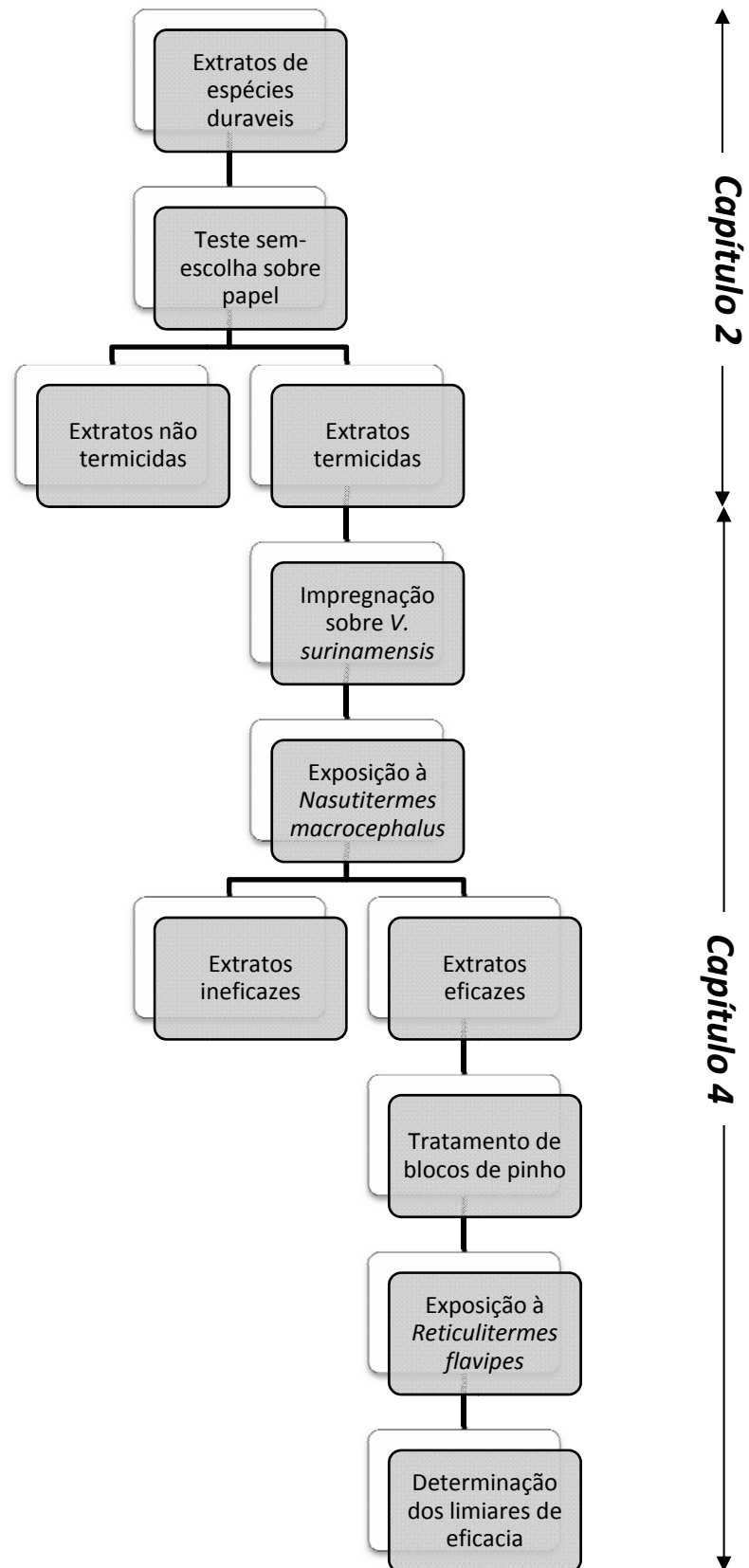


Figura 48 – Resumo esquemático das etapas para a determinação dos limiares de eficácia de um produto de preservação termiticida.

II Impregnação e resistência induzida ao ataque por cupins

Os resultados anteriores mostraram que os todos os extratos da madeira de *G. glabra* possuem atividades termiticidas. Dessa forma, o estudo prosseguiu com a extração da madeira (alburno + cerne) dessa espécie diretamente com metanol, a fim de se obter uma extração total da madeira (compostos solúveis em acetato de etila e em metanol).

No caso do extrato de *S. rubra*, foram observadas algumas diferenças em termos de atividade termiticida entre os extratos metanólicos da madeira obtidos a partir da primeira e segunda extrações. Por este motivo, prosseguimos o estudo apenas com o extrato acetato de etila.

Os extratos foram impregnados em blocos de *V. surinamensis* e expostos à degradação por térmitas utilizando-se um protocolo baseado no método descrito por Barbosa *et al.* (2007).

II.1 Plano de amostragem

Os testes foram realizados com amostras provenientes do alburno de *Virola surinamensis* (Rol. Rottb ex.) Warb., descrita anteriormente para os ensaios de atividade antifúngica em contato com o solo (ver Capítulo 3 – II Impregnação e ensaio de solo, página 90). Essa espécie é conhecida por ser suscetível ao ataque por cupins.

Para testar a eficácia dos extratos sobre os blocos de *V. surinamensis*, foi realizado o plano de amostragem seguinte:

E₁ – Lote de dezoito blocos de *V. surinamensis* tratados com o extrato metanólico de *G. glabra*, as taxas de retenção teóricas de 89,6 ; 22,4 ; 7 ; 5 et 3,5 kg.m⁻³ (seis blocos por retenção);

E₂ – lote de dezoito blocos de *V. surinamensis* tratados com o extrato acetato de etila de *S. rubra*, as taxas de retenção teóricas de 89,6 ; 22,4 ; 7 ; 5 et 3,5 kg.m⁻³ (seis blocos por retenção);

E₃ – lote de quatro blocos de *G. glabra*, utilizado como controle positivo ;

E₄ – lote de quatro blocos de *S. rubra*, utilizado como controle positivo ;

E₅ – lote de quinze blocos de *V. surinamensis* não tratados, usados como controle negativo e controle da virulência dos cupins.

II.2 Impregnação

Para determinar as taxas de retenção visadas neste estudo, foram levadas em consideração as concentrações de extrato aplicadas sobre o suporte de papel utilizado no teste de escolha direta (Capítulo 2) e a densidade da *Virola surinamensis*. Para os lotes E₁ e E₂ foram visadas as taxas de retenção de 89,6 (T1), 22,4 (T2), 7 (T3), 5 (T4) e 3,5 (T5) kg.m⁻³. Foi realizada uma impregnação através da seção transversal dos blocos de todos os lotes testados.

As taxas de retenção obtidas pelos lotes E₁ e E₂ são apresentadas na tabela 10. As impregnações às taxas de retenção T₁ e T₂ foram realizadas com o mesmo solvente descrito anteriormente (capítulo 3, II Impregnação e ensaio de solo, página 90) – metanol para o extrato de *G. glabra* e acetato de etila para o extrato de *S. rubra* ; para as taxas mais baixas (T₃ a T₅), a acetona foi utilizada. Observando-se as impregnações obtidas, podemos concluir que a utilização deste solvente está relacionada a resultados mais homogêneos, com desvios-padrão entre 0,3 e 0,7 kg.m⁻³ para todos os tratamentos combinados.

Tabela 10 –Retenções médias (em kg/m³) e desvios-padrão dos lotes E₁ e E₂.

Lotes	T1	T2	T3	T4	T5
E ₁ (<i>Goupia glabra</i>)	89,0±7,1	20,0±1,1	7,8±0,7	5,1±0,4	3,5±0,3
E ₂ (<i>Sextonia rubra</i>)	74,3±3,2	17,1±0,8	7,0 ±0,5	5,4±0,6	4,1±0,5

II.3 Eficácia protetora dos extratos

Os blocos dos lotes E₁ a E₅, após a secagem, foram expostos a uma colônia de cupins *Nasutitermes macrocephalus* durante 15 dias (figuras 49 e 50). Após esse período, o nível de degradação dos blocos foi analisado com base nas perdas de massa correspondentes.



Figura 49 – Blocos expostos ao ataque de cupins.



Figura 50 – (1) Bloco do lote E₅ (não tratado) ; (2) Bloco do lote E₂ T2 (tratado com o extrato de *S. rubra* a 5 kg/m³) após 15 dias de exposição a *N. macrocephalus*.

Os valores obtidos foram comparados pelo teste ANOVA a um fator com um intervalo de confiança de 0,05 (Tabela 11). O valor de F é maior que o valor correspondente pela Lei de Fisher (1,93), indicando que o tratamento produziu um efeito significativo nas perdas de massa sofridas pelos blocos.

Tabela 11 – Significância das perdas de massa dos lotes E₁ a E₅.

ANOVA	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados	F	P-value
Entre os grupos ^a	8628	12	719	5,83	<0,0001
Em grupos	6787	55	123,4		
Total	15410	67			

^a cada taxa de retenção de cada lote é considerado um grupo.

Os resultados dos lotes de E₁ a E₅ para cada retenção (de T1 a T5) são apresentados na figura 51. Os blocos do lote E₅ (controle da virulência dos cupins) após o período de 15 dias apresentaram uma perda de massa média de 15%, o que validou as condições de teste. Ao comparar os valores de perda de massa médios obtidos para os lotes E₁ e E₂ com aqueles

obtidos com os controles positivos E₃ e E₄ e negativo E₅, é possível comparar a eficácia de proteção dos extratos sobre os blocos de *V. surinamensis*.

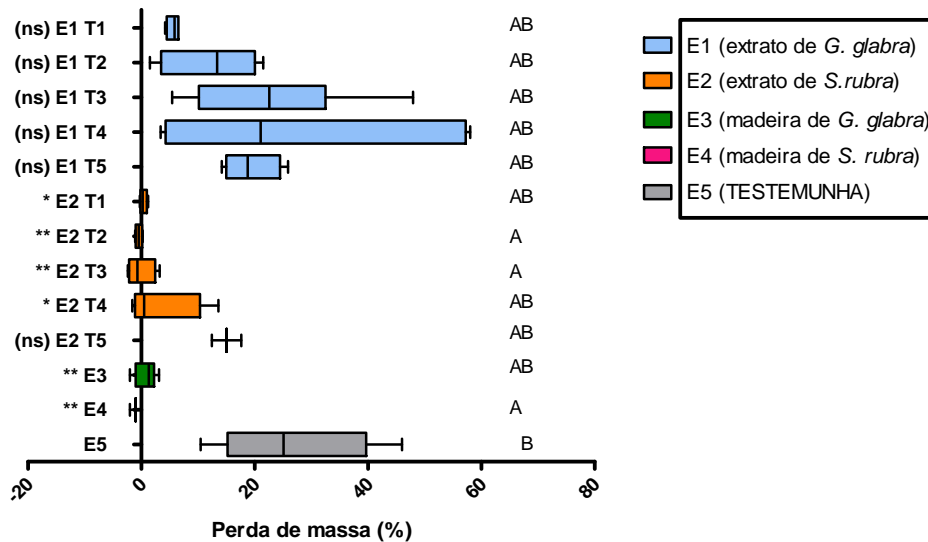


Figura 51 – Perda de massa média (em %) dos blocos dos lotes E₁ a E₅, após exposição aos cupins durante 15 dias. (***) muito significativo, (**) significativo, (*) pouco significativo, (ns) não significativo. Os grupos definidos pelo teste de Dunn ($\alpha = 0,05$) são mostrados à direita do gráfico.

As perdas de massa obtidas com o lote E₂ (tratado com o extrato acetato de etila de *S. rubra*), confirmam a eficácia protetora desse extrato frente ao ataque por cupins. Nas taxas de retenção de T2 e T3, os lotes pertencem ao grupo A, igualmente ao lote E₄ constituído de blocos de madeira de *S. rubra*, utilizados como controles positivos do teste. Na taxa de retenção T4, o impacto do extrato é intermediário sobre a proteção dos blocos e na T5, ele não é mais significativo. A taxa de retenção T2 corresponde ao rendimento de extração da madeira de *S. rubra* com acetato de etila. Logo, poderíamos esperar que esse extrato sozinho tornasse os blocos impregnados mais resistentes à degradação dos cupins.

Por outro lado, ainda que a madeira de *G. glabra* seja efetivamente resistente ao ataque por cupins (o lote E₄ foi classificado no grupo AB, apesar de ter sido considerado apenas significativo pelo teste de Tukey), os resultados desse teste podem demonstrar que o extrato desta mesma madeira não possui impacto significativo sobre os blocos impregnados do lote E₁, salvo aqueles impregnados na taxa de retenção T1. É possível constatar que apesar da amostragem não ser suficiente para podermos afirmar a

significância estatística do efeito na taxa de retenção T1, todos os lotes pertencem ao grupo AB. Portanto, para a taxa de retenção T1, a proporção de extrato metanólico de *G. glabra* na madeira de *V. surinamensis* é duas vezes superior ao rendimento de extração. Esses dados sugerem que a resistência aos térmitas observada na madeira de *G. glabra* pode estar relacionada ao menos em parte aos compostos encontrados no extrato metanólico total, podendo ser muito apolares ou muito polares, ou ainda muito voláteis. A hipótese de que um ou vários constituintes ativos possam ser voláteis explicaria o fato de que esse extrato seja ativo segundo os resultados obtidos para o teste « sem-escolha » sobre papel (em placas de Petri fechadas), perdendo assim sua atividade quando impregnado em blocos relativamente pequenos e expostos a um cupinzeiro do lado de fora do laboratório.

Além disso, é possível destacarmos ainda que esse teste de exposição direta ao ataque dos cupins não nos permite discriminar as atividades repulsiva e termitocida. Foi demonstrado anteriormente que o extrato de *S. rubra* é termitocida, e o teste seguinte nos permitirá avaliar a capacidade de proteção em um tratamento de superfície sobre blocos em *P. sylvestris* e sua capacidade repulsiva.

III Eficácia termitocida em tratamento de superfície

III.1 Plano de amostragem

O extrato acetato de etila de *S. rubra*, cuja eficácia de proteção já havia sido demonstrada contra o ataque de *N. macrocephalus*, foi também testado em um tratamento de superfície frente a *Reticulitermes flavipes* conforme a norma europeia NF EN 118 (Produtos de preservação de madeiras – Determinação da ação preventiva contra espécies de *Reticulitermes* – cupins europeus – métodos de laboratório) (Afnor, 2005).

Os ensaios foram realizados com os blocos cortados a partir do alburno de *Pinus sylvestris* L., Pinaceae de densidade de 0,55. O alburno dessa espécie é classificado como sensível ao ataque de cupins (classe S).

Para testar a eficácia dos extratos sobre os blocos de *P. sylvestris*, foi realizado o seguinte plano de amostragem:

F₁ – lote de seis blocos de *P. sylvestris* tratados a 55,9 g.m⁻² com extrato acetato de etila de *S. rubra* ;

F₂ – lote de seis blocos de *P. sylvestris* tratados a 47,9 g.m⁻² com extrato acetato de etila de *S. rubra* ;

F₃ – lote de seis blocos de *P. sylvestris* tratados a 23,9 g.m⁻² com extrato acetato de etila de *S. rubra* ;

F₄ – lote de seis blocos de *P. sylvestris* tratados a 11,6 g.m⁻² com extrato acetato de etila de *S. rubra* ;

F₅ – lote de seis blocos de *P. sylvestris* tratados a 47,9 g.m⁻² com extrato acetato de etila de *S. rubra* **lixiviados** ;

F₆ – lote de seis blocos de *P. sylvestris* tratados a 11,6 g.m⁻² com extrato acetato de etila de *S. rubra* **lixiviados** ;

F₇ – lote de seis blocos de *P. sylvestris* tratados com acetona pura (controle da toxicidade do solvente) ;

F₈ – lote de seis blocos de *P. sylvestris* não tratados (controle da virulência dos cupins).

III.2 Tratamento de superfície

Os blocos dos lotes de F₁ a F₆ foram tratados por « pintura », ou seja por depósito em superfície, do extrato acetato de etila de *S. rubra* dissolvido em acetona em quatro concentrações : 35, 30, 15, 7,25% (m/m), o que permite a obtenção das taxas de superfície esperadas.

Além disso, em dois lotes suplementares foi utilizada a técnica de lavagem ou lixiviação dos blocos tratados a 47,9 e 11,6 g.m⁻², segundo a norma NF EN 84 (Produtos de preservação da madeira – Provas de envelhecimento acelerado das madeiras tratadas previamente aos ensaios biológicos – Prova de lavagem) (Afnor, 1997).

III.3 Eficácia protetora dos extratos

Após secagem, os blocos foram postos em contato com os cupins dentro de dispositivos de ensaio durante oito semanas (figura 52). Após o período de teste, um exame visual dos blocos nos permitiu avaliar o nível de ataque sofrido durante o teste. Essa avaliação foi feita com base em cotações que vão de um nível de ataque 0 (nenhum ataque) a um nível de ataque 4 (ataque forte) (figura 53).

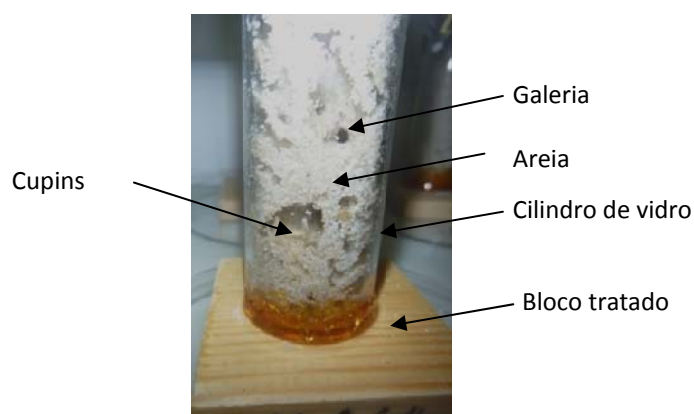


Figura 52 – Dispositivo de ensaio para a avaliação da eficácia do extrato de *S. rubra* frente a *R. flavipes* quando aplicado em alburno de *P. sylvestris*.

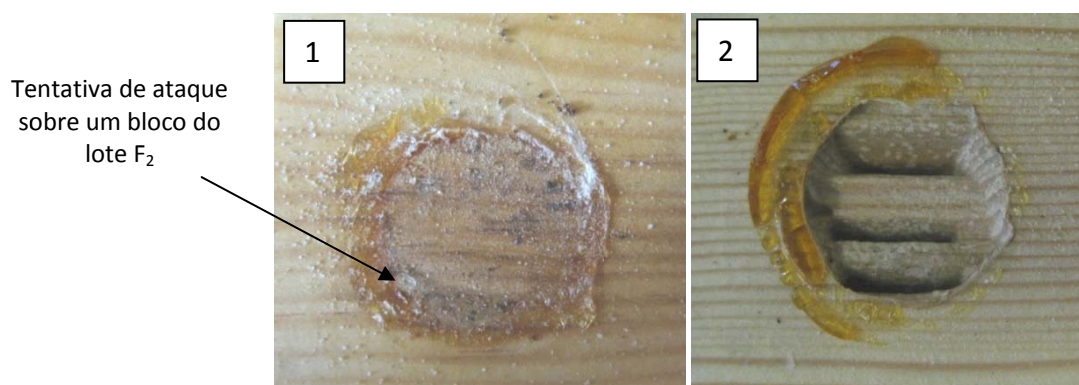


Figura 53 – (1) Bloco do lote F₂ com uma tentativa de ataque (cotação 1) por *R. flavipes*. (2) Bloco do lote F₇ com forte ataque (cotação 4) por *R. flavipes*.

Durante toda a duração do teste, o comportamento e a atividade dos cupins foram observados. Para os blocos dos lotes F₇ e F₈ (controle de toxicidade do solvente e virulenciados cupins), foi observada a presença de atividade física dos cupins até a oitava

semana de teste. Ao fim do ensaio, a mortalidade média observada nesses lotes não passou de 50%, o que valida as condições do ensaio (tabela 12).

Dentro de todos os dispositivos preparados a partir dos lotes F₁ a F₅, o conjunto dos cupins perdeu sua atividade física normal entre a segunda e a sexta semanas de exposição, indicando que todos os cupins morreram nesse período. Por outro lado, foi possível observar que as provas de envelhecimento acelerado, que têm por objetivo simular os riscos de lavagem pelas intempéries, induzem uma diminuição da toxicidade dos blocos tratados (lotes F₆ e F₇).

Tabela 12 – Atividade observada pelos cupins expostos aos blocos tratados dos lotes de F₁ a F₈. A ausência de atividade dentro dos dispositivos (100% de mortalidade) está marcada em cinza.

Lote de blocos	S1 ^a	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8
F ₁ (55,9 g.m ⁻²)								
F ₂ (47,9 g.m ⁻²)								
F ₃ (23,9 g.m ⁻²)								
F ₄ (11,6 g.m ⁻²)								
F ₅ (47,9 g.m ⁻² lixiviados)								
F ₆ (11,6 g.m ⁻² lixiviados)								
F ₇ (Controle – 0%)								
F ₈ (Controle de virulência)								

^a S : semana.

Ao final do ensaio, os resultados da avaliação do nível de ataque pelos cupins dos lotes de F₁ a F₈ foram analisados pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis, segundo o qual foi possível rejeitarmos a hipótese nula para um valor de $p < 0,00001$. Ou seja, existe pelo menos um lote dentre todos os testados cuja média de cotações obtidas pelo teste de exposição difere significativamente dos outros lotes, indicando que os tratamentos tiveram um impacto significativo sobre a proteção dos blocos. Segundo os resultados apresentados na tabela 13, todos os blocos foram atacados de maneira mais ou menos marcada em função do tratamento aplicado.

O lote F₃ (23,9 g.m⁻²) foi ligeiramente atacado (cotação 1), com exceção de dois blocos que foram moderadamente atacados (cotação 3). Ao mesmo tempo, o lote F₂ (47,9 g.m⁻²) sofreu uma tentativa de ataque (cotação 1), sem que nenhum bloco tenha sido mais

severamente atacado. Esses resultados demonstram que os limiares das concentrações ativas se situam entre esses dois valores de concentração de superfície.

Tabela 13 – Cotações atribuídas aos lotes de blocos F₁ a F₈, expostos durante 8 semanas a *R. flavipes*.

Lote	Cotação					
F ₁ (55,9 g.m ⁻²)	1	1	1	1	1	1
F ₂ (47,9 g.m ⁻²)	1	1	1	1	1	1
F ₃ (23,9 g.m ⁻²)	1	1	1	1	3	3
F ₄ (11,6 g.m ⁻²)	4	4	4	4	4	4
F ₅ (47,9 g.m ⁻² lixiviados)	1	2	2	2	3	4
F ₆ (11,6 g.m ⁻² lixiviados)	4	4	4	4	4	4
F ₇ (Controle – 0%)	4	4	4	4	4	4
F ₈ (Controle de virulência)	4	4	4	4	4	4

Durante o ensaio foi possível observarmos que os cupins não tentaram fugir dos dispositivos teste, e consumiram os espaçadores de *P. sylvestris* entre a areia e os blocos tratados, o que indica que o extrato não apresenta caráter repulsivo marcante. É possível que esse extrato seja tóxico em contato com os insetos, sendo eventualmente não atrativo para o apetite dos cupins.

Enfim, sobre os testes de lavagem, é preciso notar que o extrato foi eliminado em placas após a aplicação do vácuo seguido de retorno à pressão atmosférica (figura 54). Consequentemente, esse ensaio de lavagem conduz à diminuição local da eficácia do produto do teste em relação aos blocos tratados não lavados (F₅ e F₆ comparados respectivamente a F₂ e F₃). As zonas de ataque dos cupins sobre os lotes F₅ e F₆ foram observadas somente nos locais onde visivelmente o produto havia sido retirado durante o ensaio de lavagem. O extrato de *S. rubra* é relativamente lifofílico e o desenvolvimento de uma formulação a partir desse extrato poderia melhorar o desempenho do tratamento, diminuindo o efeito da lavagem sobre a eficácia.

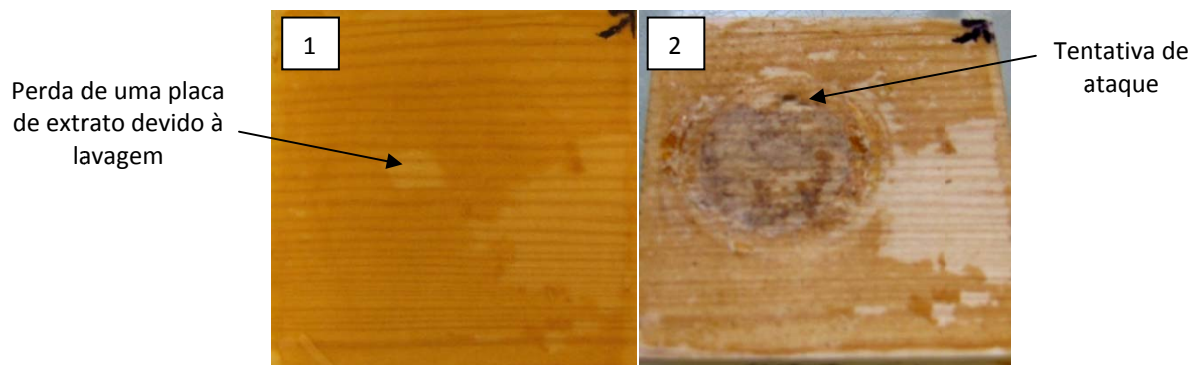


Figura 54 – (1) Bloco do lote F₅ antes da exposição a *R. flavipes*. (2) Mesmo bloco após exposição, nota-se a zona de ataque correspondente à perda de uma placa de extrato devido à lavagem.

Segundo a norma NF EN 599 – 1 (Afnor, 1996b), nenhuma cotação estabelecida deve ser superior a 2: apenas um bloco de cotação 2 pode ser tolerado na utilização de um produto termiticida para preservação da madeira em classe de emprego 1 (ao abrigo da umidade), sendo obrigatória uma prova de envelhecimento segundo a norma NF EN 73 (Afnor, 1998). O extrato de *S. rubra* possui, portanto, um grande potencial para a utilização como matéria prima de um produto de preservação de madeiras em classe de emprego 1, em condição de passar por uma formulação capaz de diminuir o efeito da lavagem sobre sua eficácia. Temos de ressaltar ainda o fato que a atividade termiticida desse extrato não está relacionada à espécie de cupim testada, pois ela mostrou toxicidade semelhante às duas espécies de cupins utilizadas nesse estudo.

IV Conclusão

Essa série de ensaios teve por objetivo a avaliação da atividade termiticida do extrato acetato de etila de *S. rubra* e do extrato metanólico de *G. glabra*, além da determinação dos limiares de concentração eficazes para a proteção da madeira.

O tratamento de blocos de madeira não duráveis com o extrato de *G. glabra* não demonstrou impacto na proteção contra o ataque de cupins. Nenhuma diferença significativa foi observada entre os blocos de *V. surinamensis* tratados com o extrato e os blocos não tratados. Por outro lado, foi demonstrado o caráter fortemente tóxico do extrato acetato de etila de *S. rubra*, cuja atividade foi validada segundo o método descrito na norma

EN 118. Os limiares de atividade desse extrato situam-se entre 23,9 g.m⁻² e 47,9 g.m⁻². A prova de lavagem deste extrato não formulado induz a uma ligeira deterioração da camada protetora, e é provável que esse produto possa apresentar uma melhor performance numa formulação adaptada.

S. rubra é a terceira espécie mais explorada na Guiana Francesa e os remanescentes desta exploração representam uma fonte não negligenciável de matéria ativa para a proteção de estruturas em madeira expostas ao risco de ataque por cupins. O objetivo a curto prazo é a realização de ensaios de ecotoxicidade com esse extrato.

Capítulo 5

***Durabilidade natural – uma chave para a descoberta
de novas moléculas antifúngicas e termiticidas***

I Introdução

A partir dos resultados apresentados no capítulo 2 (página 68) foi possível colocar em destaque a atividade antifúngica e termiticida dos extratos de espécies duráveis.

Os extratos antifúngicos foram selecionados para serem avaliados em fungos patogênicos para o homem, com base na hipótese de que as mesmas substâncias que tornam as madeiras duráveis podem agir também como compostos antimicóticos. O objetivo deste capítulo é o isolamento e a caracterização de novas substâncias naturais antifúngicas.

Além disso, o extrato acetato de etila da madeira de *Sextonia rubra*, que demonstrou atividade antifúngica interessante, e principalmente uma forte atividade termiticida, foi fracionado a fim de que se pudesse isolar os princípios ativos.

II Atividade antifúngica dos extratos obtidos de espécies de grande durabilidade

Vinte extratos identificados como fortemente antifúngicos, obtidos de nove espécies especializadas na formação de madeira durável, foram selecionados para o estudo da

correspondência de atividade antifúngica entre fungos lignívoros e fungos patogênicos para o homem (fungos dermatófitos filamentosos e leveduras). Os extratos selecionados mostraram capacidade de inibir o crescimento de pelo menos um dos dois fungos lignívoros testados pelo método de perfuração em ágar.

Estes extratos foram igualmente testados em fungos dermatófitos filamentosos e leveduras pelo mesmo método (perfuração em ágar) descrito anteriormente (tabela 14), bem como pelo método de microdiluição que consiste em colocar em contato os extratos com uma colução de micélio em meio de cultura líquido. Por esse método, é possível determinar a concentração inibitória mínima (CIM), observando-se a ausência de crescimento do fungo em alguns poços da microplaca.

Tabela 14 – Zonas de inibição (mm) do crescimento de fungos dermatófitos filamentosos e leveduras sobre meio de cultura solidificado.

Espécies	Extratos ^c	Filamentosos ^{a,b}					Leveduras ^{a,b}					
		M.g. LMGO 533	T.r. LMGO 4218	M.c. LMGO 02	M.c. LMGO 22	T.m. LMGO 1931	C.a. ATCC 10231	C.p. ATCC 22019	C.p. LMGO 05	C.g. LMGO 44	C.k. LMGO 174	C.g. LMGO L1
<i>Andira surinamensis</i>	Ma	19	24	35	-	22	-	-	-	-	-	-
	Mm	18	20	25	-	11	-	-	-	-	-	-
	Ca	25	29	55	11	22	14,5	14,7	14	11,2	17	22
	Cm	18	16	27	11	10	-	12	9	-	13	7
<i>Bagassa guianensis</i>	Ca	20	14	12	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Dicorynia guianensis</i>	Ca	17	15	19	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Manilkara paraensis</i>	Aa	18	14	22	-	-	-	21,7	-	-	-	-
	Ca	14	9	33	-	-	11,5	15,7	10	-	12	7
	Cm	-	19	12	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Peltogyne</i> sp.	Ma	17	12	17	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Qualea rosea</i>	Ma	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CEa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Sextonia rubra</i>	Ma	16	21	24	8	13	-	-	-	-	12	7
	Cl	14	15	-	9	8	-	-	-	-	-	8
	Clm	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Ca	18	20	23	-	13	-	-	-	-	-	-
<i>Tabebuia serratifolia</i>	Ma	22	27	35	9	27	-	11,7	14	-	14	28
	Mm	22	29	33	9	21	-	1	15	-	10	24
<i>Vouacapoua americana</i>	Mm	19	17	21	-	11	-	-	-	-	-	-
	CEm	19	22	25	-	17	-	11,5	-	-	-	-

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

^b « - » significa que não foi observada zona de inibição.

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

Os extratos que apresentaram zonas de inibição sobre os fungos filamentosos e leveduras ao mesmo tempo são :

- os extratos acetato de etila e metanólico da casca de *A. surinamensis*,
- os extratos acetato de etila e metanólico da madeira de *T. serratifolia*,
- o extrato acetato de etila do cerne interno + externo de *M. paraensis*.

Os resultados obtidos neste teste nos permitiram confirmar que os compostos ativos em fungos lignívoros podem ser igualmente ativos em fungos patogênicos para o homem. Com efeito, de 20 extratos testados, 17 (85%) são capazes de inibir o crescimento de fungos dermatófitos. Um número menor de extratos apresentou atividade nas leveduras testadas. Esses resultados confirmam a hipótese segundo a qual a durabilidade natural da madeira constitui um bom critério de escolha para a pesquisa de novos compostos com atividade antifúngica.

É interessante notar a baixa proporção de extratos ativos sobre as leveduras patogênicas. Foi demonstrado em seguida (ver teste de Concentração Inibitória Mínima, tabela 15) que certas leveduras, como *Candida albicans* ATCC10231, são pouco sensíveis nas condições deste teste, e os mesmos extratos apresentaram resultados interessantes nos ensaios de microdiluição em meio de cultura líquido. Por conseguinte, em casos onde a cepa possa ser cultivada em meio líquido, os extratos deverão ser avaliados segundo o ensaio de microdiluição em detrimento à avaliação qualitativa de suas atividades.

Os resultados do teste de determinação da concentração inibidora mínima (CIM) dos extratos foram significativamente diferentes dos obtidos pelo método de perfuração em ágar (tabela 15). Com efeito, os extratos mostraram, de forma geral, uma melhor atividade fungicida frente a leveduras patogênicas em comparação aos resultados anteriores, sobretudo os extratos metanólicos da madeira e do cerne externo de *V. americana* e o extrato acetato de etila da madeira de *Peltogyne* sp ; o que demonstra que o método de perfuração não é o teste mais adaptado para a medida da atividade antifúngica de algumas leveduras patogênicas.

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

Espécies	Extratos ^a	Filamentosos ^b			Leveduras ^b					
		M.g. LMGO 10	M.c. LMGO 22	T.r. LMGO 4218	C.a. ATCC 10231	C.a. LMGO 102	C.p. ATCC 22019	C.g. LMGO 44	C.k. LMGO 174	C.g. LMGO L1
<i>Andira surinamensis</i>	Ma	16	125	250	> 500	> 500	62	> 500	31	125
	Mm	>500	>500	500	> 500	> 500	>500	> 500	62	>500
	Ca	62	>500	62	250	> 500	>500	> 500	62	125
	Cm	>500	>500	125	62	62	>500	125	500	>500
<i>Bagassa guianensis</i>	Ca	62	>500	> 500	> 500	> 500	>500	> 500	250	>500
<i>Dicorynia guianensis</i>	Ca	250	>500	250	250	> 500	250	15,6	125	250
<i>Manilkara paraensis</i>	Aa	125	>500	250	> 500	> 500	500	62	250	500
	Ca	>500	>500	> 500	> 500	> 500	>500	> 500	500	>500
	Cm	62	>500	> 500	> 500	> 500	500	> 500	>500	>500
<i>Peltogyne</i> sp.	Ma	500	125	62	31	16	125	8	62	62
<i>Qualea rosea</i>	Ma	125	>500	> 500	> 500	> 500	>500	> 500	125	500
	CEa	250	>500	-	-	-	>500	-	250	500
<i>Sextonia rubra</i>	Ma	16	125	250	3,9	250	250	8	16	500
	Cl	500	125	31	125	> 500	>500	> 500	62	250
	Clm	125	500	500	> 500	> 500	>500	> 500	250	>500
	Ca	125	500	250	500	> 500	500	> 500	125	125
<i>Tabebuia serratifolia</i>	Ma	>500	125	250	250	250	500	> 500	62	125
	Mm	>500	250	> 500	> 500	> 500	250	> 500	125	62
<i>Vouacapoua americana</i>	Mm	>500	>500	31	16	31	16	4	8	31
	CEm	>500	125	31	16	31	8	8	31	62
Fluconazol		16	>64	32	1	>64	4	8	>64	16
Itraconazol		0,25	16	0,5	0,5	>16	0,25	0,5	16	2

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

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

Não há consenso na literatura para o estabelecimento de um valor limite de CIM para a classificação de um extrato como ativo ou não. Alguns autores consideram que um valor de $1000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ é interessante (Webster *et al.*, 2008), enquanto outros adotam $500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ como valor limite (Aligiannis *et al.*, 2001). Neste estudo, tendo em vista o grande número de extratos ativos, foi estabelecido como valor limite, $125 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Todos os extratos apresentaram atividade em pelo menos uma das cepas testadas, exceto os extratos acetato de etila da madeira de *M. paraensis* e do cerne externo de *Q. rosea*.

O extrato acetato de etila da madeira de *S. rubra* é bastante ativo em leveduras *C. albicans* ATCC 10231 (4 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), *C. glabrata* LMGO 44 (8 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) e *C. krusei* LMGO 174 (16 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) e moderadamente ativo em os fungos dermatófitos *M. gypseum* LMGO 10 (62 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) e *M. canis* LMGO 22 (125 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). O extrato acetato de etila do cerne interno desta espécie é menos ativo que o extrato da madeira, indicando que a atividade antifúngica se encontra, ou no alburno ou, mais provavelmente, no cerne externo (Royer, 2008).

Os extratos metanólicos de *V. americana* apresentaram valores de CIM compreendidos entre 4 e 62 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ em todas as cepas de leveduras patogênicas testadas. Esses dois extratos são particularmente ativos em as cepas de *C. albicans* e *Candida* não - *albicans*, e mesmo sobre os isolados clínicos (cepas resistentes LMGO). Por exemplo, o extrato metanólico da madeira de *V. americana* apresentou valores de CIM em *C. krusei* LMGO 174 (8 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), em *C. glabrata* LMGO 44 (4 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) e em *C. albicans* LMGO 102 (31 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), inferiores aos valores do medicamento referência fluconazol (>64, 8 e >64 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ respectivamente para as três cepas). Nenhuma atividade biológica dessa espécie havia sido reportada anteriormente sobre cepas de *Candida* e os metabólitos contidos neste extrato mostraram ser muito interessantes para a pesquisa de novos tratamentos contra as candidoses.

O extrato acetato de etila da madeira de *Peltogyne* sp. é ativo sobre todas as cepas testadas exceto *M. gypseum* LMGO 10. Ele apresentou a melhor atividade inibidora do crescimento de *C. albicans* LMGO 102, com uma valor de CIM de 16 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. O peltoginol e os análogos do mopanol foram isolados previamente de espécies do gênero *Peltogyne* (De Almeida *et al.*, 1974 ; Malan *et al.*, 1974). Entretanto, como se deu com *V. americana*, nenhuma atividade biológica dos metabólitos secundários obtidos deste gênero havia sido reportada anteriormente.

Já o extrato acetato de etila da madeira de *A. surinamensis* apresentou uma atividade interessante principalmente em *M. gypseum* LMGO 10 (CIM = 16 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) e *C. krusei* LMGO 174 (CIM = 31 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). A atividade antifúngica dos extratos de casca de *A. surinamensis* e *A. inermis* já haviam sido descritas anteriormente por Freixa *et al.* (1998) mas os constituintes ativos dessas espécies não haviam sido isolados.

III Fracionamento biomonitorado de *Sextonia rubra*

III.1 Isolamento dos metabólitos secundários antifúngicos

O fracionamento biomonitorado do extrato acetato de etila da madeira de *S. rubra* nos permitiu isolar uma mistura equimolar de dois compostos antifúngicos, muito semelhantes e inseparáveis por cromatografia líquida. Esses dois compostos **1** e **2** puderam ser identificados por RMN a partir da mistura. Correspondem ao rubrenolideo e ao rubrínolideo (figura 55). Após a identificação desses compostos, pudemos encontrar na literatura que eles haviam sido isolados da mesma espécie (denominada na época *Nectandra rubra*) (Franca *et al.*, 1977); a atividade biológica de ambos os compostos não havia sido descrita anteriormente. Entretanto, já era conhecido o método de separação por precipitação do acetileno em presença do nitrato de prata (Thijs *et al.*, 2004). Foi possível então se obter separadamente os compostos **1** e **2** utilizando-se esse método, e por espectrometria de ressonância magnética nuclear foi possível confirmar a identificação destas duas substâncias.

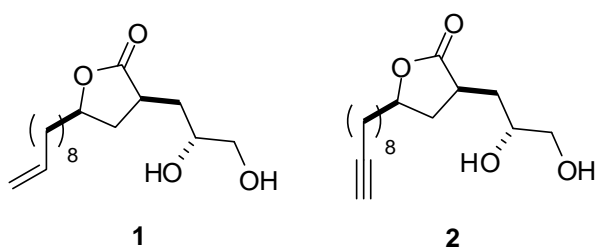


Figura 55 – Rubrenolideo (1) e rubrínolideo (2) isolados do extrato acetato de etila da madeira de *S. rubra*.

Essas duas lactonas são os principais compostos do extrato acetato de etila da madeira de *S. rubra*. A massa desses dois compostos (misturados) corresponde

aproximadamente a 1% da massa do material vegetal, sendo que as duas substâncias são provavelmente as responsáveis pela durabilidade natural da espécie.

III.2 Potencial antifúngico de rubrenolideo e rubrínolideo

A atividade antifúngica de rubrenolideo (**1**) e rubrínolideo (**2**) foram avaliadas em nove cepas de fungos dermatófitos filamentosos e sete leveduras (tabela 16). Além disso, estes compostos foram testados em células tumorais KB (ATCC) (Storm *et al.*, 1995).

Tabela 16 – Valores de concentração inibitória mínima (CIM em $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) e citotoxicidade (IC_{50} em $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) do rubrenolideo (1) e do rubrínolideo (2).

Cepas	1	2	Itraconazol	Fluconazol
<i>M. gypseum</i> LMGO 10	16	32	0.25	16
<i>M. gypseum</i> LMGO 533	256	32	0.975	64
<i>M. canis</i> LMGO 22	128	64	16	>64
<i>M. canis</i> LMGO 02	16	32	16	>64
<i>T. rubrum</i> LMGO 4218	16	32	0.5	32
<i>T. rubrum</i> LMGO 06	8	32	0.125	4
<i>T. rubrum</i> LMGO 08	8	32	0.125	8
<i>T. mentagrophytes</i> LMGO 1931	64	>256	0.5	4
<i>T. mentagrophytes</i> LMGO 09	8	32	0.25	>64
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	64	128	0.5	1
<i>C. albicans</i> LMGO 102	16	32	>16	>64
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	32	128	0.25	4
<i>C. parapsilosis</i> LMGO 05	32	128	0.25	4
<i>C. glabrata</i> LMGO 44	4	32	0.5	8
<i>C. krusei</i> LMGO 174	64	64	16	>64
<i>C. gattii</i> LMGO L1	256	128	2	16
KB (IC_{50} , $\mu\text{g}/\text{mL}$)	15	15		

Observamos que os compostos **1** e **2** são ativos em todas as cepas testadas, sendo que o rubrenolideo é em média ligeiramente mais ativo que rubrínolideo. Em seis das dezesseis cepas testadas, observa-se que o rubrenolideo é mais ativo do que o fluconazol.

Além disso, os índices terapêuticos de rubrínolideo e rubrenolideo foram estimados *in vitro*, medindo-se sua citotoxicidade sobre células tumorais KB. Ambos os compostos mostraram uma concentração citotóxica (IC_{50}), de $15 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ($50 \mu\text{M}$) (tabela 16). Essa

concentração é equivalente à concentração registrada como antifúngica para estes dois compostos. Este valor indica que a seletividade de **1** e **2** sobre as células fúngicas provavelmente poderia ser melhorada por meio de modificações estruturais nessas duas moléculas. Por outro lado, dados da literatura mostram que o fluconazol e o itraconazol são citotóxicas contra células HeLa nas concentrações respectivas de 137 e 5 μM (42 e 3,8 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), ambos os antifúngicos também são tóxicos frente a células Hvr100-6 (Iida *et al.*, 2001). Da mesma maneira, a anfotericina B, padrão ouro para a terapia de infecções fúngicas resistentes, é altamente citotóxica e é melhor tolerada em formulação liposomal. Com efeito, verificou-se que a anfotericina B liposomal possui a mesma atividade antifúngica que a anfotericina B livre, sendo menos tóxica, especialmente na zona de perfusão do medicamento e contra as células renais (Walsh *et al.*, 1999).

Por todas essas razões, os resultados sugerem que o rubrenolideo (**1**) poderia tornar-se uma base para modificações moleculares na busca por novos compostos antifúngicos. Além disso, a atividade antifúngica interessante observada para esta substância em fungos dermatófitos poderia encorajar a realização de bioensaios de aplicação tópica *in vivo*, onde os riscos de toxicidade potencial são menores. Por fim, como **1** também é ativo contra cepas de *Candida* quimioresistentes, e as candidíases localizadas e sistêmicas atualmente passaram a constituir um verdadeiro problema de saúde pública devido

- ao surgimento de cepas resistentes a drogas,
- à expressão de fatores de virulência por essas cepas,
- ao aumento do número de pacientes imunodeprimidos,

É possível que o estudo da atividade antifúngica por administração sistêmica de rubrenolideo possa ser realizado (Calderone & Fonzi, 2001, Vincent *et al.*, 1998).

III.3 Potencial termiticida do rubrenolideo e do rubrinolideo

Considerando que o extrato acetato de etila de *S. rubra* é fortemente termiticida e que, o rubrenolideo e rubrinolideo são os principais componentes deste extrato, também avaliamos a atividade dessas duas substâncias em cupins. Primeiramente, a toxicidade aos cupins *N. macrocephalus* foi medida pelo método « sem-escolha », em que os cupins foram

expostos a um disco impregnado com **1** e **2** durante 72 horas. Os resultados são mostrados na figura 56.

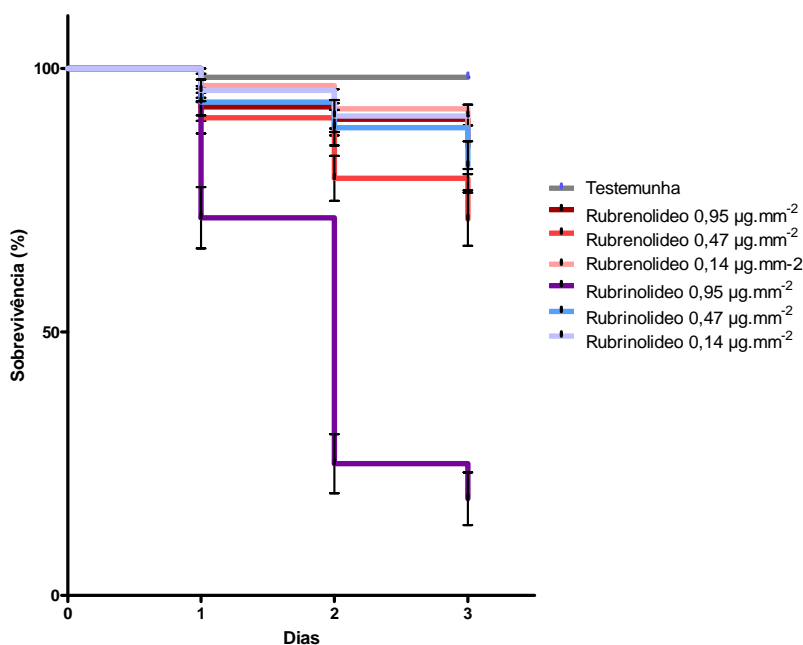


Figura 56 – Curva de sobrevivência em 3 dias dos cupins *N. macrocephalus* em contato com os discos tratados nas concentrações 0,14 ; 0,47 e 0,95 µg/mm² de rubrenolideo e rubrinolideo.

A taxa de sobrevivência dos operários ao final de três dias foi significativamente menor ($P < 0,0001$) após a exposição aos discos tratados com o composto **2** (rubrinolideo) na concentração de 0,95 µg.mm² em relação ao grupo testemunha. Os outros tratamentos não provocaram mortalidade significativamente elevada, indicando que o rubrinolideo (**2**) é o composto mais ativo.

Em uma segunda etapa, o potencial termiticida do composto **2** (rubrinolideo) foi avaliado utilizando-se o método de tratamento de superfície descrito no Capítulo 4, sobre blocos de pinho (página 121 !!). O teste foi realizado com *Reticulitermes flavipes*. O composto **2** foi utilizado para tratar a superfície de cinco blocos de ensaio, numa taxa de 8,4 µg.mm⁻² (ou g.m⁻²) e os dispositivos montados a partir desses blocos foram expostos ao ataque dos cupins, durante 8 semanas. A partir da 3ª semana de teste, os cupins se mostraram inativos. No final do teste, observou-se que a média de mortalidade de cupins foi

de 44% nos dispositivos de controle, o que valida as condições de ensaio exigidas pela EN 118 (de mortalidade inferior a 50% para os dispositivos de controle de virulência dos cupins).

Nos dispositivos tratados, observou-se 100% de mortalidade dos cupins após as 8 semanas do ensaio, o que confirma que este composto é tóxico para os cupins *R. flavipes*. Pela avaliação do nível de degradação, conforme descrito na página 123, três blocos obtiveram cotação 1 e dois cotação 2 (tentativa de ataque e ataque leve, respectivamente). Este resultado demonstra que o composto **2**, na concentração utilizada para o tratamento de superfície, tem um perfil de atividade muito semelhante à obtida com o extrato acetato de etila de *S. rubra* no lote F₃ (23,9 µg.mm⁻²), indicando que o rubrínolideo é mais ativo que o extrato bruto, e trata-se do responsável pela atividade termiticida do extrato acetato de etila da madeira de *S. rubra*.

IV Fracionamento biomonitorado do extrato de Andira surinamensis

IV.1 Isolamento e caracterização dos constituintes das frações antifúngicas

O extrato acetato de etila da madeira de *A. surinamensis* foi fracionado, em função da atividade antifúngica nos fungos filamentosos dermatófitos *M. canis* LMGO 22 e *T. rubrum* LMGO 4218. O primeiro fracionamento resultou em 13 frações e a atividade antifúngica foi observada nas frações de 3-5 e na fração 7. A partir de etapas sucessivas de refracionamento foi possível isolar sete compostos puros : três isoflavonóides (**3**, **6**, **7**), dois pterocarpanos (**4**, **5**), um benzofurano (**8**) e uma flavanona (**9**) (figura 57).

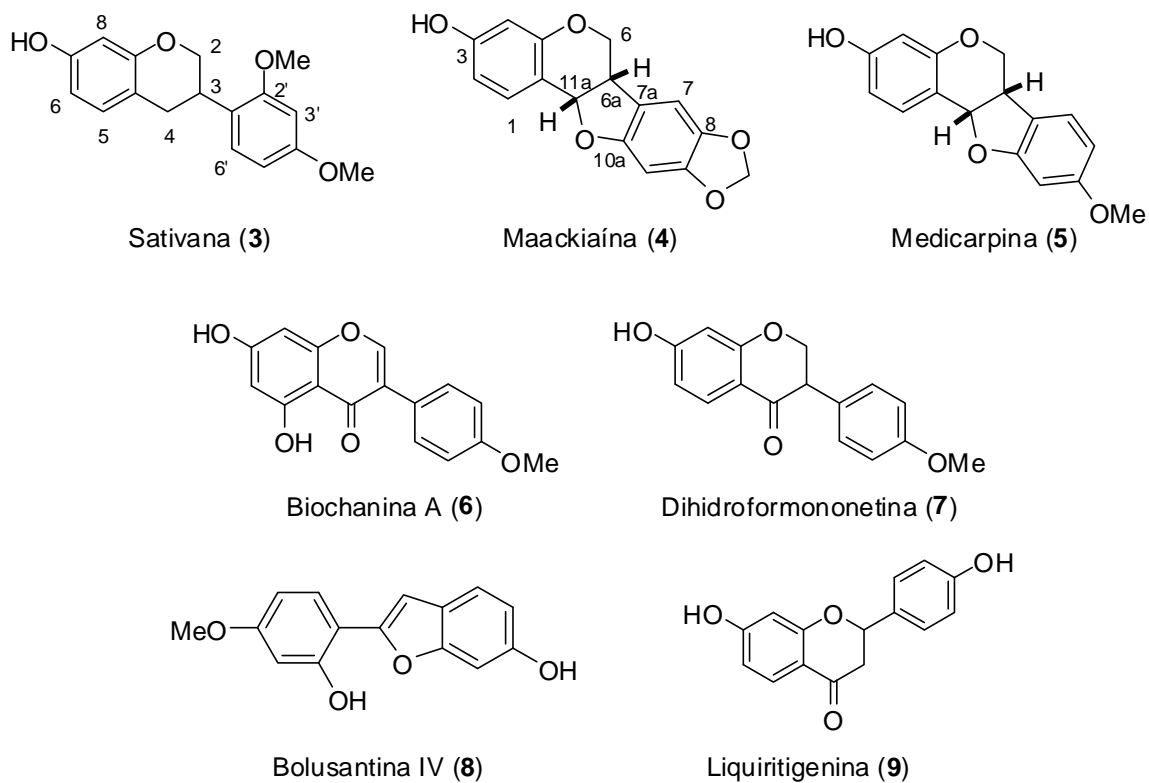


Figura 57 – Compostos isolados das frações ativas do extrato acetato de etila da madeira de *A. surinamensis*.

As moléculas **3** (4 mg, 0,01 %, $R_T = 13,5$ min), **4** (6,4 mg, 0,017 %, $R_T = 15,75$ min) e **5** (SM3-VI: 32 mg, 0,08 %, $R_T = 18,5$ min) puderam ser isoladas da fração 3 e os espectros RMN correspondentes são descritos nas tabelas 17, 18 e 19.

Tabela 17 – Deslocamentos químicos (δ) e acoplamentos homonucleares $^1\text{H} \rightarrow ^1\text{H}$ (COSY) e heteronucleares $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$ (HMBC) em CD_3OD para o composto 3.

Pos.	δ_c , mult.	δ_H (J em Hz)	COSY	HMBC
2 _{eq}	71.0, CH ₂	4.18 (ddd, J = 10.4, 3.4, 2.1, 1H)	2 _{ax} , 3, 4 _{eq}	3, 4
2 _{ax}		3.93 (t largo, J = 9.9, 1H)	2 _{eq}	
3	32.7, CH	3.45 (m, 1H)	2 _{eq} , 4 _{ax} , 4 _{eq}	
4 _{ax}	31.3, CH ₂	2.92 (dd, J = 15.5, 10.8, 1H)	3, 4 _{eq}	3, 4a, 8a, 1'
4 _{eq}		2.78 (ddd, J = 15.5, 5.3, 1.8, 1H)	2 _{eq} , 3, 4 _{ax} , 5	3, 4a, 8a, 1'
4a	114.5, C			
5	131.0, CH	6.87 (d largo, J = 8.2, 1H)	4 _{eq} , 6	4, 7, 8a
6	108.9, CH	6.31 (dd, J = 8.2, 2.4, 1H)	5, 8	8
7	157.4, C			
8	103.6, CH	6.22 (d, J = 2.4, 1H)	6	
8a	156.1, C			
1'	122.8, C			
2'	161.0, C			
3'	99.3, CH	6.55 (d, J = 2.4, 1H)	5'	
4'	159.3, CH			
5'	105.4, CH	6.47 (dd, J = 8.4, 2.4, 1H)	3', 6', 4'OMe	1'
6'	128.4, CH	7.04 (d, J = 8.4, 1H)	5'	3, 2', 4'
2'OCH ₃	55.6, CH ₃	3.78 (s, 3H)		2'
4'OCH ₃	55.7, CH ₃	3.83 (s, 3H)	5'	4'

Para o composto **3**, pode ser observada no espectro RMN ^1H , a presença de anéis aromáticos 1,2,4-trissubstituídos facilmente identificáveis graças às constantes de acoplamento e às correlações $^1\text{H}-^1\text{H}$ nos sistemas de spin a δ 6,22, 6,31 e 6,87 ppm de um lado, e a δ 6,55, 6,47 e 7,04 ppm do outro lado. Além disso, esse composto possui uma cadeia $\text{OCH}_2\text{-CH-CH}_2\text{-}$ a δ 3,93/4,18, 3,45 e 2,78/2,92 ppm. As constantes de acoplamento permitem atribuir sem ambiguidade as posições axial e equatorial de cada um dos sinais, sobretudo com uma constante de acoplamento 1,2-diaxial forte entre H-4_{ax} e H-3 (10,8 Hz) e uma outra grande constante de acoplamento vizinha de 9,9 Hz observável no sinal de H-2_{ax}.

A correlação fraca em COSY observada entre os prótons H-5 e H-4_{eq}, assim como as correlações $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ a longa distância principalmente entre H-5 e C-4 e entre H-6' e C-3 permitiram a reconstituição do esqueleto de uma isoflavana. Enfim, nós podemos observar a presença de dois grupamentos metoxila em RMN do ^1H com os deslocamentos químicos a δ 3,78 e 3,83 ppm integrando cada um para 3 prótons ; eles podem ser posicionados em C-2' e

C-5' principalmente graças a observação das correlações 3J ^1H - ^{13}C entre H-6' e C-2' e C-4'. Ainda, um grupamento hidroxila pode ser igualmente posicionado em 7 graças à observação de C-7 a δ 157,4 ppm e ao acoplamento com H-5. Dessa forma, em adequação com a literatura podemos afirmar que a molécula **3** corresponde a sativana (Miller *et al.*, 1989 ; Yoon *et al.*, 2004).

Tabela 18 – Deslocamentos químicos (δ) e acoplamentos homonucleares $^1\text{H} \rightarrow ^1\text{H}$ (COSY) e heteronucleares $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$ (HMBC) em CD_3OD para 4 e 5.

Pos.	4				5			
	$\delta_{\text{C,mult.}}$	$\delta_{\text{H}} (J \text{ em Hz})$	COSY	HMBC	$\delta_{\text{C,mult.}}$	$\delta_{\text{H}} (J \text{ em Hz})$	COSY	HMBC
1a	112.6, CH				112.9, C			
1	132.8, CH	7.26 (d, $J = 8.4$, 1H)	2	4, 7, 8a	133.2, CH	7.27 (d, $J = 8.4$, 1H)	2	4, 6, 7, 8, 8a
2	110.4, CH	6.48 (dd, $J = 8.4$, 2.4, 1H)	1, 4	4a, 8	110.7, CH	6.49 (dd, $J = 8.4$, 2.4, 1H)	1, 4	4a, 7, 8
3	159.8, C				160.1, C			
4	103.8, CH	6.30 (d, $J = 2.4$, 1H)	2	4a, 6	104.1, CH	6.31 (d, $J = 2.4$, 1H)	2	4a, 6, 7, 8a
4a	157.8, C				158.1, C			
6 _{ax}		3.56 (t, $J = 10.6$, 1H)	6 _{eq} , 6a	2, 1', 2'		3.50 (m, 1H)	6 _{eq}	
6 _{eq}	67.2, CH ₂	4.22 (ddd, $J = 10.6$, 4.6, 0.6, 1H)	6 _{ax} , 6a	3, 4, 8a, 1'	67.6, CH ₂	4.19 (m, 1H)	6a, 6 _{ax}	3, 4, 8a, 1'
6a	41.4, CH	3.47 (ddd largo, $J = 10.6$, 6.8, 4.7, 1H)	6 _{eq} , 6 _{ax} , 11a	2, 1', 2'	40.9, CH	3.48 (m, 1H)	11a	2, 1', 2', 6'
7a	119.5, C				120.9, C			
7	105.7, CH	6.80 (s largo, 1H)		3, 2', 4', 5'	125.9, CH	7.13 (d, $J = 8.2$, 1H)	8	3, 3', 2', 4'
8	142.8, C				107.3, CH	6.43 (dd, $J = 8.2$, 2.4, 1H)	7	3', 1', 4'
9	149.2, C				162.6, C			
10	93.9, CH	6.37 (s largo, 1H)		1', 2', 4', 5'	97.6, CH	6.37 (d, $J = 2.4$, 1H)		1', 2', 4', 5'
10a	155.3, C				162.0, C			
11a	79.8, CH	5.45 (d, $J = 6.8$, 1H)	6a	2, 4a, 5, 8a	80.1, CH	5.43 (d, $J = 6.3$, 1H)	6a	2, 3, 4a, 5, 8a, 1'
OCH ₂ O	102.3, CH ₂	5.85 (d, $J = 1.1$, 1H) 5.88 (d, $J = 1.1$, 1H)						
9OCH ₃					55.9, CH ₃	3.71 (s, 3H)		9

As moléculas **4** e **5** possuem espectros RMN muito semelhantes e relativamente parecidos ao composto **3** (Tabela 18). A presença de dois anéis aromáticos, um dos quais é hidroxilado em C-7, em **4** e **5** é determinada conforme descrito anteriormente para a sativane (posição C-7). O anel pirano é formado por uma cadeia-O-CH₂-CH-CH (-O)-, com deslocamentos químicos em δ 3,56 / 4,22, 3,47 e 5,45 ppm para **4** e δ 3,50 / 4,19, 3,48 e 5,43 ppm para **5**. Os compostos **4** e **5** diferem na região do segundo grupo aromático, o primeiro portando um anel aromático 1,2,4,5-tetrassubstituído, enquanto o segundo possui um grupo 1,2,4-trissubstituído. A ligação C-6a-C-7a pode ser facilmente verificada, e a principal questão é a estereoquímica relativa em torno do anel pirano e o fechamento ou não do anel C por uma ligação éter. As constantes de acoplamento observadas ao nível dos prótons H-6 do composto **4** nos ajudaram a identificar de forma inequívoca o próton H-6 axial, que possui acoplamento com seu vizinho H-6a, com uma constante de 10,6 Hz, sendo H-6a em posição axial. A observação de acoplamento de longa distância entre H-6_{eq} e H-11a (0,6 Hz) indica que H-11a é sem dúvidas uma posição equatorial (arranjo em W) em um sistema rígido. As interações NOE representadas na figura 58 confirmam a hipótese segundo a qual os dois prótons H-11a e H-6a são *cis*, e a comparação dos dados RMN de **4** e **5** com aqueles respectivamente, da maackiaína e da medicarpina, confirma que os dois compostos isolados nesta fração são exatamente os mesmos descritos na literatura (Maximo & Lourenço, 1998 ; Yoon *et al.*, 2004).

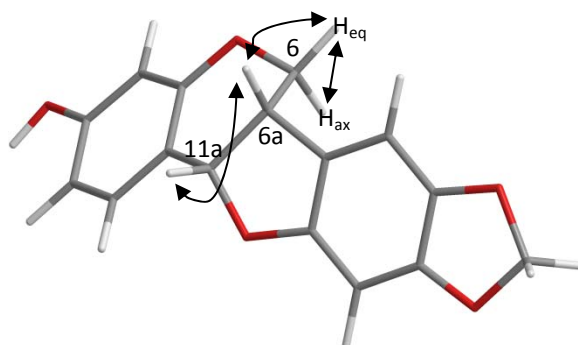
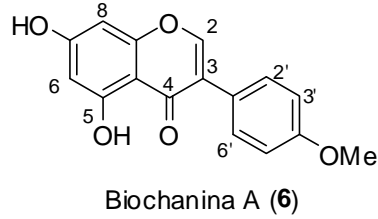
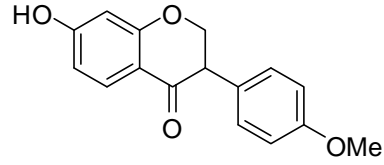


Figura 58 – Interações NOE importantes para a determinação da estrutura do composto **4**.

Para as frações **4** e **5**, foi observado que elas possuíam perfis semelhantes em CLAE e por esta razão foram reagrupadas antes de serem submetidas a uma nova etapa de purificação a partir da qual três compostos foram isolados : **6** (2 mg, 0,016 %, $R_T = 25,0$ min), **7** (0,6 mg, 0,0015 %, $R_T = 25,0$ min) e **8** (6,6 mg, 0,016 %, $R_T = 31$ min) (figuras 59 e 60).



Biochanina A (6)



Dihidroformononetina (7)

Figura 59 – Numeração dos átomos da biochanina A (6) e da dihidroformononetina (7).

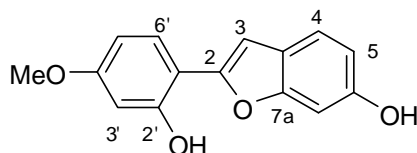
Tabela 19 – Deslocamentos químicos (δ) e acoplamentos homonucleares $^1\text{H} \rightarrow ^1\text{H}$ (COSY) e heteronucleares $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$ (HMBC) em CD_3OD para os compostos 6 e 7.

Pos.	6			7		
	δ_{C} , mult.	δ_{H} (J em Hz)	COSY HMBC	δ_{C} , mult.	δ_{H} (J em Hz)	COSY HMBC
2	154.7, CH	8.06 (s, 1H)	3, 4, 8a	72.8, CH ₂	4.50 (m, 3H)	3
3	124.2, C			?	3.76 (m superposto, 1H)	2
4	181.7, C			?		
4a	105.7, C			111.6, C		
5	163.6, C			130.0, CH	7.65 (d, J = 8.8, 1H)	6
6	100.5, CH	6.20 (d, J = 2.2, 1H)	8	115.5, CH	6.35 (dd, J = 8.8, 2.0, 1H)	5, 8
7	167.3, C			?		4a
8	95.0, CH	6.32 (d, J = 2.2, 1H)	6	104.5, CH	6.12 (d, J = 2.0, 1H)	6
8a	159.6, C		4a, 6, 7, 8a	?		4a, 6
1'	124.5, C			?		
2', 6'	131.2, CH	7.47 (d largo, J = 8.9, 2H)	3', 5'	130.5, CH	7.18 (d, J = 8.8, 2H)	3', 5'
3', 5'	114.7, CH	6.98 (d largo, J = 8.9, 2H)	2', 6'	114.9, CH	6.87 (d, J = 8.8, 2H)	2', 6'
4'	161.0, C		1', 3', 5', 4'	160.5, C		2', 6'
4'OCH ₃	55.6, CH ₃	3.83 (s, 3H)	4'	55.5, CH ₃	3.76 (s, 3H)	4'

As análises de RMN demonstraram que o composto **6** é uma isoflavona com uma dupla ligação entre C-2 e C-3 conjugada com um grupo carbonila, ele mesmo identificado graças ao acoplamento H-2 → C-4, induzindo um forte deslocamento sobre os campos fracos do próton vinílico H-2 (δ 8,06 ppm). O átomo de carbono C-3 porta um anel aromático dissubstituído *para*, enquanto o outro anel é 1,2,3,5-tetrassubstituído. Todos os átomos de carbono puderam ser atribuídos graças às correlações registradas das HMBCs, o que nos permitiu estabelecer, de acordo com a literatura, que a substância isolada tratava-se da biochanina A (Sturtz *et al.*, 2006)

Quanto ao composto **7**, como a quantidade isolada foi pequena e não foi possível a atribuição de todos os átomos de carbono. Entretanto, por analogia com a sativane (**3**) foi possível identificar a dihidroformononetina (Oliveira *et al.*, 1978). As duas principais diferenças entre os espectros de prótons da sativane e da dihidroformononetina são, por um lado, a presença na dihidroformononetina de um grupamento aromático dissubstituído *para* ao invés de um grupamento 1,2,4-trissubstituído, e, por outro lado, o desaparecimento de dois prótons H-4 da sativane substituídos pelo grupamento carbonila que não é detectado em nossa experiência HMBC. O grupamento metoxila pode ser localizado inequivocadamente, apesar do pequeno número de correlações visíveis em HMBC.

Para **8**, os espectros de RMN ^1H e COSY nos indicaram a presença de dois sistemas aromáticos a três spins. O primeiro compreende os prótons que ressonam a δ 7,31 (d, 8,4 Hz, 1H), 6,70 (dd, 8,3 e 2,2 Hz, 1H) e 6,89 (s, 1H), enquanto o segundo é constituído de prótons que ressonam a δ 6,49 (d, 2,5 Hz, 1H), 7,75 (d, 8,7 Hz, 1H) e 6,53 (dd, 8,7 Hz e 2,5 Hz, 1H). Este composto só contém prótons aromáticos e conta com 14 carbonos não equivalentes o que implica na presença de um sistema 6-2-6 que pode ser determinado como um esqueleto arilbenzofurano por análise das correlações $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$ em HMBC. Foi possível estabelecer de acordo com a literatura que esta molécula **8** trata-se da bolusantina IV (Erasto *et al.*, 2004).



Bolusantina IV (8)

Figura 60 – Numeração dos átomos da bolusantina IV (8).

Tabela 20 – Deslocamentos químicos (δ) e acoplamentos homonucleares $^1\text{H} \rightarrow ^1\text{H}$ (COSY) e heteronucleares $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$ (HMBC) em CD_3OD para 8.

Pos.	8		COSY	HMBC
	δ_{C} , mult.	δ_{H} (J em Hz)		
2	153.1, C			
3	104.2, CH	7.10 (d, J = 1.0, 1H)		2, 3a, 7a
3a	123.8, C			
4	121.2, CH	7.31 (d, J = 8.4, 1H)	5	6, 7a
5	112.3, CH	6.70 (dd, J = 8.3, 2.2, 1H)	4, 7	3a, 7
6	155.9, C			
7	98.0, CH	6.89 (s largo, 1H)	5	5, 7a
7a	155.8, C			
1'	112.4, C			
2'	156.6, C			
3'	102.2, CH	6.49 (d, J = 2.5, 1H)		1', 2', 4', 5'
4'	161.5, C			
5'	106.1, CH	6.53 (dd, J = 8.7, 2.5, 1H)	6'	1', 3'
6'	127.7, CH	7.75 (d, J = 8.7, 1H)	5'	2, 2', 4'
4'OCH ₃	55.4, CH ₃	3.79 (s, 3H)		4'

A análise RMN do composto **9** isolado da fração 7 (1,1 mg, 0,003%, 6,5 min) permitiu a determinação da estrutura de uma flavanona. Esse produto apresenta um CH₂ (H-3) a δ 3,03 (dd, 16,8 e 13,0 Hz, 1H) e 2,67 (dd, 16,8 e 2,8 Hz, 1H) ppm e um CH em α de um átomo de oxigênio a δ 5,36 ppm (dd, 13,0 e 2,8 Hz, 1H). Apesar da pequena quantidade de produto, foi possível determinar **9** como sendo a liquiritigenina, e as análises obtidas estão de acordo com aquelas da literatura (Lee *et al.*, 2009).

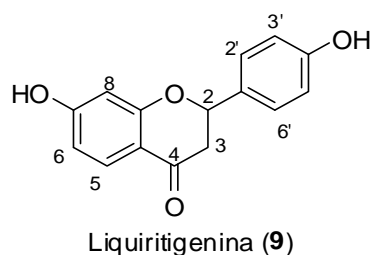


Figura 61 – Numeração dos átomos da liquiritigenina (9).

Tabela 21 – Deslocamentos químicos (δ) e acoplamentos homonucleares $^1\text{H} \rightarrow ^1\text{H}$ (COSY) e heteronucleares $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$ (HMBC) em CD_3OD para 9.

9				
Pos.	$\delta_{\text{C}}, \text{mult.}$	δ_{H} (J em Hz)	COSY	HMBC
2	80.8, CH	5.36 (dd, 13.0, 2.8, 1H)	3	
3 _{ax}	44.7, CH ₂	3.03 (dd, 16.8, 13.0, 1H)	2, 3 _{eq}	
3 _{eq}		2.67 (dd, 16.8, 2.8, 1H)	2, 3 _{ax}	
4	?			
4a	?			
5	129.5, CH	7.70 (d, 8.8, 1H)	8	
6	112.8, CH	6.45 (dd, 8.8, 2.2, 1H)		
7	?			
8	103.9, CH	6.29 (d, 2.4, 1H)	6, 7	
8a	?			
1'	?			
2', 6'	128.8, CH	7.33 (d, 8.4, 2H)	3'/5'	4'
3', 5'	116.0, CH	6.82 (d, 8.4, 2H)	2'/6'	2'/6'
4'	156.1, C			

IV.2 Estado da arte relativa às atividades biológicas dos compostos isolados

Os isoflavonóides como os pterocarpanos e as isoflavonas fazem parte do grupo das fitoalexinas ou fitoantecipinas, que são antibióticos de baixo peso molecular produzidos principalmente por espécies da família das Fabaceae (Aoki *et al.*, 2000). Eles são sintetizados pela via *de novo* por plantas superiores após o contato com micro-organismos relativamente pouco virulentos e para a proteção contra os raios UV (Dakora & Phillips, 1996). As substâncias são normalmente pouco tóxicas para as células de mamíferos e são descritas na

literatura por serem ativas em largo espectro contra bactérias e fungos patogênicos (Gordon *et al.*, 1980).

Segundo os dados publicados sobre o gênero *Andira*, as espécies mais frequentemente estudadas são *A. inermis* e *A. praxinifolia*. Os estudos fitoquímicos deste gênero mostraram a presença de isoflavonas, de flavonóides, de rotenóides e de 2-arilbenzofuranas (De Ugaz *et al.*, 1991 ; Kraft *et al.*, 2000 ; Kraft *et al.*, 2001 ; Silva *et al.*, 2006 ; Silva *et al.*, 2000). Entretanto, da espécie *A. surinamensis* já foram isolados um isoflavonóide dimérico, a surinamensina (De Almeida *et al.*, 2007), um triterpeno pentacíclico (lupeol) assim como quatro isoflavonas: biochanina A (**6**), 5,4'-dihidroxi-7-metoxiisoflavona (prunetina), 7,3'-dihidroxi-4'-metoxiisoflavona (calicosina) e 5,7,3'-trihidroxi-4'-metoxiisoflavona (pratenseína) (De Almeida *et al.*, 2007).

Neste estudo, o fracionamento biomonitorado do extrato de *A. surinamensis* nos permitiu identificar vários compostos conhecidos na literatura, mas novos para esta espécie, dos quais nós podemos citar em particular a sativane (**3**), ou 7-hidroxi-2',4'-dimetoxiisoflavana, isolada inicialmente de *Lotus* sp. (Stafford 1997), assim como duas pterocarpanas simples, a maackiaína (**4**) e a medicarpina (**5**), que haviam sido isoladas anteriormente de várias espécies de Fabaceae como *Medicago sativa* (a alfafa) e *Cicer arietinum* (grão-de-bico) (Jiménez-González *et al.*, 2008). Foi mostrado na literatura que a presença desses dois compostos **4** e **5** pode estar ligada a um aumento da resistência das raízes de *Pisum sativum* (ervilha) contra o parasita *Fusarium oxysporum*, um fungo fitopatógeno (Stevenson *et al.*, 1997). Esses compostos foram testados anteriormente em seis cepas de fungos zoopatogênicos e duas cepas de saprófitas. Os resultados mostraram que a (±)-sativane, a (±)-maackiaína e a (±)-medicarpina são ligeiramente ativas em *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* e *Trichophyton rubrum* (Gordon *et al.*, 1980).

A biochanina A (**6**) já foi isolada de *A. surinamensis* (De Almeida *et al.*, 2007), da soja e de várias espécies do gênero *Trifolium*. Esse composto, assim como outras isoflavonas simples, como a daidzeína, a genisteína e a formononetina estão entre as fitoalexinas frequentemente mais isoladas de Fabaceae (Dakora & Phillips, 1996). Este composto também mostrou uma atividade antifúngica sobre várias cepas de fungos patogênicos

(*Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Cercospora beticola*, *Monilinia fructicola* e *Cladosporium cladosporioides*) (Lopes *et al.*, 1999).

A dihidroformononetina (**7**) é uma isoflavanona que foi descrita como um dos produtos da metabolização da formononetina (Heinonen *et al.*, 2004 ; Pfitscher *et al.*, 2008).

A bolusantina IV (**8**) foi identificada anteriormente das espécies *Bolusanthus speciosus* e *Erythrina latissima* (Wanjala *et al.*, 2002). Esse composto demonstrou atividades antibacteriana e antifúngica moderadas (*Staphylococcus aureus* e *Candida mycoderma*) (Erasto *et al.*, 2004).

A liquiritigenina (**9**) é um precursor da biossíntese da daidzeína (uma isoflavona) (Kaimoyo & VanEtten, 2008 ; Veitch 2007). Esse composto possui uma atividade imunomoduladora ; capaz de estimular a produção de citocinas pelas células T CD4+ ativadas impedindo assim a disseminação de candidoses em camundongos. Segundo Falcão *et al.* (2005), a liquiritigenina é citotóxica a partir de 5 µg.ml⁻¹ em cinco linhagens de células tumorais humanas.

IV.3 Atividades antifúngicas dos compostos isolados das frações ativas

Foram medidos os valores de concentração inibitória mínima do crescimento de seis fungos patogênicos humanos para os compostos 3 a 6 e 8 isolados do extrato de *A. surinamensis* (*surinamensis* (

Tabela 22). Os produtos **7** e **9** foram isolados em pequena quantidade, não sendo possível analisar suas atividades antifúngicas.

Tabela 22 – Valores de concentração inibitória mínima (CIM em µg.ml⁻¹) dos compostos 3 a 6 e 8.

Cepas	3	4	5	6	8	itraconazol
<i>M. canis</i> LMGO 22	>16	>16	16	8	16	8
<i>T. rubrum</i> LMGO 06	8	8	4	0,25	4	<0,015
<i>T. mentagrophytes</i> LMGO 09	>16	>16	4	2	16	<0,015
<i>C. albicans</i> LMGO 102	4	4	8	4	>16	16
<i>C. parapsilosis</i> LMGO 05	1	1	4	0,5	16	0,062
<i>C. glabrata</i> LMGO 44	0,5	0,25	2	0,5	8	<0,015

As melhores atividades ($0,25 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) foram observadas para a maackiína (**4**) e para a biochanina A (**6**), respectivamente em *C. glabrata* LMGO 44 e *T. rubrum* LMGO 06. A cepa mais sensível neste teste foi *C. glabrata* LMGO 44, e a cepa mais resistente foi *M. canis* LMGO 22, sobre a qual a biochanina A (**6**) apresentou melhor valor de CIM em comparação ao itraconazol ($8 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Temos que destacar também que em *C. albicans* LMGO 102, um isolado clínico de *C. albicans*, os valores de CIM de todos os compostos, exceto para a bolusantina IV (**8**), são inferiores aos observados para o itraconazol ($16 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), o que parece indicar que esses isoflavonóides podem ser especificamente mais ativos sobre estes micro-organismos.

De forma geral, a biochanina A (**6**) é mais ativa que os outros compostos em todas as cepas testadas, o que confirma os dados obtidos da literatura (Dakora & Phillips, 1996 ; Lopes *et al.*, 1999). O grupamento carbonila em C-4 parece ser importante para a atividade antifúngica desses compostos. A estrutura arilbenzofurano (composto **8**) é claramente menos ativa que os isoflavonóides.

V Conclusão

O objetivo desta última parte do trabalho foi a de buscar compostos com atividade antifúngica utilizando como base as informações tecnológicas de durabilidade natural de madeiras tropicais. Nós pudemos observar que vários extratos apresentaram atividades antifúngicas importantes sobre fungos lignívoros e patogênicos humanos, indicando que o conhecimento da durabilidade de uma madeira frente a fungos formadores de podridão pode orientar de maneira eficaz a busca de novos compostos antifúngicos. Estes extratos de madeiras duráveis são por vezes mais ativos que os medicamentos de referência. Foi demonstrado que os fungos lignívoros e os agentes etiológicos de micoses humanas podem ser combatidos com os mesmos compostos.

A partir dos resultados de atividade biológica dos extratos, o fracionamento do extrato de *S. rubra* foi efetuado e nos permitiu o isolamento e a identificação de dois compostos, o rubrenolideo (**1**) e o rubrínolideo (**2**). Estes últimos foram relatados pela

primeira vez como os responsáveis da atividade antifúngica desse extrato. Ainda, o composto **2** apresentou uma atividade termiticida remarcável sobre *N. macrocephalus* e sobre *R. flavipes* e é o responsável pela resistência desta espécie contra cupins.

O isolamento de moléculas ativas do extrato de *A. surinamensis* nos permitiu caracterizar sete compostos já descritos anteriormente em outras Fabaceae ; os isoflavonóides de Fabaceae tratam-se de fitoalexinas cujo papel principal é a defesa contra micro-organismos patogênicos (bactérias e fungos) (Dakora & Philips, 1996).

Todos os compostos, exceto a biochanina A, foram isolados pela primeira vez de *A. surinamensis*. O potencial antifúngico foi demonstrado para as moléculas de **3** a **6** e **8** principalmente nas leveduras *Candida albicans*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis*. Para completar este estudo, seria necessário avaliar a citotoxicidade destas moléculas, assim como testar o potencial delas sobre uma gama maior de patógenos humanos.

Conclusão e perspectivas

No início desse estudo, foi questionada a utilização dos metabólitos secundários extraídos de remanescentes de madeiras de grande durabilidade natural da Guiana Francesa, a fim de atingir dois objetivos principais : o tratamento de outras madeiras não duráveis contra a degradação fúngica e os prejuízos causados por cupins, além da utilização desses metabólitos ativos como antifúngicos contra fungos patogênicos para o homem.

Primeiramente, foi demonstrado que para muitas espécies, é possível extrair das madeiras os compostos responsáveis por sua durabilidade natural. Os metabólitos mais ativos foram obtidos a partir do ipê (*Tabebuia serratifolia*), da tatajuba (*Bagassa guianensis*) e do louro gamela (*Sextonia rubra*) ; esta última é a terceira madeira mais explorada da Guiana Francesa. Os resultados desse trabalho nos permitiram estabelecer que as atividades antifúngicas e termiticidas dos extratos podem ser transferíveis sobre outras espécies exóticas não duráveis como a ucuúba (*Virola surinamensis*), ou temperadas como *F. sylvatica*. Atualmente, ensaios de formulação estão em curso afim de converter esses princípios ativos em produtos de preservação da madeira comercializáveis (formulações aquosas).

O extrato da madeira de *Bagassa guianensis*, o qual demonstrou ser o mais ativo como antifúngico, não foi selecionado para o estudo da proteção de madeiras temperadas devido ao fato de esta ser uma espécie relativamente rara em floresta. Entretanto, *B. guianensis* é uma espécie pioneira de crescimento rápido e, estudos de potencial de produção silvícola dessa espécie realizadas pela ONF da Guiana mostraram que os rendimentos em termos de produção de madeira em plantações de tatajuba são excelentes. Assim, os estudos de formulação a partir do extrato dessa espécie também estão em curso.

Outras espécies pouco exploradas são provavelmente muito interessantes em termos de atividade biológica de seus extratos, como por exemplo a espécie *Diospyros dichroa*, muito ativa como termiticida, e *Vouacapoua americana*, uma madeira que contém metabólitos fortemente antifúngicos. As atividades medidas neste trabalho podem ser consideradas como um argumento para a motivação da indústria madeireira para a coleta ou plantação destas espécies, diversificando assim as espécies abatidas nas parcelas de

exploração florestal. Além disso, o fracionamento químico desses extratos seria interessante para a identificação dos constituintes responsáveis pela atividade biológica.

Em conclusão, foi possível observar que alguns extratos apresentaram uma atividade antifúngica marcante, não somente em fungos lignívoros mas também em fungos patogênicos para o homem. Esses resultados confirmam a hipótese afirmada no início do estudo, de que a estratégia "bioinspirada" pode orientar a pesquisa por princípios ativos contra fungos dermatófitos e leveduras patogênicas.

Material e métodos

I Generalidades

As cepas de fungos lignívoros foram mantidas em meio de cultura sólido preparado a partir de extrato de malte (Bioblock, 40 g.l⁻¹) e ágar-ágar (Bioblock, 20 g.l⁻¹). Todos os experimentos foram realizados em capela de fluxo laminar vertical previamente irradiada por luz ultra-violeta. As cepas de fungos patogênicos dermatófitos e as leveduras foram mantidas em meio de cultura preparado a partir de ágar-ágar e dextrose batata (Bioblock, 39 g.l⁻¹). Os testes de microdiluição foram realizados em placas de 96 poços, com fundo em "V". Utilizou-se o meio sintético RPMI-1640 (Bioblock, 8 g.l⁻¹) com glutamina, sem bicarbonato e com o vermelho fenol como indicador de pH.

Para os fracionamentos, usamos cromatografia em coluna de gel de sílica (Merck® tamanho 60 (0,063-0,2 mm)). Os solventes utilizados como eluentes foram: hexano, diclorometano e acetato de etila (VWR, qualidade de extração, destilados) e metanol (VWR, grau analítico). As cromatografias em camada delgada (CCD) foram realizadas em placas cromatográficas de sílica gel Merck® AL CCD 60F₂₅₄. As placas foram reveladas com ácido fosfomolibdico 5% em etanol. As purificações por cromatografia líquida (CLAE) foram realizadas com um equipamento Waters® (bomba Waters 600 e detector de absorção de UV Waters 2487 em dois comprimentos de onda). As cromatografias líquidas de alta eficiência (CLAE) analíticas foram realizadas com equipamento Waters® (bomba Waters 600 e detector

barreta de diodo (DDA) 2996 e ELSD Waters 2424). Foi utilizada uma coluna de fase reversa C18 (Supelco C18 Discovery® 15 cm x 4,6 mm, 5 µm e pré-coluna correspondente) para análise. A coluna de fase reversa C18 preparativa (Supelco C18 Discovery® HS 15 cm x 21,2 mm, 5 µm e pré-coluna correspondente) foi utilizada para as purificações. As identificações foram feitas por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN Varian® 400 MR). Os espectros de prótons foram registrados em 400 MHz e os espectros de carbono em 100,6 MHz. Nas descrições dos espectros de RMN, *s* significa singlete, *d* dubleto, *t* tripleto, *q* quadrupeto, *m* multipeto. As constantes de acoplamento (*J*) são medidos em Hz (Hertz) e os deslocamentos químicos são medidos em ppm (partes por milhão), tomando como referência o deslocamento químico de tetrametilsilano.

II Extração

II.1 Coleta e identificação das plantas

Ocorreram duas séries de coletas de plantas: em julho de 2007 e outubro de 2008. Na primeira coleta, uma pequena quantidade (cerca de 300 g) de folhas, casca, alborno e cerne de dezenove espécies foram coletados (tabela 23).

Tabela 23 – Espécies coletadas em julho de 2007, na primeira saída de campo.

Nome científico	Família
<i>Andira surinamensis</i> (Bondt) Splitgerber	Fabaceae
<i>Apeiba petoumo</i> Aubl.	Tiliaceae
<i>Bagassa guianensis</i> Aubl.	Moraceae
<i>Bocoa prouacensis</i> Aubl.	Fabaceae
<i>Dicorynia guianensis</i> Amsh.	Fabaceae
<i>Diospyros dichroa</i> Sandw.	Ebenaceae
<i>Diploptropis purpurea</i> (Rich.) Amsh.	Fabaceae
<i>Dipteryx odorata</i> (Aublet) Willd	Fabaceae
<i>Eperua falcata</i> Aubl.	Fabaceae
<i>Goupia glabra</i> Aubl.	Celastraceae
<i>Hymenolobium flavum</i> Kleinh.	Fabaceae
<i>Manilkara paraensis</i> (Huber) Standl.	Sapotaceae
<i>Ormosia flava</i> (Ducke) Rudd.	Fabaceae
<i>Peltogyne</i> sp.	Fabaceae
<i>Qualea rosea</i> Aubl.	Vochysiaceae
<i>Sextonia rubra</i> (Mez) van der Werff	Lauraceae
<i>Tabebuia serratifolia</i> (Vahl) Nichols.	Bignoniaceae
<i>Vouacapoua americana</i> Aubl.	Fabaceae

Durante a segunda saída de campo, foram coletados aproximadamente 30 kg da madeira do caule de oito espécies (*Andira surinamensis*, *Bagassa guianensis*, *Manilkara huberi*, *Qualea rosea*, *Tabebuia serratifolia*, *Vouacapoua americana*, *Sextonia rubra* e *Goupia glabra*) e 10 kg de casca do caule de outras duas espécies (*Peltogyne* sp. e *Dicorynia guianensis*).

O material vegetal foi coletado em parcelas de exploração florestal administradas pela ONF na comunidade de Régina na Guiana Francesa. Para cada espécie coletada, foi feita uma exsicata, que foi depositada no Herbário da Guiana – IRD (CAY) – onde a identificação das espécies foi verificada pela Dr. Sophie Gonzalez e Dr. Marie-Françoise Prevost.

O material vegetal foi seco em uma sala climatizada por duas semanas e, em seguida, pulverizado com um moinho de facas. Nos casos em que não foi possível separar as diferentes partes do caule (alburno, cerne interno e externo), estas, juntas, submetidas ao processo de extração.

Os caules provenientes da coleta de 2008, foram separados em apenas cascas e madeira do caule que foram reduzidas à serragem por uma plaina.

II.2 Extração

A extração das espécies coletadas em 2007 foi feita a partir de 100 g de pó de cada uma das partes estudadas, por maceração com acetato de etila (3 x 300 ml) e metanol (2 x 300 ml) por 48 horas. As soluções extrativas foram recuperadas por filtração e, em seguida, evaporadas à vácuo a 30°C num evaporador rotativo. Os extratos obtidos de cada parte de cada espécie foram armazenados em frascos sob refrigeração a 2 C. Esses extratos foram utilizados nos testes de prospecção das atividades termiticida e antifúngica (ver Capítulo 2, página 68).

A serragem do material vegetal (5-10 kg), obtida a partir das espécies coletadas em 2008, foi extraída com acetato de etila e metanol (1-3 l, uma vez) por maceração a frio durante 24 horas. A evaporação das soluções extrativas foi conduzida nas mesmas condições, como descrito anteriormente. Os rendimentos de extração das espécies coletadas em 2008 estão apresentados na tabela 24. Estes extratos foram utilizados nos testes de transferência de resistência à degradação por cupins e fungos (ver capítulos 3 e 4, respectivamente, nas páginas 86 e 114).

Tabela 24 – Rendimento de extração das espécies.

Espécies	Órgão	Rendimento (%)	
		Acetato de etila	Metanol
<i>Tabebuia serratifolia</i>	M ^a	- ^c	9,40%
<i>Manilkara huberi</i>	M	-	5,40%
<i>Vouacapoua americana</i>	M	-	8,40%
<i>Qualea rosea</i>	M	-	0,80%
<i>Dicorynia guianensis</i>	C ^b	-	0,90%
<i>Sextonia rubra</i>	M	3,30%	-
<i>Bagassa guianensis</i>	M	-	2,70%
<i>Goupia glabra</i>	M	-	2,90%
<i>Peltogyne</i> sp.	C	-	3,10%
	M	-	5,80%

^a M : madeira do caule, ^b C : Casca do caule

^c Extração não realizada

III Atividade antifúngica

III.1 Fungos lignívoros

Dois micro-organismos foram usados: *Pycnoporus sanguineus* L. (Murrill) 270 (CTFT) e *Gloeophyllum trabeum* (Pers.) Murrill BAM PCV 109, cedidos pela unidade de pesquisa UR 40 CIRAD, Madeiras Tropicais, Montpellier. Para executar os testes, uma subcultura de cada cepa foi preparada em uma placa de Petri contendo meio de cultura estéril, incubada por pelo menos duas semanas. A atividade dos extratos foi verificada nestes fungos lignívoros por dois métodos: perfuração em ágar e índice de atividade antifúngica (ver capítulo 2, p.68).

III.2 Fungos patógenos humanos - dermatófitos e leveduras

As cepas de fungos ATCC e isolados clínicos – dermatófitos *Microsporum gypseum* (M.g. LMGO 10 e M.g. LMGO 533), *Microsporum canis* (M.c. LMGO 02 et M.c. LMGO 22), *Trichophyton rubrum* (T.r. LMGO 06, T.r. LMGO 08 e T.r. LMGO 4218) e *Trichophyton mentagrophytes* (T.m. LMGO 09 e T.m. LMGO 1931), e leveduras *Candida albicans* (C.a. ATCC 10231 e C.a. LMGO 102), *Candida parapsilosis* (C.p. ATCC 22019 e C.p. LMGO 05), *Candida*

glabrata (C.g. LMGO 44), *Candida krusei* (C.k. LMGO 174) e *Cryptococcus gattii* (C.g. LMGO L1) foram cedidas pelo Laboratório de Micologia da Universidade Federal de Goiás (LMGO), Brasil. Os fungos isolados clínicos provêm de pacientes do Hospital da Universidade. Para executar os testes, uma subcultura de cada cepa foi preparada em uma placa de Petri contendo meio de cultura estéril, incubado por pelo menos cinco dias. A atividade dos extratos foi verificada nestes fungos patogênicos humanos por dois métodos: teste de perfuração em ágar e microdiluição em meio líquido (ver Capítulo 5, página 128).

III.3 Teste de perfuração em ágar

Para medir a sensibilidade das cepas de fungos lignívoros ou fungos dermatófitos e leveduras à presença dos extratos, foi utilizada uma versão ligeiramente modificada do método de perfuração em ágar descrito em Karou *et al.* (2006).

As soluções de meio de cultura foram preparadas com água destilada e, dependendo da cepa utilizada : com uma mistura de extrato de malte / ágar para os fungos lignívoros ou dextrose de batata / ágar para os fungos dermatófitos. Essas soluções foram então autoclavadas (20 min, 121°C) e distribuídas em placas de Petri de 14 cm de diâmetro (50 ml de meio de cultura por placa).

Em seguida, uma suspensão de micélio de cada cepa foi preparada vertendo-se 100 µl de água destilada estéril diretamente sobre o micélio em uma placa de Petri. As partes visíveis do micélio foram suspensas na água estéril mecanicamente. Cada suspensão foi ajustada para o padrão de turbidez McFarland 2 e depois distribuída uniformemente em toda a superfície de uma placa de Petri de 140 milímetros de diâmetro, contendo o meio de cultura puro e estéril. O excesso de água sobre o meio de cultura foi evaporado em uma capela sob o fluxo laminar. Cinco cavidades de 6 mm de diâmetro foram feitas utilizando-se uma cânula de vidro esterilizada sobre os meios de cultura sólidos nas placas. Na cavidade central de cada placa foram colocados 50 µl de DMSO puro estéril, usado como um controle negativo em nossos testes.

Os extratos a serem testados foram diluídos em DMSO estéril para se obter uma concentração de $100 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Esta solução (50 μl) foi depositada na cavidade perfurada no meio de cultura, e as placas foram incubados a $32 \text{ }^\circ\text{C}$, até que o crescimento dos fungos permitisse a medida visual de uma zona de inibição em torno de cada cavidade. A atividade antifúngica de cada extrato foi avaliada com base na presença ou ausência de halos de inibição do crescimento. Estes halos foram medidos com uma régua milimetrada, em quatro direções considerando-se como medida final o menor diâmetro. Cada amostra foi testada em duplicata.

Os resultados para os fungos lignívoros são apresentados na tabela 5 (página 77) e para os fungos dermatófitos e leveduras na tabela 14 (página 131).

III.4 Índice de atividade antifúngica em fungos lignívoros

A fim de medir quantitativamente a atividade dos extratos selecionados a partir dos resultados obtidos no teste de perfuração em ágar, foi utilizada uma versão modificada do método descrito por Schulz *et al.* (1990), para determinação do índice de atividade antifúngica

Cada amostra de extrato foi pesada e diluída em DMSO (1% v/v final) para a obtenção de uma solução de $100 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Um volume de 0,06 ml desta solução foi diluído em meio de cultura (malte/ágar, conforme descrito acima) ainda quente, para a obtenção de 6 ml de uma solução a 1 mg/ml. Em seguida, 3 ml desta solução foram colocados em uma placa de Petri estéril de 35 mm de diâmetro e os 3 ml restantes foram diluídos em 3 ml de meio para a obtenção de uma solução pura de 500 mg/ml. Este processo foi repetido até a obtenção das concentrações de extrato de 1000, 500 e 250 mg/ml, equivalentes à 0,1; 0,05 e 0,025% (m/m) em massa do meio de cultura. Para cada concentração, as placas de Petri foram preparadas em triplicata.

Três controles negativos idênticos foram preparados diluindo-se DMSO (30 μl) em 3 ml de meio de cultura (1% do volume final). O controle positivo foi preparado com o

antifúngico clortalonil diluído em meio de cultura, conforme descrito para os extratos, a fim de obter uma gama de concentrações de 62 a 1,5 mg/ml.

Após a solidificação, as placas preparadas com as soluções de extratos foram inoculadas com um fragmento quadrado de micélio (6 mm de lado) dos fungos lignívoros (*Gloeophyllum trabeum* e *Pycnoporus sanguineus*). As placas de Petri inoculadas foram incubadas a 32°C.

O crescimento radial do fungo foi verificado diariamente por medição do diâmetro do micélio até o momento em que toda a superfície do meio de cultura das placas controle negativo fosse "coberta" pelo micélio. Ou seja, até que o micélio dos fungos das placas controle negativo atingisse o diâmetro da placa (35 mm). Nos casos em que os micélios apresentaram crescimento irregular, a medida considerada foi a média entre as três placas preparadas para um mesmo extrato.

O índice de atividade antifúngica foi calculado como sendo a medida do crescimento relativo entre as placas teste e as placas controle negativo. Esse índice foi calculado por meio da equação 1

$$IA = \left[1 - \frac{(Da - 6)}{(Db - 6)} \right] * 100 \quad (\text{eq. 1})$$

onde: IA é o índice de atividade antifúngica (em%), D_a é o diâmetro do micélio nas placas teste (6 é a medida do inóculo introduzido no início dos testes, em mm) e D_b é o diâmetro do micélio nas placas controle negativos (quando a placa está totalmente coberta pelo micélio, que é igual a 35 mm).

Um IA de 0% indica que o extrato é inativo na concentração testada, e um IA de 100% indica que o extrato inibiu completamente o crescimento do fungo. O IA_{50} (concentração em que $IA = 50\%$, expressa $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) para cada amostra foi calculado através de uma representação gráfica dos IA observados para cada concentração utilizada (ver tabela 25).

Tabela 25 – Índices de atividade antifúngica (IA) sobre *G. trabeum* e *P. sanguineus* nas concentrações de extratos 1000, 500 e 250 µg.ml⁻¹, e IA₅₀ (concentração de extrato correspondente ao índice de atividade antifúngica de 50%).

Espécie	Extrato ^{a,b}	<i>P. sanguineus</i>				<i>G. trabeum</i>			
		1000 µg.ml ⁻¹	500 µg.ml ⁻¹	250 µg.ml ⁻¹	IA ₅₀	1000 µg.ml ⁻¹	500 µg.ml ⁻¹	250 µg.ml ⁻¹	IA ₅₀
<i>A. surinamensis</i>	Ca	100%	79%	79%	>1000	78%	52%	48%	808
	Ma	48%	31%	17%	>1000	63%	30%	11%	>1000
	Mm	45%	34%	24%	<250	48%	15%	0%	378
	Cm	41%	28%	17%	>1000	26%	15%	0%	>1000
<i>B. guianensis</i>	Ma	59%	48%	48%	587	86%	69%	55%	<250
	Ca	59%	45%	45%	691	11%	0%	0%	>1000
<i>D. guianensis</i>	Ca	38%	34%	24%	>1000	15%	0%	0%	>1000
<i>M. paraensis</i>	Aa	41%	0%	0%	>1000	62%	48%	45%	567
	Ma	59%	17%	0%	896	69%	55%	55%	<250
	Mm	52%	38%	21%	942	52%	45%	24%	883
<i>Petolgyne</i> sp.	Ma	34%	34%	0%	>1000	62%	52%	62%	422
<i>Q. rosea</i>	Ma	17%	17%	17%	>1000	52%	52%	45%	440
	CEa	21%	17%	0%	>1000	69%	69%	69%	<250
<i>S. rubra</i>	Cl a	86%	69%	55%	<250	72%	62%	59%	250
	Ma	79%	79%	62%	<250	69%	59%	55%	<250
	Cl m	17%	0%	0%	>1000	52%	52%	52%	1000
	Ca	72%	41%	28%	632	59%	26%	19%	862
<i>T. serratifolia</i>	Mm	41%	24%	17%	<250	79%	59%	55%	<250
	Ma	86%	66%	62%	>1000	81%	67%	52%	250
<i>V. americana</i>	Cl a	45%	0%	0%	>1000	55%	45%	-	>1000
	CEm	0%	0%	0%	>1000	15%	0%	0%	757
	Cl m	28%	28%	17%	>1000	19%	15%	15%	>1000
chlorothalonile					62				62

^a C = casca do caule, M = madeira (alburno+cerne), A = alburno, CE = cerne externo, CI = cerne interno

^b a = acetato de etila, m = metanol.

III.5 Teste de microdiluição em dermatófitos e leveduras

O teste de microdiluição visa determinar a concentração inibitória mínima (CIM) de uma amostra sobre o crescimento de cepas de fungos dermatófitos e leveduras em meio líquido. O método utilizado foi adaptado das normas NCCLS M38-A e M37-A2 (2002, Método de Referência para o teste de diluição em caldo para determinação da suscetibilidade de uma terapia antifúngica contra fungos filamentosos e leveduras, respectivamente).

A solução do meio de cultura RPMI é tamponada com ácido 3 – (*N*-morfolino) propano sulfônico (MOPS), na concentração de 0,165 mol.l⁻¹ para atingir um pH = 7,0. O meio tamponado é então filtrado em uma unidade de filtração estéril equipada com um filtro de porosidade de 0,22 µm.

Os fármacos antifúngicos, itraconazol e fluconazol utilizados como controle positivo neste teste foram diluídos sucessivamente para a obtenção de uma gama de concentrações entre 16 e 0,03 µg.ml⁻¹ (itraconazol) e 64 e 0,125 µg.ml⁻¹ (fluconazol). Primeiramente, os medicamentos, adquiridos em pó diretamente do fabricante, foram diluídos em água destilada estéril, no caso do itraconazol, para a obtenção de uma solução estoque de 320 µg.ml⁻¹ (20 vezes mais concentrada que a solução de teste inicial), e em DMSO, no caso do fluconazol, para a obtenção de uma solução estoque a 1280 µg.ml⁻¹. As soluções estoque foram diluídas a 5% (v/v) em RPMI sobre a placa de microdiluição para a obtenção das concentrações teste.

Os extratos foram diluídos em DMSO para a obtenção de uma solução a 100 mg.ml⁻¹. Essa solução foi diluída em RPMI estéril para a obtenção de uma gama de concentrações entre 500 e 0,98 µg.ml⁻¹ na placa de microdiluição. Todos os testes foram repetidos seis vezes em dois experimentos separados. Os testes que apresentaram resultados divergentes foram repetidos até que os valores fossem confiáveis.

As soluções estoque dos inóculos foram preparadas por meio da suspensão das partes visíveis dos micélios em água estéril. Todas as soluções estoque foram ajustadas para

o padrão de turbidez McFarland 2 e, em seguida, diluídas na proporção de 1:10 (v/v, dermatófitos filamentosos) ou 1:1000 (v/v, leveduras) em RPMI estéril.

Às placas de microdiluição contendo os extratos e os fármacos antifúngicos foram adicionadas as soluções de inóculo (100 µl) e incubadas a 32 °C. Os resultados foram observados após 5 dias para dermatófitos e após 2 dias para leveduras. O CIM foi determinado como a concentração correspondente ao último poço, onde o crescimento fúngico foi visivelmente nulo (no caso dos extratos) ou quando o crescimento fúngico atingiu um máximo de 20% do crescimento normal (no caso dos antifúngicos).

IV Atividade termiticida

IV.1 Cupins

Os cupins *Nasutitermes macrocephalus* foram utilizados nos testes « sem escolha » e « transferência de resistência à degradação por cupins », descritos respectivamente nos capítulos 2 (página 68) e 4 (página 114). A espécie *N. macrocephalus* foi identificada pelo Prof. Reginaldo Constantino do Laboratório de Termitologia da Universidade de Brasília (UnB), Brasil. Uma amostra com alguns indivíduos foi depositada na coleção de isoptera da UnB. A colônia de *N. macrocephalus* (atualmente com 3 anos) é mantida ao abrigo da luz, do lado externo do laboratório, onde os térmitas são regularmente alimentados com madeira. Somente os soldados e os operários do terceiro estágio de desenvolvimento são utilizados nos testes.

IV.2 Teste « sem escolha » sobre papel

A suscetibilidade dos térmitas à toxicidade dos extratos foi avaliada por um método adaptado de Harun e Labosky (1985). Foram utilizados discos de celulose de 31 mm de diâmetro como suporte para a aplicação dos extratos. Os discos foram tratados com os extratos da madeira (alburno, cerne externo e interno) das espécies coletadas, os quais foram diluídos em acetona para a obtenção de 3 concentrações calculadas para os tratamentos a 9,3 ; 5,6 e 1,9 $\mu\text{g}\cdot\text{mm}^{-2}$ em uma aplicação de 200 μl . Os discos foram evaporados durante 12 horas em temperatura ambiente. Acetona pura foi utilizada como controle negativo, e todos os testes foram repetidos três vezes.

Os discos tratados e os controles negativos foram colocados em placas de Petri de 35 mm de diâmetro. Vinte operários e quatro soldados da colônia de *N. macrocephalus* foram colocados em cada placa. Todos os discos foram umedecidos com 10 μl de água destilada. As placas de Petri foram mantidas ao abrigo da luminosidade à temperatura ambiente.

A mortalidade dos cupins foi verificada após 72 horas de contato com os discos tratados. A significância dos dados de mortalidade foi avaliada por uma análise de variância não paramétrica (Kruskal Wallis). O software XLSTAT® foi utilizado para essas análises. As taxas de mortalidade (em %) calculadas apenas sobre os operários estão listadas na tabela 26.

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

Espécies	Órgão ^a	9,3 $\mu\text{g}.\text{mm}^{-2}$		5,6 $\mu\text{g}.\text{mm}^{-2}$		1,9 $\mu\text{g}.\text{mm}^{-2}$	
		AcOEt	MeOH	AcOEt	MeOH	AcOEt	MeOH
<i>Andira surinamensis</i>	M	0 ±0	0 ±0	8 ±2,5	5 ±5	5 ±2,5	8 ±2,5
	A	10 ±0	23 ±7,5	0 ±0	0 ±0	0 ±0	5 ±2,5
<i>Apeiba petoumo</i>	CI	5 ±0	13 ±2,5	0 ±0	3 ±2,5	3 ±0	0 ±0
	CE	78 ±7,5	3 ±2,5	5 ±0	0 ±0	0 ±2,5	8 ±0
<i>Bagassa guianensis</i>	A+CE	65 ±30	68 ±32,5	20 ±5	8 ±2,5	8 ±2,5	13 ±10
	CI	38 ±22,5	93 ±7,5	5 ±5	3 ±2,5	3 ±0	0 ±2,5
<i>Bocoa prouacensis</i>	M	20 ±0	8 ±2,5	13 ±2,5	0 ±0	0 ±2,5	13 ±0
	A	5 ±0	3 ±2,5	0 ±0	25 ±5	25 ±0	0 ±0
<i>Dicorynia guianensis</i>	CE	13 ±2,5	0 ±0	0 ±0	20 ±10	20 ±0	0 ±2,5
	CI	5 ±0	0 ±0	0 ±0	5 ±0	5 ±0	0 ±5
<i>Diospyros dichroa</i>	M	100 ±0	100 ±0	100 ±0	15 ±0	15 ±0	100 ±0
<i>Diploptropis purpurea</i>	M	0 ±0	80 ±20	10 ±5	18 ±2,5	18 ±0	5 ±2,5
	A+CE	5 ±0	10 ±5	18 ±2,5	15 ±5	15 ±0	0 ±0
<i>Dipteryx odorata</i>	CI	10 ±0	13 ±2,5	0 ±0	0 ±0	0 ±0	5 ±7,5
	M	18 ±7,5	8 ±2,5	38 ±12,5	8 ±2,5	8 ±5	8 ±2,5
<i>Goupia glabra</i>	A+CE	100 ±0	95 ±5	100 ±0	63 ±37,5	63 ±0	20 ±7,5
	CI	100 ±0	100 ±0	100 ±0	100 ±0	100 ±0	100 ±0
<i>Hymenolobium flavum</i>	A+CE	5 ±0	10 ±0	15 ±0	0 ±0	0 ±0	5 ±0
	CI	98 ±2,5	10 ±0	8 ±2,5	5 ±0	5 ±2,5	13 ±10
<i>Manilkara paraensis</i>	A	18 ±2,5	90 ±10	3 ±2,5	5 ±0	5 ±0	0 ±0
	CE+CI	40 ±5	78 ±12,5	5 ±0	10 ±10	10 ±0	0 ±25
<i>Ormosia flava</i>	A	100 ±0	8 ±2,5	10 ±0	5 ±0	5 ±0	5 ±0
	CI	100 ±0	73 ±22,5	8 ±2,5	3 ±2,5	3 ±0	5 ±12,5
<i>Peltogyne sp.</i>	CE	100 ±0	90 ±10	10 ±0	23 ±2,5	23 ±2,5	8 ±7,5
	A+CE	83 ±12,5	25 ±5	10 ±0	8 ±2,5	8 ±2,5	13 ±7,5
<i>Qualea rosea</i>	CI	28 ±12,5	3 ±2,5	13 ±2,5	13 ±2,5	13 ±5	10 ±2,5
	A	30 ±10	65 ±35	10 ±5	5 ±0	5 ±2,5	3 ±2,5
<i>Sextonia rubra</i>	CE	5 ±0	88 ±12,5	23 ±2,5	38 ±12,5	38 ±2,5	3 ±10
	A+CE	0 ±0	3 ±2,5	25 ±0	63 ±12,5	63 ±0	5 ±2,5
<i>Tabebuia serratifolia</i>	A+CE	100 ±0	95 ±5	100 ±0	100 ±0	100 ±0	100 ±0
	CI	100 ±0	68 ±32,5	70 ±30	5 ±0	5 ±0	0 ±2,5
<i>Vouacapoua americana</i>	M	95 ±5	85 ±15	5 ±5	18 ±2,5	18 ±0	5 ±0
	A	5 ±0	13 ±2,5	20 ±15	25 ±0	25 ±0	0 ±2,5
<i>Vouacapoua americana</i>	CI	5 ±5	38 ±17,5	8 ±2,5	45 ±10	45 ±2,5	13 ±15
	CE	8 ±2,5	13 ±2,5	18 ±2,5	5 ±5	5 ±0	25 ±5
Controles		3 ±2,5			8 ±7,5		

^a M = madeira ou alburno+cerne, A = alburno, CI = cerne interno, CE = cerne externo.

V Transferência da resistência à degradação fúngica

V.1 Impregnação e ensaio de solo

Este ensaio nos permite determinar o intervalo de concentrações eficazes de um produto de tratamento em relação à microbiota do solo. O método utilizado foi adaptado da norma ASTM D2017/81 (86), da American Society for Testing and Materials (ASTM), método padronizado de ensaio acelerado de laboratório da resistência natural à degradação da madeira.

V.1.1 Preparação dos blocos de madeira

Os blocos de madeira foram cortados a partir do alburno de *Virola surinamensis* (Rol. Rottb ex.) Warb. (Myristicaceae, densidade de 0,5) e *Schefflera morototoni* (Aubl.) Maguire Steyerem. & Frodin (Araliaceae, densidade 0,45), nas dimensões de 20 × 20 × 5 mm (ver figura 62). A madeira utilizada para a confecção dos blocos é proveniente de um único indivíduo de cada espécie, a fim de limitar a variabilidade. Todos os blocos foram estabilizados em uma umidade relativa de 12% (umidade relativa do ar 65 ± 5%, 20°C). O plano de amostragem foi descrito na página 91.

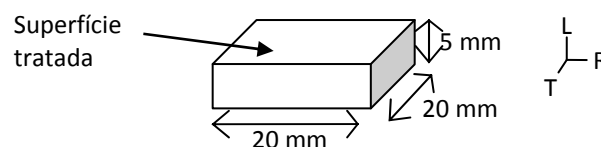


Figura 62 – Dimensões dos blocos de *Virola surinamensis* e *Schefflera morototoni*.

V.1.2 Impregnação de superfície dos blocos

Para a impregnação dos blocos, foram visados cinco taxas de retenção para cada extrato utilizado: 72,; 36,; 18,; 4,5 e 2,25 kg.m⁻³ para *S. morototoni* e 89,6 ; 44,8 ; 22,4 ; 5,6 e 2,8 kg.m⁻³ para *V. surinamensis*. Foram preparadas oito repetições para cada taxa de retenção.

O metanol (qualidade analítica) foi utilizado como solvente para a dissolução dos extratos metanólicos, e o acetato de etila (grau analítico) para dissolução do extrato acetato

de etila de *S. rubra*. Foram obtidas soluções de extrato nas concentrações 72; 36; 18; 4,5 e 2,25 mg.ml⁻¹ para impregnação dos blocos de *S. morototoni*, e nas concentrações 89,6; 44,8; 22,4; 5,6 e 2,8 mg.ml⁻¹ para os blocos de *V. surinamensis*.

Para todas as amostras de um mesmo lote (mesmo bloco de madeira impregnado e mesma taxa de retenção visada), foram preparados 2 ml de cada extrato. Frações de 200 µl foram depositadas sobre cada face transversal dos blocos de madeira, havendo um intervalo de 30 min entre o depósito de duas frações. Após o tratamento, os blocos passaram por secagem e estabilização em uma sala climatizada (umidade relativa do ar 65 ± 5%, 25 ± 3°C) durante 7 dias. A taxa de retenção final foi calculada utilizando-se a equação 2, correspondendo à quantidade de produto retido por unidade de volume.

$$TX = \frac{(m_F - m_I)}{v} \times 10^{-6} \quad (\text{eq. 2})$$

onde TX é a taxa de retenção (em mg.cm⁻³ ou kg.m⁻³), m_F é a massa final (em mg), m_I é a massa inicial (mg) e v é o volume de amostra (em mm³).

Para validar o método utilizado para esse teste, foram impregnados blocos de *V. surinamensis* e *S. morototoni* com os antifúngicos clortalonil e tebuconazol (Sigma Aldrich®), utilizados como controle positivo. Esses compostos foram dissolvidos em metanol para a obtenção de soluções nas concentrações 2,6 ; 1,3 e 0,65 mg.ml⁻¹ para a impregnação dos blocos *S. morototoni* e 2,75 ; 1,38 e 0,69 mg.ml⁻¹ para os blocos de *V. surinamensis* (Figura 63). As taxas de retenção visadas foram de 2,6 ; 1,3 e 0,65 kg.m⁻³ para *S. morototoni* e 2,75 ; 1,38 e 0,69 kg.m⁻³ para *V. surinamensis*.



Figura 63 – Tratamento dos blocos de *V. surinamensis* com o antifúngico tebuconazol.

Os resultados obtidos para as impregnações dos blocos de *V. surinamensis* e *S. morototoni* são apresentados nas tabelas 14 e 28.

Tabela 27 – Retenções médias (kg/m^3) \pm desvios padrão, para os blocos de *V. surinamensis* (lotes A₁ a A₇).

Lote	T1 (89,6 kg/m^3)	T2 (44,8 kg/m^3)	T3 (22,4 kg/m^3)	T4 (5,6 kg/m^3)	T5 (2,8 kg/m^3)
A1 (<i>A. surinamensis</i>)	83 \pm 2,3	45 \pm 1,1	24 \pm 1,1	3,5 \pm 1,5	0,1 \pm 1,7
A2 (<i>B. guianensis</i>)	91 \pm 2,5	49 \pm 0,8	29 \pm 1,3	2,8 \pm 0,6	1,6 \pm 0,2
A3 (<i>M. huberi</i>)	86 \pm 3,3	46 \pm 2,8	23 \pm 1,3	3,5 \pm 1,5	2,1 \pm 0,9
A4 (<i>Q. rosea</i>)	96 \pm 2,5	48 \pm 3,1	31 \pm 1,3	3,0 \pm 0,9	4,0 \pm 0,7
A5 (<i>T. serratifolia</i>)	89 \pm 2,4	42 \pm 2,3	25 \pm 1,7	2,0 \pm 1,0	0,4 \pm 0,3
A6 (<i>V. americana</i>)	72 \pm 3,8	42 \pm 1,5	21 \pm 1,1	2,0 \pm 0,5	0,9 \pm 0,4
A7 (<i>S. rubra</i>)	72 \pm 4,1	40 \pm 1,6	18 \pm 1,2	0,3 \pm 0,3	0 \pm 3,9

Tabela 28 – Retenções médias (kg/m^3) \pm desvios padrão, para os blocos de *S. morototoni* (lotes B₁ a B₇).

Lote	T1 (72 kg/m^3)	T2 (36 kg/m^3)	T3 (18 kg/m^3)	T4 (4,5 kg/m^3)	T5 (2,25 kg/m^3)
B1 (<i>A. surinamensis</i>)	75 \pm 2,4	38 \pm 1,7	21 \pm 1,2	2,3 \pm 1,0	2,6 \pm 0,7
B2 (<i>B. guianensis</i>)	76 \pm 1,8	45 \pm 1,5	23 \pm 2,2	2,7 \pm 0,4	1,2 \pm 0,6
B3 (<i>M. huberi</i>)	68 \pm 3,3	34 \pm 1,6	22 \pm 1,4	3,4 \pm 1,0	3,2 \pm 0,7
B4 (<i>Q. rosea</i>)	74 \pm 4,7	31 \pm 2,6	15 \pm 1,8	4,6 \pm 1,1	1,7 \pm 0,9
B5 (<i>T. serratifolia</i>)	77 \pm 2,3	42 \pm 2,1	25 \pm 1,1	2,9 \pm 1,4	1,6 \pm 0,8
B6 (<i>V. americana</i>)	62 \pm 2,9	35 \pm 1,9	21 \pm 1	2,8 \pm 0,3	2,2 \pm 0,8
B7 (<i>S. rubra</i>)	56 \pm 1,9	29 \pm 2,4	12 \pm 2,1	3,0 \pm 0,6	1,9 \pm 0,7

V.1.3 Preparação do solo

A terra foi coletada em uma área florestal localizada a 5 km da área urbana de Cayenne. A terra foi retirada entre 5 e 20 cm de profundidade (horizon A0) e peneirada com uma peneira de malha 12,5 mm x 12,5 mm.

Uma porção de 20 g de solo foi seca em estufa a 103°C por 48 horas para o cálculo do teor de umidade inicial, de acordo com a equação 3:

$$TH = \frac{m_H - m_a}{m_a} * 100 \quad (\text{eq. 3})$$

onde : TH é o teor de umidade (em %); m_H é massa úmida do solo antes da estufa (em g) e m_a é a massa seca do solo, após a passagem na estufa (em g).

Para determinar a quantidade de água necessária para umedecer o solo no início dos testes, é necessário determinar inicialmente a capacidade de retenção de água no solo. Para o cálculo da retenção de água, uma amostra de 200 g de solo foi pesada e uma pequena quantidade de água foi adicionada até que o solo ficasse visualmente bem molhado. Depois de duas horas de repouso, o excesso de água foi removido sob vácuo em um Büchner e pesados (m_1). O solo foi seco em estufa a 103°C por 48 horas ou até que a massa fosse constante (m_2). A capacidade de retenção de água foi calculada segundo a equação 4, pela média de três repetições.

$$CR = \frac{m_1 - m_2}{m_2} \times 100 \quad (\text{eq. 4})$$

onde : CR é a capacidade de retenção do solo (em %), m_1 é a massa do solo úmido (em g) e m_2 é a massa do solo depois da passagem em estufa.

A partir de CR, podemos determinar a quantidade de água necessária para que o solo utilizado no ensaio seja mantido a uma umidade de 95%, segundo a equação 5:

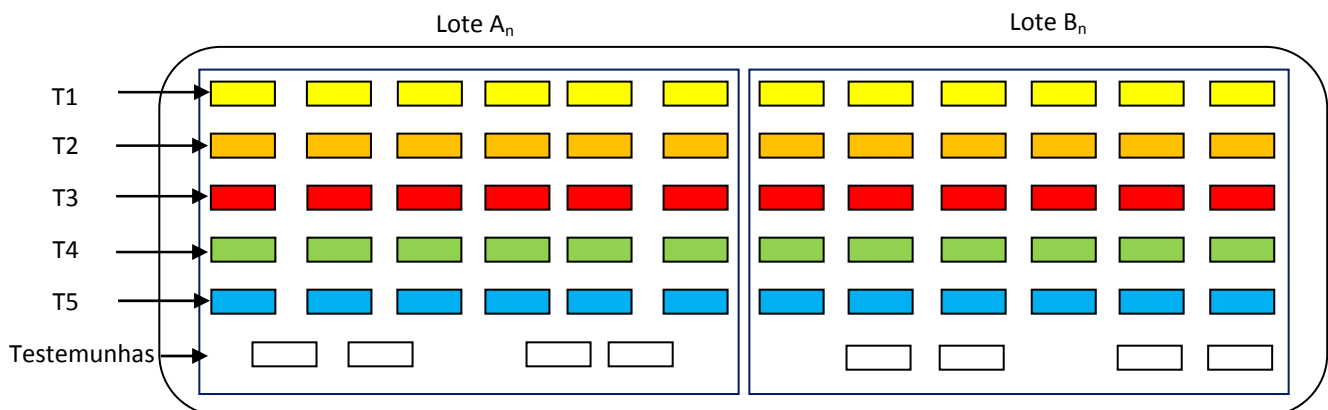
$$\text{Quantidade de água} = \frac{95 \times CR - TH}{100 + TH} \times 100 \quad (\text{eq. 5})$$

onde : CR é a capacidade de retenção de água (em %) e TH o teor de umidade (em %).

V.1.4 Exposição dos blocos tratados

Dez recipientes de solo foram preparados para receber 552 blocos de madeira tratados. Em cada um desses recipientes (volume 15 litros) foi introduzido 5 kg de areia branca e 12 kg de solo peneirado. Em seguida, foram adicionados 2 litros de água para manter a umidade do solo em 95%, ideal para favorecer a degradação da madeira.

Em cada recipiente, os lotes de teste $A_1 + B_1$, $A_2 + B_2$, ..., $A_{10} + B_{10}$ e os blocos utilizados como controle negativo do teste A_{10} e B_{10} foram depositados nos recipientes A_n e B_n (Esquema 1). Os blocos de madeira foram colocados na terra, deixando dois centímetros de distância entre eles. Todos os recipientes foram mantidos em uma sala de ensaios ($25\pm 5^\circ\text{C}$, $65\pm 5\%$ de umidade relativa do ar) durante 6 semanas. No final do período de exposição, os blocos foram coletados e cuidadosamente limpos para a remoção do solo residual e de fungos presentes na superfície. A degradação foi avaliada medindo-se a perda de dureza de cada bloco.



Esquema 1 – Resumo esquemático da organização dos blocos sobre solo com os lotes A_n e B_n , impregnados com um mesmo extrato.

V.1. 5 Medida de dureza dos blocos

A dureza das amostras foi medida utilizando-se um durômetro (Hardmatic HH-300[®], Mitotoyo, Japão). O indutor tem uma ponta esférica de $0,79 \pm 0,01$ mm de diâmetro. A dureza foi mensurada pela indentação dos blocos em quatro pontos sobre a superfície exposta ao solo (figura 64).

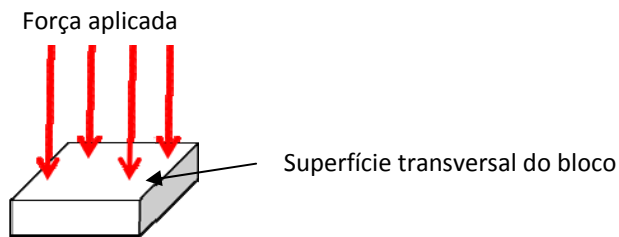


Figura 64 – Zonas de indentação para a medida da dureza.

A dureza inicial foi medida após a impregnação e estabilização dos blocos tratados em sala climatizada (25°C, umidade relativa do ar 70%). A umidade do solo foi mantida em 95% e, durante o período da exposição, os blocos de madeira foram saturados com água, o que altera a dureza intrínseca dos blocos. Para avaliar o impacto da umidade sobre a dureza dos dois blocos de cada lote de amostragem, estes foram testados, com o objetivo de calcular a perda de dureza devido ao aumento da umidade nas fibras da madeira. Para essas testemunhas de umidade, os dois blocos de cada lote foram expostos a um papel embebido de água, mantidos a 8°C. Após 7 dias, a dureza foi medida e o fator de correção (k) foi calculado segundo a equação 6.

(eq. 6)

onde : k é o factor de correção da dureza, D_{PSF} é a dureza dos blocos tratados após sete dias de exposição à água (PSF = ponto de saturação das fibras) e D_i a dureza inicial (pós-tratamento e equilíbrio).

A dureza de todos os blocos tratados e não tratados foi medida em dois momentos : após a impregnação e estabilização (T_0) e após seis semanas de exposição ao solo (T_F). O cálculo de perda de dureza (PD, em %) permite a comparação entre a dureza final dos blocos expostos à dureza inicial corrigida, segundo a equação 7

$$PD = \frac{(k \times D_i - D_F)}{k \times D_i} \times 100 \quad (\text{eq. 7})$$

onde : PD é a perda de dureza (em %), k é o fator correção da dureza, D_i é a dureza inicial (antes da exposição) e D_F dureza final (após a exposição).

A perda de dureza dos blocos de *V. surinamensis* e *S. morototoni* é apresentada na tabela 29.

Tabela 29 – Média das perdas de dureza e desvios padrão correspondentes, para os blocos de *V. surinamensis* (lotes A₁ a A₁₀) e *S. morototoni* (lotes B₁ a B₁₀).

Tratamento	<i>V. surinamensis</i> (lotes An)		<i>S. morototoni</i> (lotes Bn)	
	Perda de dureza	Desvio padrão	Perda de dureza	Desvio padrão
<i>A. surinamensis</i>	8,15%	6,38%	5,82%	4,01%
	19,58%	5,44%	4,99%	4,25%
	21,68%	10,29%	10,18%	5,16%
	15,71%	5,80%	15,09%	5,72%
	15,54%	4,46%	17,44%	12,75%
<i>B. guianensis</i>	-1,02%	1,88%	4,40%	6,41%
	5,84%	3,51%	4,36%	3,52%
	7,32%	5,77%	4,53%	4,99%
	15,24%	9,76%	10,26%	8,78%
	14,60%	10,94%	11,97%	5,29%
<i>M. huberi</i>	-1,06%	3,50%	17,83%	5,91%
	17,07%	5,92%	25,58%	4,96%
	19,62%	7,90%	23,08%	9,31%
	15,55%	4,48%	14,16%	3,94%
	19,41%	3,39%	23,19%	7,27%
<i>Q. rosea</i>	1,27%	2,74%	6,46%	2,31%
	3,49%	4,33%	4,70%	2,22%
	5,08%	5,50%	12,46%	3,43%
	11,39%	7,41%	16,90%	4,17%
	22,78%	6,91%	27,54%	8,36%
<i>T. serratifolia</i>	-1,39%	3,23%	3,70%	4,97%
	7,62%	6,80%	2,86%	3,80%
	10,76%	7,28%	9,93%	7,74%
	14,48%	7,39%	21,34%	6,23%
	14,78%	5,93%	17,67%	5,92%
<i>V. americana</i>	-1,05%	2,01%	5,42%	3,01%
	8,38%	6,65%	4,49%	4,63%
	16,49%	8,34%	12,82%	9,14%
	20,80%	8,25%	18,72%	5,79%
	11,85%	4,54%	18,26%	8,80%
<i>S. rubra</i>	8,20%	3,46%	2,34%	4,94%
	17,85%	4,80%	8,30%	4,98%
	23,59%	5,14%	10,40%	8,97%
	29,41%	4,77%	25,54%	3,40%
	24,90%	8,18%	36,16%	6,43%
clorotalonila	17,96%	6,48%	-2,03%	2,02%
	15,50%	9,67%	14,76%	10,20%
	-0,45%	3,39%	14,95%	6,47%
tebuconazol	9,31%	7,21%	2,35%	4,20%
	0,98%	3,68%	7,74%	6,75%
	1,37%	2,59%	7,31%	5,73%
controles negativos	25,39%	3,64%	23,07%	7,00%

V.2 Transferência da atividade fungicida, ensaio de eficácia de produtos de preservação

Este estudo foi realizado a partir de uma adaptação da norma EN 113 (Preservantes de madeira – Método de ensaio para determinação da eficácia de proteção frente à basidiomicetos – Determinação do limiar de eficácia) (Afnor, 1996a). O tamanho dos blocos de madeira foi modificado e a duração do teste foi reduzida a oito semanas, em relação ao método descrito na norma. O princípio desse teste constitui-se em expor os blocos de madeira ao ataque por basidiomicetos em meio ágar. A degradação das amostras é avaliada pelo percentual de perda de massa, o que nos permite determinar o intervalo de eficácia de cada extrato utilizado.

V.2.1 Preparação dos blocos e amostragem

O teste foi realizado em blocos cortados à partir do alburno de pinheiro (*Pinus sylvestris*) e de faia-europeia (*Fagus sylvatica*). Os blocos foram cortados nas seguintes dimensões: 30 (±5) mm x 10 (±5) mm x 5 (±0,5) mm (radial x tangencial x longitudinal). As amostras com defeitos, tais como a presença de nós e resina, ou bloco não cortado no sentido do fio da madeira ou com algum dano (rachaduras, descoloração, presença de vestígios de deterioração ou ataque de insetos) foram eliminadas. Os blocos selecionados foram mantidos em sala climatizada (20±2 °C e 65±5% de umidade relativa do ar) até atingirem peso constante. Após a passagem em estufa à 103 °C durante 18 h, as amostras foram pesadas para a determinação da umidade relativa de equilíbrio, de acordo com a equação 8.

$$HR = \frac{m_i - m_F}{m_F} \times 100 \quad (\text{eq. 8})$$

onde: HR é a umidade relativa de equilíbrio (em %), m_i é a massa inicial em equilíbrio (em g) e m_F a massa final (em g), após secagem em estufa.

A densidade média das amostras foi de 0,5 ($\pm 0,04$) $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ para o de pinheiro e 0,65 ($\pm 0,03$) $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ para a faia. O plano de amostragem está descrito na página 104.

V.2.2 Impregnação de amostras: tratamento à vácuo

Foram utilizados os extratos metanólicos de *A. surinamensis*, *T. serratifolia* e *Q. rosea*. Foram visadas cinco taxas de retenção para cada extrato utilizado: 60, 40, 20, 10 e 5 $\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$ para o pinheiro e 85,7 ; 57,14 ; 28,6 ; 14,29 e 7,1 $\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$ para a faia. As concentrações das soluções teste para a impregnação foram determinadas a partir das capacidades de retenção de metanol puro pelo alburno do pinheiro e pela madeira de faia, sendo 551 e 537 $\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$ respectivamente. Para a obtenção das taxas de retenção citadas acima, as soluções de extrato foram preparadas nas concentrações: 0,91 ; 1,81 ; 3,63 ; 7,26 e 10,89% em massa, para o tratamento do pinho e 1,3 ; 2,66 ; 5,32 ; 10,64 e 15,96% em massa para o tratamento da faia.

Para comparar o nível de eficácia demonstrada pelos extratos em relação a outro fungicida comercial, foram tratados lotes de blocos (C_4 e D_4) com um produto denominado referência, composto de uma mistura de propiconazol de 9,34 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ e tebuconazol 3 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ em solução aquosa. Foi testada a taxa de retenção de 12,6 $\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$ para o pinheiro e 6,32 $\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$ para a faia.

Para determinar a taxa de retenção de cada bloco, o tratamento foi realizado em estado anidro. Os blocos foram previamente pesados e secos em estufa a 103°C para a medida da massa seca.

O método de impregnação das amostras foi realizado de acordo com a norma EN 113 (Afnor, 1996a). Para cada extrato, cada concentração testada é considerada um tratamento independente. A impregnação é feita em ordem crescente de concentrações. Para cada tratamento, as amostras dos lotes de C_1 a C_4 e de D_1 a D_4 foram tratadas de acordo com as etapas:

- Uma camada de pérolas de vidro foi colocada no fundo de um recipiente de tratamento;
- os blocos foram colocados sobre a camada de pérolas de vidro;
- os blocos foram lastrados com um peso,
- o recipiente, contendo os blocos a serem impregnados, foi colocado sob a câmara de vácuo;
- o recipiente, contendo a solução de tratamento, foi colocado próximo à campânula, mergulhando-se o tubo de saída da câmara de vácuo (figura 65) ;
- o vácuo foi mantido a 7 mBar durante 10 min na câmara. Em seguida, 100 ml de solução de extrato foram introduzidos. O volume foi definido em função do volume dos blocos a serem recobertos pela solução de tratamento ;
- uma vez que o vácuo foi interrompido e a solução de extrato foi introduzida no recipiente de tratamento, os blocos foram deixados em contato com a solução de tratamento por 2 horas;
- após esse período, os blocos foram levemente secos com papel toalha para retirar o produto em excesso e pesados.

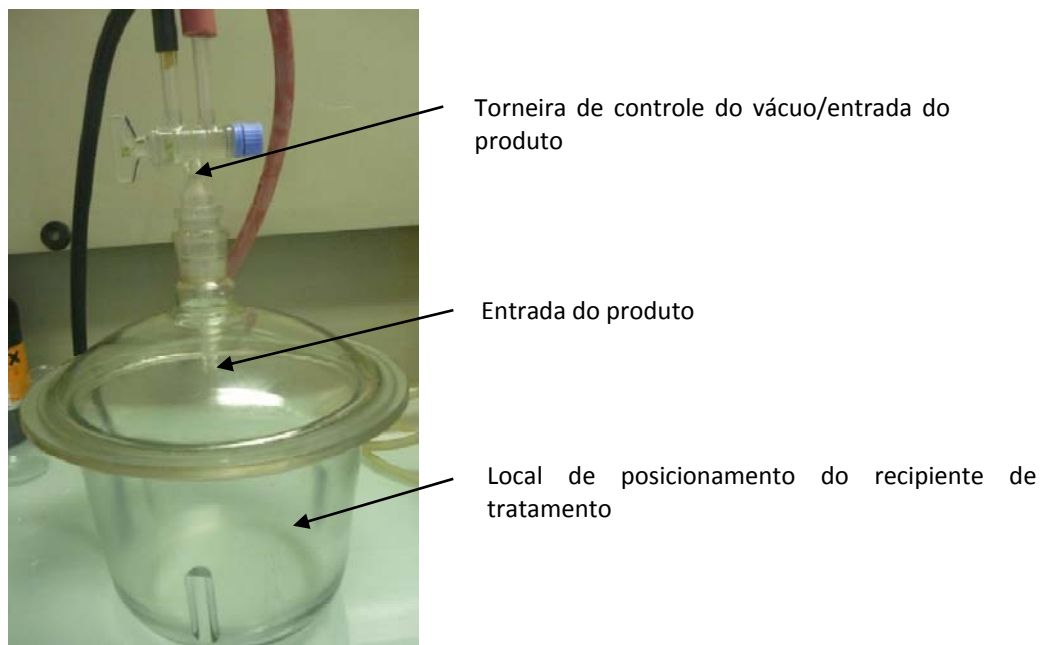


Figura 65 – Campânula utilizada para a impregnação dos extratos sobre os blocos de *P. sylvestris* e *F. sylvatica*.

A absorção (equação 9) e retenção (equação 10), os extratos foram calculados como segue:

$$A = m_1 - m_0 \quad (\text{eq. 9})$$

onde: A é a absorção do extrato (em g), m_1 é a massa molhada após a impregnação do bloco (modelo exemplar + solução de extrato, em g) e m_0 é o peso inicial do bloco em estado anidro (em g).

$$R = \frac{A \times C^\circ}{V} \times 10^3 \quad (\text{eq. 10})$$

onde : R é a taxa de retenção do extrato por unidade de volume de madeira (em kg.m^{-3}), C° é a concentração do extrato (em% m/m) e V o volume do bloco tratado (em cm^3).

As taxas de retenção obtidas para os lotes de C_1 a C_3 (pinheiro) e de D_1 a D_3 (blocos de faia) são apresentadas nas tabelas 30 e 31.

Tabela 30 – Retenções médias (kg.m^{-3}) e desvios padrão obtidos para os lotes C_1 a C_3 de *P. sylvestris*.

Lote de blocos	T1 (60 kg.m^{-3})	T2 (40 kg.m^{-3})	T3 (20 kg.m^{-3})	T4 (10 kg.m^{-3})	T5 (5 kg.m^{-3})
C_1	63±1,2	42,2±0,4	20,6±0,4	10,3±0,1	5,1±0,1
C_2	64,2 ±1,0	41,2±0,9	18,9±0,3	10,4±0,1	5,1±0,1
C_3	58±2,2	41,3±1,6	20,4±0,6	10,2±0,1	4,8±0,2

Tabela 31 – Retenções médias (kg.m^{-3}) e desvios padrão obtidos para os lotes D_1 a D_3 de *F. sylvatica*.

Lote de blocos	T1 (86 kg.m^{-3})	T2 (57 kg.m^{-3})	T3 (29 kg.m^{-3})	T4 (14 kg.m^{-3})	T5 (7 kg.m^{-3})
D_1	71,3±2,7	47,7±1,1	23,9±0,5	12,4±0,2	6,2±0,2
D_2	70,9 ±1,8	47,2±1,4	22,3±1,0	12,1±0,4	6,1±0,4
D_3	70,7±2,1	46,6±0,9	22,7±0,7	11,4±0,4	6,1±0,1

As amostras tratadas passaram por secagem em sala climatizada ($20\pm 2^\circ\text{C}$ e $65\pm 5\%$ de umidade relativa do ar) durante duas semanas (Figura 66). Para a determinação da massa seca das amostras tratadas antes do teste, quatro blocos tratados por lote e por taxa de retenção, foram secos em estufa a 103°C por 18 horas. A partir da determinação do teor de

umidade de equilíbrio de acordo com a equação 8, foi possível calcular a massa teórica anidra de todos os blocos (equação 11)

$$m_T = \frac{m_i}{(1 + HR)} \quad (\text{eq. 11})$$

onde : m_T é a massa seca teórica (em g), m_i é a massa inicial a 12% de umidade da madeira (em g) e HR a umidade relativa de equilíbrio dos blocos, calculada após secagem em estufa.

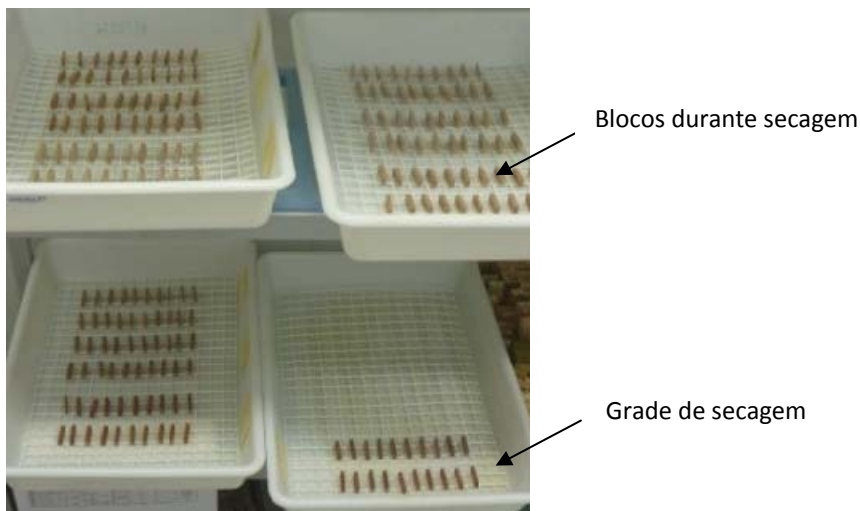


Figura 66 – Blocos de *P. sylvestris* impregnados com o extrato de *Q. rosea* durante a secagem em sala climatizada.

V.2.3 Fungos utilizados para a exposição dos blocos tratados

Trametes versicolor (Linnaeus) Quélet (CYB 863-A) é um fungo formador de podridão fibrosa em madeiras. É universalmente usado como espécie indicadora devido sua atividade lignívora e importância da sua distribuição geográfica.

Gloeophyllum trabeum (Pers.) Murrill é um fungo formador de podridão parda muito associado com as florestas de caducifólias e coníferas de clima temperado. Esse fungo despolimeriza a celulose e hemicelulose, deixando um rastro de lignina sob forma oxidada.

V.2.4 Degradação fúngica e avaliação de perda de massa

Após duas semanas de secagem em sala climatizada, todos os lotes de amostras foram esterilizados por radiação gama.

O meio de cultura ágar/malte foi preparado como descrito anteriormente em um frasco "Kolle" e, em seguida, foi inoculado com os fungos. Todas as etapas foram realizadas em condições estéreis para se evitar contaminação. Assim, quando o micélio se desenvolveu sobre toda a superfície do meio, foram colocados dois a dois, dez blocos tratados dos lotes de C₁ a C₅ e de D₁ a D₅, na presença de dois blocos não tratados dos lotes C₆ ou D₆. Os blocos não tratados permitem garantir a virulência do fungo nos frascos teste (figura 67).

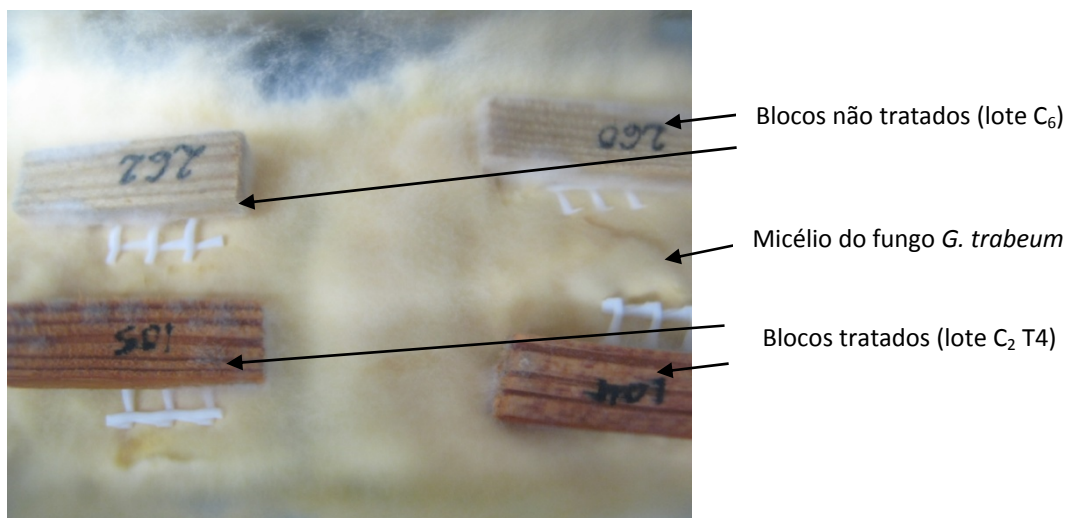


Figura 67 – Frasco de cultura de *G. trabeum* contendo blocos teste (dois tratados e dois não tratados).

Os dez blocos restantes aos lotes de C₁ a C₅ e de D₁ a D₅ foram postos em frascos não inoculados para a determinação do coeficiente de correção de perda de massa decorrente de outras causas, além da degradação fúngica (por exemplo, a difusão dos extratos no meio de cultura).

Os frascos foram armazenados em uma sala climatizada (22°C, 70% de umidade relativa do ar) no laboratório de Montpellier (CIRAD UR 40) durante um período de oito semanas.

Ao final do período de incubação, os blocos foram recuperados e o micélio residual foi retirado cuidadosamente. Em seguida, os blocos foram pesados, secados em estufa

(103°C) e pesados novamente. Foram obtidas assim as massas úmida e seca dos blocos após o contato com os fungos lignívoros.

A perda de massa devido à degradação foi calculada utilizando-se a equação 12

$$PM = \frac{m_T - m_F}{m_T} \quad (\text{eq. 12})$$

onde : PM é a perda de massa (em %), m_T é a massa seca teórica inicial (em g) e m_F a massa anidra final (em g).

Os valores de perda de massa foram corrigidos pelos fatores de correção, de acordo com a equação 13

$$PM_R = PM - PM_C \quad (\text{eq. 13})$$

onde: PM_R é a perda de massa real (devido apenas à degradação, em g), PM é a perda de massa das amostras incubadas (em g) e PM_C é a perda de massa dos blocos preparados para o cálculo de fator de correção (em g) incubados nos frascos preparados com o meio de cultura não inoculado.

A partir da perda de massa corrigida (PM_C), o índice de degradação de cada tratamento foi calculado segundo a equação 14

$$ID = \left(\frac{PM_C}{PM_T} \right) \cdot 100 \quad (\text{eq. 14})$$

onde : ID é o índice de degradação (em %) e PM_T é perda de massa média dos blocos não tratados utilizados como testemunhas nos frascos dos blocos tratados (em g).

Os índices de degradação obtidos após a exposição dos blocos de pinheiro e faia frente à degradação fúngica, respectivamente, por *G. trabeum* e *T. versicolor* são apresentados na tabela 32.

Tabela 32 – Índice de degradação e desvios-padrão correspondentes aos blocos de *P. sylvestris* (lotes C₁a C₆) e *F. sylvatica* (lotes D₁ a D₆).

Extratos	<i>P. sylvestris</i> (<i>G. trabeum</i>)			<i>F. sylvatica</i> (<i>T. versicolor</i>)		
	Lotes	Índice de degradação	Desvio padrão	Lotes	Índice de degradação	Desvio padrão
<i>A. surinamensis</i>	C ₂ T1	18%	12%	D1 T1	3%	3%
	C ₂ T2	32%	22%	D1 T2	4%	3%
	C ₂ T3	113%	20%	D1 T3	24%	20%
	C ₂ T4	67%	40%	D1 T4	17%	21%
	C ₂ T5	87%	30%	D1 T5	140%	30%
<i>Q. rosea</i>	C ₁ T1	12%	1%	D2 T1	2%	1%
	C ₁ T2	9%	4%	D2 T2	11%	8%
	C ₁ T3	6%	1%	D2 T3	62%	35%
	C ₁ T4	12%	3%	D2 T4	87%	35%
	C ₁ T5	72%	41%	D2 T5	63%	33%
<i>T. serratifolia</i>	C ₃ T1	9%	9%	D3 T1	7%	4%
	C ₃ T2	11%	8%	D3 T2	10%	5%
	C ₃ T3	25%	24%	D3 T3	22%	19%
	C ₃ T4	9%	2%	D3 T4	34%	28%
	C ₃ T5	8%	2%	D3 T5	41%	27%
Antifúngico	C ₅	52%	30%	D4	9%	3%
Controle solvente	C ₄	7%	1%	D5	124%	21%
Testemunha	C ₆	91%	63%	D6	104%	26%

V.3 Análise estatística

Os resultados obtidos para cada extrato em cada taxa de retenção nos dois ensaios (ensaio de solo e exposição a fungos lignívoros) foram analisados separadamente. Cada taxa de retenção de cada extrato foi considerada como um tratamento independente. Os valores de perda de dureza, perda de massa e índice de degradação aberrantes não foram considerados. Todos os valores foram comparados pelo teste *One way ANOVA* e o intervalo de confiança foi de 0,05. Todas as séries de medidas (relativas a um tratamento) foram comparadas entre si e com outros através de um teste de Tukey e Dunn bilateral. Os níveis de significância foram corrigidos por Bonferroni. Para as análises foi utilizado o software XLSTAT® ; os gráficos foram feitos com o software GraphPad Prism®.

VI Transferência de resistência à degradação por térmitas

VI.1 Impregnação e resistência induzida ao ataque de cupins

O método utilizado é uma versão modificada proposta por Barbosa *et al.* (2007).

VI.1.1 Cupins

Para realizar estes testes, foi utilizada a colônia de *Nasutitermes macrocephalus*, anteriormente descrita na página 167 (Atividade termiticida).

VI.1.2 Preparação dos blocos

Foram utilizados blocos de alburno de *Virola surinamensis*, e de madeira de *S. rubra* e *G. glabra*. Os blocos foram cortados nas dimensões: 20 x 20 x 5 mm (radial x tangencial x longitudinal), tal como descrito na página 170 (Preparação dos blocos de madeira). Os blocos também foram estabilizados a uma umidade de 12% antes do início dos testes (20°C±2 e 65±5% de umidade relativa do ar). O plano de amostragem é descrito na página 121.

VI.1.3 Impregnação dos blocos

Os extratos acetato de etila de *S. rubra* e metanólico de *G. glabra* foram dissolvidos em acetona (grau analítico) para a obtenção de 2 ml de solução nas concentrações de 7,5 ; 5 e 3,5 mg.ml⁻¹. Os blocos dos lotes E₁ e E₂ foram impregnados visando-se as taxas de retenção de 7,5, 5 e 3,5 kg.m⁻³.

Da mesma forma como descrito para a impregnação dos blocos de *V. surinamensis* e *S. morotoni* (página 170, Impregnação de superfície), dez frações de 200 µl de cada solução teste foram depositadas sobre as faces transversais dos blocos, com um intervalo de 30 minutos entre duas aplicações. Após o tratamento, os lotes de blocos tratados foram secos e estabilizados em sala climatizada (25±3°C, 65±5% de umidade relativa do ar) durante 7 dias. Em seguida, a taxa de retenção final foi calculada como a quantidade de produto retido por unidade de volume, segundo a equação 2 (página 171), após secagem.

Para calcular a massa teórica anidra dos blocos tratados, dois blocos dos lotes E₁ e E₂ foram pesados, secados em estufa (103°C) durante 18 horas e pesados novamente. O cálculo do teor de umidade de equilíbrio dos blocos tratados foi realizado de acordo com a equação 8 (página 178) e o cálculo da massa teórica anidra dos blocos tratados foi feito segundo a equação 11 (página 182). Os resultados estão detalhados na tabela 10 (Capítulo 4, página 118).

VI.1.4 Perda de massa dos blocos

Todos os blocos tratados e não tratados após secagem e estabilização foram dispostos em quadrado latino sobre um suporte de metal e expostos a um ataque direto sobre a colônia de *N. macrocephalus*. Considerou-se T₀ o momento onde foi detectada a presença de túneis em torno dos blocos expostos. A partir de T₀, os blocos permaneceram em contato com os cupins durante 15 dias. No final do teste, todos os blocos foram recuperados, limpos para a remoção de impurezas residuais e, em seguida, foram secos em estufa até atingirem massa constante. O nível de degradação das amostras foi avaliado a partir da perda de massa medido segundo a equação 12 (página 184). Os valores de perda de massa são mostrados na figura 51, página 120.

VI.2 Eficácia termiticida em tratamento de superfície

VI.2.1 Cupins

Os cupins utilizados neste experimento são criados em laboratório (CIRAD UR 40 – Montpellier), em sala climatizada a $27\pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa do ar acima de 75%. A espécie utilizada é *Reticulitermes flavipes*, recuperada da ilha de Oleron, na França.

VI.2.2 Preparação dos blocos

Os tratamentos foram aplicados sobre a superfície dos blocos de alburno de *Pinus sylvestris* de dimensão $50 (\pm 0,5 \text{ mm}) \times 50 (\pm 0,5 \text{ mm}) \times 10 (\pm 0,5 \text{ mm})$. Os blocos foram estabilizados em sala climatizada até atingirem peso constante ($20\pm 2^\circ\text{C}$ e umidade relativa do ar de $65\pm 5\%$).

Os blocos com traços de resina foram eliminados da amostragem. Apenas a maior superfície de um dos lados de cada bloco foi sujeita a tratamento (25 cm^2); as quatro faces laterais (figura 68) foram seladas com parafina para se evitar a impregnação das fibras.

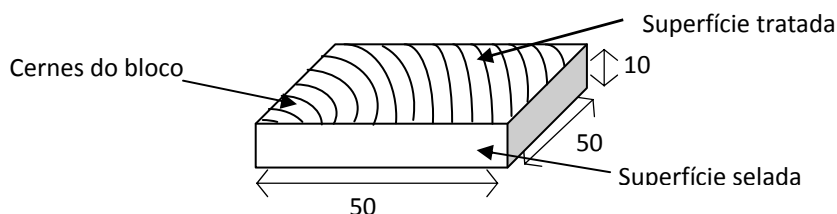


Figura 68 – Dimensões dos blocos de *P. sylvestris* utilizados no teste de tratamento de superfície.

VI.2.3 Tratamento dos blocos teste/preparação dos dispositivos

O extrato acetato de etila de *S. rubra* foi dissolvido em acetona, para a preparação de soluções em quatro concentrações diferentes: 35, 30, 15 e 7,25% m/m, correspondendo as taxas de tratamento de superfície de 55,9 ; 47,9 ; 23 ; 9 e 11,6 $\text{g}\cdot\text{m}^{-2}$ para 0,4 g de solução de extrato depositado em cada bloco.

Uma das faces de 25 cm^2 dos blocos foi recorberta com uma camada da solução de tratamento (figura 68). Em seguida, os blocos tratados foram secos em sala climatizada

($20\pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade relativa do ar de $65\pm 5\%$) durante 48 horas, e postos em contato com os cupins.

Metade dos lotes teste F_5 e F_6 (tratados com o extrato de *S. rubra* nas concentrações de 47,9 e 11,6 $\text{g}\cdot\text{m}^{-2}$ de superfície) foi submetida a um ensaio de lixiviação, de acordo com o método descrito na NF EN 84 (Afnor, 1997): os lotes foram mantidos em sala de secagem durante 30 dias ($20\pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade relativa do ar $65\pm 5\%$) e, em seguida, introduzidos em um recipiente de água destilada (5 partes de água para um volume de madeira) e submetidos a um vácuo de 4 kPa durante 20 min (figura 69). Após duas horas de imersão, a água foi renovada pela primeira vez e, em seguida, regularmente durante 14 dias (a água foi trocada nove vezes). No final desse período, os blocos foram drenados e secos durante duas semanas em sala climatizada ($20\pm 2^{\circ}\text{C}$, $65\pm 5\%$ de umidade relativa do ar) para, em seguida, serem colocados na presença dos cupins.

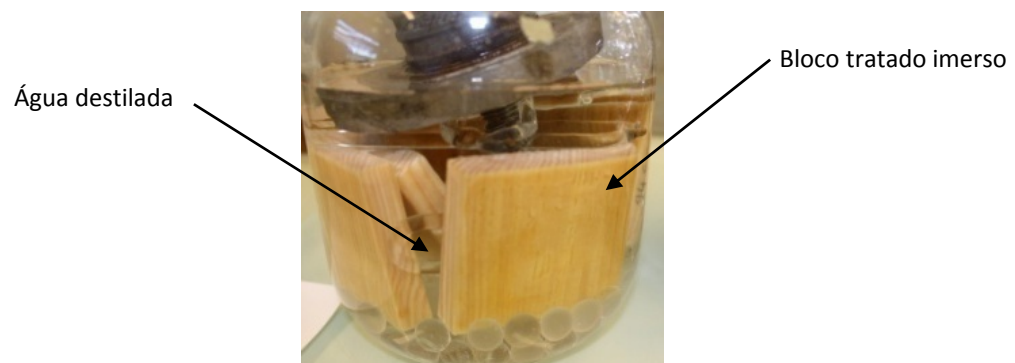


Figura 69 – Prova de lavagem dos blocos tratados com extrato acetato de etila de madeira de *S. rubra*.

Os dispositivos foram montados com os blocos tratados secos. Cada dispositivo incluía um tubo de vidro (diâmetro interno de 25 mm e altura de 110 mm) colado ao centro do bloco, com colofane (figura 70). Para garantir que a superfície tratada não fosse colocada diretamente em contato com os cupins, um espaçador (um disco de 1 mm de espessura) do alburno de pinheiro foi introduzido dentro do tubo. Neste, acrescentamos 2/3 de areia úmida (uma parte de água e quatro partes de areia). Em cada dispositivo, foram introduzidos 250 operários, cinco soldados e cinco ninfas.

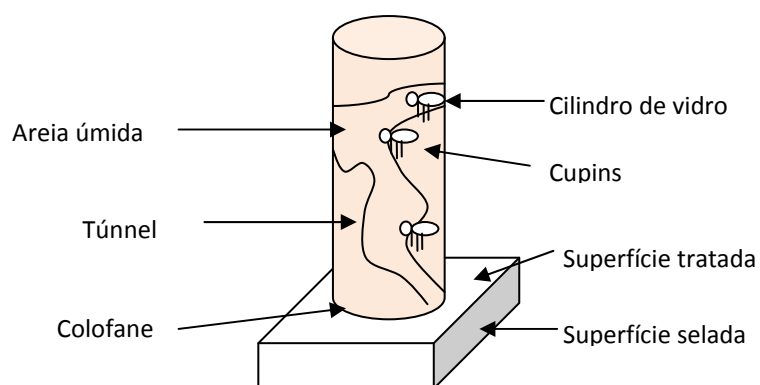


Figura 70 – Dispositivo teste segundo a norma NF EN 118.

VI.2.4 Avaliação da degradação dos blocos

Os dispositivos teste foram mantidos em câmara climatizada a 27°C e 70% de umidade relativa, durante 8 semanas. Durante esse período, para se evitar a desidratação dos insetos, a areia foi re-umedecida com água ionizada quando necessário.

Informações relativas à perfuração de túneis na areia em regiões visíveis do cilindro, construção de chaminés, movimentação dos insetos, evasão, entre outras, foram registradas durante todo o período de teste.

No final do período experimental, os tubos de vidro foram descolados do bloco, os cupins sobreviventes foram contados e o nível de ataque dos blocos foi avaliado visualmente utilizando-se uma grade de cotações de ataque (Tabela 33). O teste foi validado quando todos os blocos não tratados (lotes F₆ e F₇) obtiveram cotação de ataque nível 4 e, pelo menos, 50% dos cupins introduzidos nesses dispositivos continuaram vivos.

Tabela 33 – Avaliação do nível de ataque dos blocos de *P. sylvestre* expostos ao ataque por *Reticulitermes flavipes* (Fonte: NF EN 118, 2005).

Cotação	Nível de ataque	Características do ataque
0	Nenhum ataque	
1	Tentativa de ataque	<i>a</i> : erosão superficial de profundidade não mensurável sobre uma zona não delimitada do bloco; ou <i>b</i> : ataque de até 0,5 mm de profundidade, limitado a uma ou mais zonas, cuja superfície total não ultrapasse 30 mm ² ; ou uma combinação de <i>a</i> e <i>b</i> .
2	Ataque leve	<i>a</i> : erosão de 1 mm de profundidade, limitado a 1/10 da superfície do bloco; ou <i>b</i> : perfuração única de profundidade inferior a 3 mm; ou uma combinação de <i>a</i> e <i>b</i> .
3	Ataque médio	<i>a</i> : erosão inferior a 1 mm de profundidade sobre mais de 1/10 do bloco; ou <i>b</i> : erosão de 1 a 3 mm sobre no máximo 1/10 da superfície do bloco; ou <i>c</i> : perfuração isolada superior a 3 mm; ou combinação de <i>a</i> , <i>b</i> ou <i>c</i> .
4	Ataque forte	<i>a</i> : erosão de 1 a 3 mm sobre uma superfície superior a 1/10 do bloco; ou <i>b</i> : perfuração penetrante superior a 3 mm que se espalha sobre a superfície do bloco; ou combinação de <i>a</i> e <i>b</i> .

VI.3 Análises estatísticas

Todos os resultados foram comparados por teste de análise de variância um fator, com intervalo de confiança de 0,05, para demonstrar o efeito da perda de massa observada nos blocos de *V. surinamensis* tratados (lotes E₁ a E₅). Cada conjunto de medidas relativas a um tratamento foi comparado ao grupo controle pelo teste de Tukey. O estado do ataque dos blocos de *P. sylvestris* foi avaliado por meio de análise de variância não paramétrica (Kruskal-Wallis). Foi utilizado o software XLSTAT® para todas as análises.

VII Fracionamento biomonitorado

VII.1 Extrato acetato de etila de *Sextonia rubra*

O extrato acetato de etila de *S. rubra* (14 g) foi fracionado em coluna aberta de sílica (Ø 6,3 cm). Foram utilizados como eluentes acetato de etila (1,5 l) e metanol (500 ml). A fração eluída com acetato de etila foi evaporada e lavada com hexano. A parte insolúvel foi recuperada por filtração e dissolvida em acetato de etila. Após a evaporação, foram obtidas três frações: hexânica (8 g), acetato de etila (1,3 g) e metanol (320 mg). As frações foram testadas em cepas de *P. sanguineus* e *M. canis* LMG0 22 pelo método de perfuração em ágar. A atividade foi retida na fração acetato de etila, que foi fracionada novamente em

coluna aberta de sílica (\emptyset 3,2 cm) com um gradiente de hexano / acetato de etila : 5:5 (200 ml), 4:6 (100 ml), 3:7 (100 ml), 2:8 (100 ml), 1:9 (300 ml), acetato de etila puro (300 ml) e metanol puro (200 ml). Foram obtidas quinze frações de 100 ml. Estas foram agrupadas em cinco diferentes grupos (1-5), de acordo com os perfis químicos de cada uma, como mostra a tabela 34.

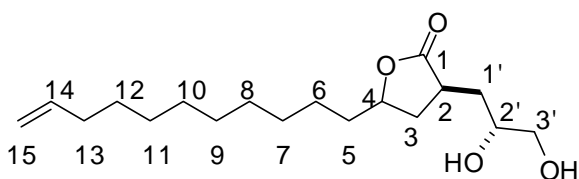
Tabela 34 – Frações obtidas à partir do extrato acetato de etila da madeira de *S. rubra*.

Eluente	Frações obtidas	Frações agrupadas	Massa
Hexano/AcOEt 1:1	1 - 2		
Hexano/AcOEt 60%	3	I (1 – 5)	0,06g
Hexano/AcOEt 70%	4		
Hexano/AcOEt 80%	5		
Hexano/AcOEt 90%	6	II (6)	0,1 g
	7-9	III (7 – 8)	1 g
AcOEt	10 - 14	IV (9 – 14)	0,04g
MeOH	15	V (15)	0,1 g

O espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) indicou que a fração III é composta de dois compostos (1:1) de peso molecular e estrutura muito semelhantes. A análise RMN da mistura identificou estes dois compostos como rubrenolideo (**1**) e rubrínolideo (**2**).

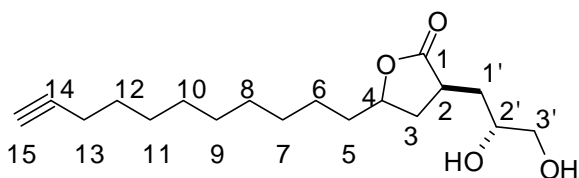
Estas duas substâncias foram separadas pelo método descrito por Thijs & Zwanenburg (2004). Para tal, 1 g da mistura foi diluída em 20 ml de etanol. Em seguida, foram adicionados 2,97 g de nitrato de prata (AgNO_3) diluído a uma concentração de 5% em etanol (foram utilizados cerca de 5 equivalentes de AgNO_3 para essa reação). Foi observada a formação de um precipitado branco na solução. Após 4 horas, o precipitado foi recuperado por filtração, a fração líquida foi evaporada e o resíduo sólido foi tomado em éter etílico. A fração orgânica foi recuperada por filtração, secada com sulfato de magnésio (MgSO_4) e evaporada. O produto obtido foi identificado como o rubrenolideo (**1**, 558 mg, 4%). O precipitado foi dissolvido em éter e descomplexado na presença de 2,5 ml de cianeto de sódio (NaCN) 10% em solução aquosa (2 horas). A solução foi extraída com éter etílico, a fração orgânica foi recuperada, secada com MgSO_4 e evaporada. O produto obtido foi identificado como o rubrínolideo (**2**, 340 mg, 2,4%).

Rubrenolideo (**1**):



$[\alpha]_D^{24,8} = +35$ (c 0,23 ; CHCl_3) ; RMN ^1H (CDCl_3) δ 1.22-1.77 (m, 13H, H-5 à H-11), 1,55 (1H, H-3a), 1,58 (2H, H-5), 1,59 (1H, H-1'a), 1,96 (ddd, 1H, $J = 14.3, 9.9$ e 6.0 Hz, H-1'b), 2.02 (q largo, 2H, $J = 7.1$ Hz, H-12), 2.53 (ddd, 1H, $J = 12.4, 8.5$ e 6.0 Hz, H-3b), 2.91 (dtd, 1H, $J = 12.4, 8.2$ e 6.4 Hz, H-2), 3.47 (dd, 1H, $J = 11.2$ e 6.6 Hz, H-3'a), 3.61 (dd, 1H, $J = 11.2$ e 3.4 Hz, H-3'b), 3.74 (m, 1H, H-2'), 4.40 (dtd, 1H, $J = 10.8, 7.2$ e 5.5 Hz, H-4), 4.92 (dtd, 1H, $J = 10.2, 2.0$ e 1.2 Hz, H-14a), 4.98 (dq, 1H, $J = 17.2$ e 2.0 Hz, H-14b), 5.98 (dtd, 1H, $J = 16.9, 10.2$ e 6.7 Hz, H-13). RMN ^{13}C (CDCl_3) δ 25.2-35.8 (C-5 à C-12) 33.7 (C-1'), 35.5 (C-3), 39.0 (C-2), 66.7 (C-3'), 70.4 (C-2'), 79.9 (C-4), 114.1 (C-14), 139.1 (C-13), 180.4 (C-1).

Rubrínolideo (**2**):



$[\alpha]_D^{24,5} = +29$ (c 0,2 ; CHCl_3) ; RMN ^1H (CDCl_3) δ 1.22-1.65 (m, 17H, H-5 à H-11), 1,55 (H-1'a), 1,76 (m, 1H), 1,93 (t, 1H, $J = 2.6$ Hz, H-14), 1,95 (ddd, 1H, $J = 14.5, 9.8, 7.1$ Hz H-1'b), 2.20 (td, 2H, $J = 7.1, 7.0, 2.65$ Hz, H-12), 2.52 (ddd, 1H, $J = 12.4, 8.5, 5.3$ Hz, H-3b), 2.91 (tdd, 1H, $J = 12.4, 8.4, 6.9$ Hz, H-2), 3.47 (dd, 1H, $J = 11.0, 6.5$ Hz, H-3'a), 3.65 (dd, 1H, $J = 11.0, 3.6$ Hz, H-3'b), 3.80 (dtd, 1H, $J = 9.6, 6.4, 3.2$ Hz, H-2'), 4.42 (dtd, 1H, $J = 10.7, 7.4, 5.4$ Hz, H-4). RMN ^{13}C (CDCl_3) δ 18.3-35.8 (C-5 à C-12) 33.7 (C-1'), 35.5 (C-3), 39.0 (C-2), 66.7 (C-3'), 68.1 (C-14), 70.4 (C-2'), 79.9 (C-4), 84.6 (C-13), 180.4 (C-1).

Ambos os compostos foram testados em fungos filamentosos dermatófitos e leveduras pelo método de microdiluição (página 166). Estas moléculas foram também testadas em *N. macrocephalus* pelo teste não-escolha sobre papel (página 168) e a eficácia protetora contra a degradação de blocos de *P. sylvestris* foi estimada utilizando-se o método descrito na página 186.

VII.1 Extrato acetato de etila de *Andira surinamensis*

O extrato acetato de etila da madeira de *A. surinamensis* (2,1 g) foi fracionado em coluna aberta de sílica (\emptyset 3,2 cm). Foram utilizados como eluentes, o diclorometano (240 ml), um gradiente diclorometano / acetato de etila : 9:1 (340 ml), 8:2, 7:3, 5:5, 2:8 (230 ml cada), o acetato de etila puro (230 ml) e, finalmente, o metanol (230 ml). As frações diclorometano e metanol foram coletadas em dois Erlenmeyer de 250 ml. As frações intermediárias foram recuperadas em 215 tubos de ensaio, reunidos em 14 grupos (1 à 14) de acordo com perfis de CCD. Todos os grupos foram testados sobre *M. canis* LMGO 02 e *T. rubrum* LMGO 4218, pelo método de microdiluição (página 166) para determinar os valores de CIM para essas cepas (Figura 75).

A fração 3 (75,7 mg) foi fracionada por CLAE semi-preparativa com água / acetonitrila 60/40 em 22 minutos. Assim, foram recuperadas seis subfrações (3-I a VI), das quais foram isolados e caracterizados três compostos: sativano (**3**, 4 mg, 0,01%), maackiaína (**4**, 6,4 mg, 0,017%) e medicarpina (**5**, 32 mg, 0,08%).

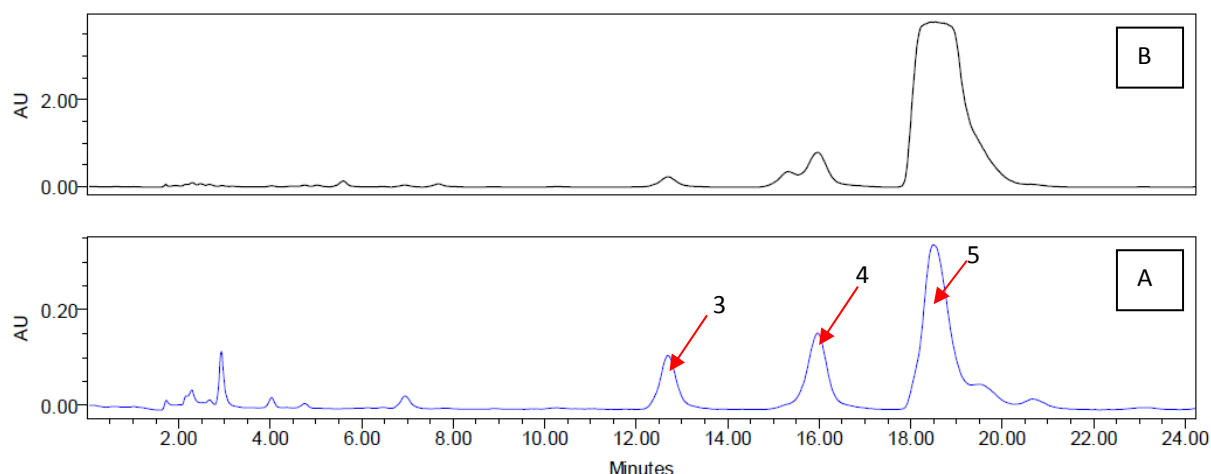


Figura 71 – Perfis cromatográficos da fração 3 obtidos em CLAE semi-preparativa, coluna C¹⁸ em sistema isocrático água/acetonitrila (60/40) a 214 nm (A) e 254 nm (B). As setas vermelhas indicam os picos correspondentes aos compostos 3, 4 e 5.

As frações 4 e 5 foram agrupadas (4^B), com base nos espectros em RMN ¹H. A fração 4^B (26,4 mg) foi fracionada em CLAE semi-preparativa utilizando-se como eluente água/acetonitrila 60/40 em 30 min. Treze sub-frações foram recuperadas (4B / I-XIII), das quais foi possível isolar e caracterizar o composto biochanina A (**6**, 2 mg, 0,016%).

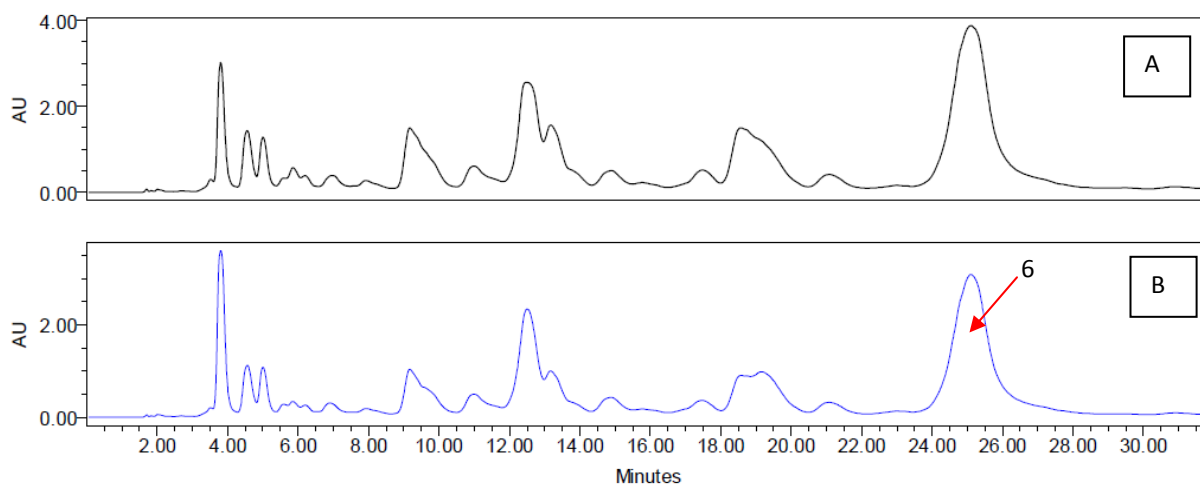


Figura 72 – Perfis cromatográficos da fração 4^B em CLAE semi-preparativa, coluna C¹⁸ em sistema isocrático água/acetonitrila (60/40), a 214 nm (A) e 254 nm (B) ; a seta vermelha indica os picos correspondentes ao composto 6.

Além disso, a subfração 4^B/VI (14 mg) foi fracionada novamente em CLAE semi-preparativa com água / acetonitrila (68/32) como eluentes, em método isocrático durante 35 min. Três sub-frações foram recuperadas (para 4^B/VI/A à 4B/VI/C), das quais foram isolados e caracterizados dois compostos: a dihidroformononetina (**7**, 0,6 mg, 0,0015%), e bolusantina IV (**8**, 6,6 mg, 0,017%).

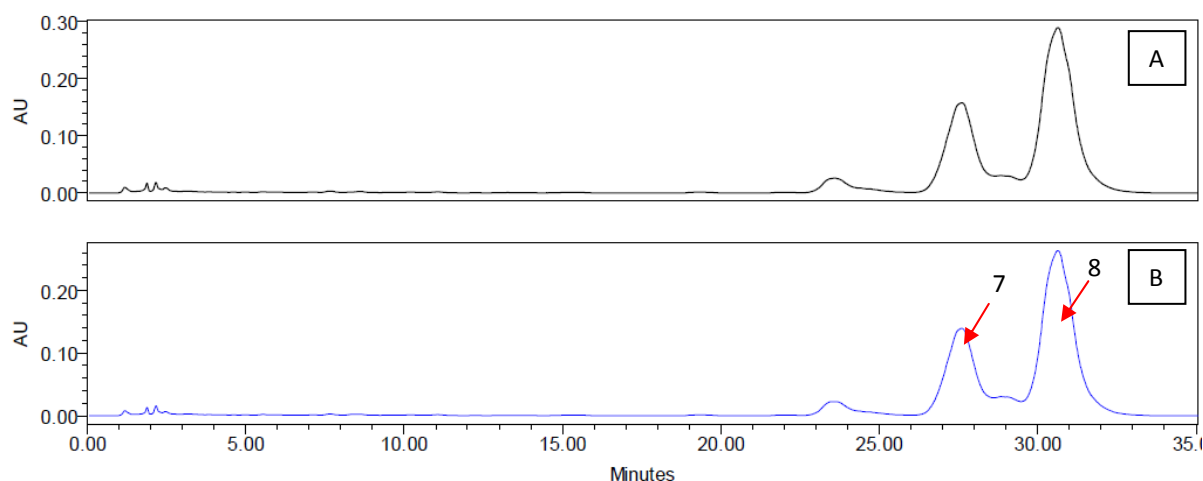


Figura 73 – Perfis cromatográficos da fração 4^B/VI em CLAE semi-preparativa, coluna C¹⁸ em sistema isocrático água/acetonitrila (68/32) a 214 nm (A) e 254 nm (B) ; as setas vermelhas indicam os picos correspondentes aos compostos 7 e 8.

Finalmente, a fração 7 (29,1 mg) foi fracionada em CLAE preparativa com água / acetonitrila 70/30 em método isocrático durante 24 min. Treze sub-frações foram recuperadas (7-1 a 13), a partir das quais uma substância pode ser isolada e caracterizada : a liquiritigenine (**9**, 1,2 mg, 0,003%).

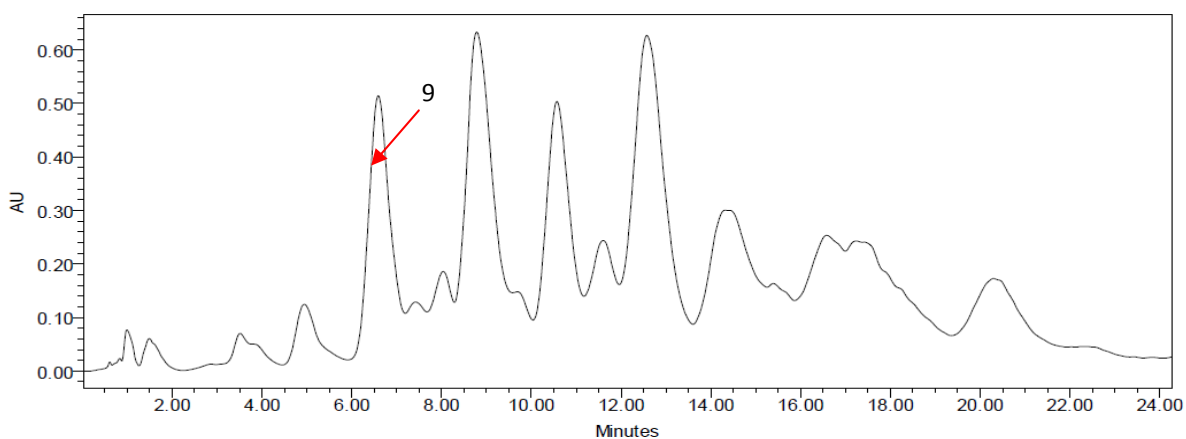


Figura 74 – Perfis cromatográficos da fração 7 em CLAE semi-preparativa, coluna C¹⁸ em sistema isocrático água/acetonitrila (70/30) a 290 nm ; a seta vermelha indica o pico correspondente ao composto 9.

Cinco destes sete compostos foram testados em fungos dermatófitos filamentosos e leveduras patogênicas, por meio do método de microdiluição (página 166) para a determinação dos valores de CIM (Figura 75). Os resultados são resumidos na tabela 22 (Capítulo 5, página 150).

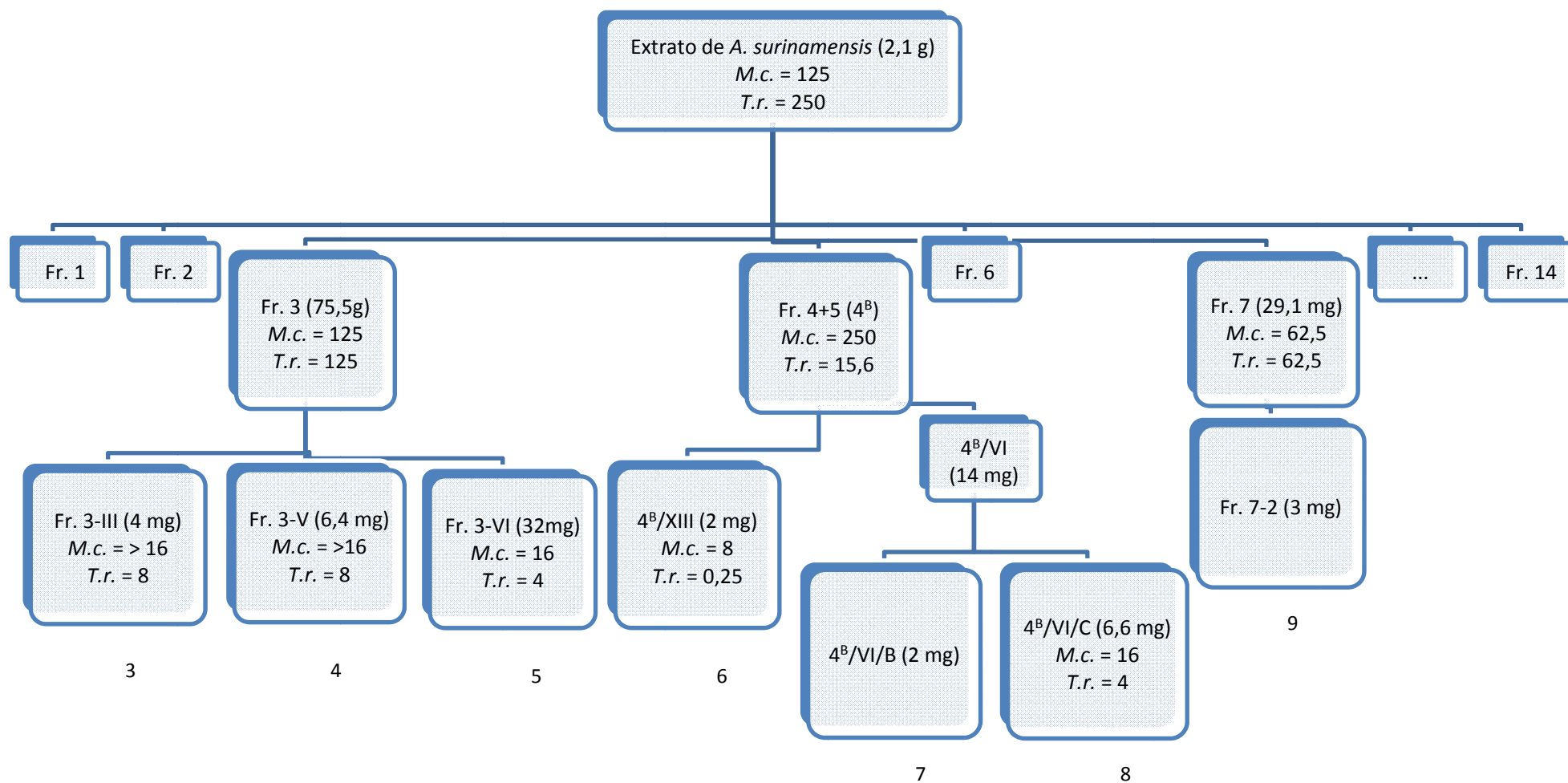


Figura 75 – Representação esquemática dos fracionamentos submetidos ao extrato acetato de etila de *Andira surinamensis*. Os números indicam os compostos identificados. Os valores de CIM foram expressos em $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ e medidos em cepas de *Microsporium canis* (M.c.) LMGO 22 e *Trichophyton rubrum* (T.r.) LMGO 06.

Referências bibliográficas

Afnor (1994a) NF EN 350-1 - Guide des principes d'essais et de classification de la durabilité naturelle du bois.

Afnor (1994b) NF EN 350-2 - Durabilité du bois et des matériaux dérivés du bois- Durabilité naturelle du bois massif-Partie 2: Guide de la durabilité naturelle du bois et de l'imprégnabilité d'essences choisies pour leur importance en Europe.

Afnor (1996a) NF EN 113 - Produits de préservation du bois - Méthode d'essai pour déterminer l'efficacité protectrice vis-à-vis des champignons basidiomycètes lignivores - Détermination du seuil d'efficacité. Association Française de Normalisation.

Afnor (1996b) NF EN 599 – 1 - Durabilité du bois et des matériaux dérivés du bois – Performances des produits préventifs de préservation du bois établies par des essais biologiques.

Afnor (1997) NF EN 84 - Produtos de preservação – Provas de envelhecimento acelerado das madeiras tratadas antes de ensaios biológicos.

Afnor (1998) NF EN 73 - Produits de préservation des bois - Épreuves de vieillissement accéléré des bois traités avant essais biologiques - Épreuve d'évaporation.

Afnor (2005) NF EN 118 - Produits de préservation des bois - Détermination de l'action préventive contre les espèces de Reticulitermes - termites européens - méthodes de laboratoire.

AFPB (2002). Préservation du bois. Guide d'emploi des normes: 61-67.

Agarwal, S.K.; S.S. Singh; S. Verma; S. Kumar (2000) Antifungal activity of anthraquinone derivatives from *Rheum emodi*. *Journal of Ethnopharmacology*, v.72: 43-46.

Aligiannis, N. ; E. Kalpoutzakis ; S. Mitaku ; I.B. Chinou (2001) Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils of Two Origanum Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.49: 4168-4170.

Ali-Shtayeh, M.S. ; S.I. Abu Ghdeib (1999) Antifungal activity of plant extracts against dermatophytes. *Mycoses*, v.42(11-12): 665-672.

Almeida, J.G.L ; E.R. Silveira ; O.D.L. Pessoa (2008) NMR spectral assignments of a new [C–O–C] isoflavone dimer from *Andira surinamensis*. *Magnetic Resonance in Chemistry*, v.46: 103-106.

Almeida, J.R.G.S. ; J.M. Barbosa-Filho ; A.G.S. Cabral ; M.F. Agra ; E.V.L. Cunha ; M.S. da Silva ; S.C. do Nascimento ; R. Braz-Filho (2005) Diploflavone, a New Flavonoid from *Diploptropis ferruginea* Benth. (Fabaceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v.16(6B) : 1454 – 1457.

Aloui, F. ; N. Ayadi ; F. Charrier ; B. Charrier (2004) Durability of European oak (*Quercus petraea* and *Quercus robur*) against white rot fungi (*Coriolus versicolor*): relations with phenol extractives. *Holz Roh Werkst*, v.62: 286-290.

Alves, M.V.S. ; A.F. da Costa ; D.S. Espig ; A.T. do Vale (2006) Natural decay resistance of six amazon wood species in soil block tests. *Ciência Florestal*, v. 16(1): 17-26.

Amusant N. ; C. Moretti ; B. Richard ; E. Prost ; J.M. Nuzillard ; M.F. Thévenon (2007) Chemical compounds from *Eperua falcata* and *Eperua grandiflora* heartwood and their biological activities against wood destroying fungus (*Coriolus versicolor*). *Holz Roh Werkst*, v.65: 23-28.

Amusant N. ; J. Beauchêne ; M. Fournier, G. Janin, M.F. Thevenon (2004) Decay resistance in *Dicorynia guianensis* Amsh.: analysis of inter-tree and intra-tree variability and relations with wood colour. *Annals of Forest Science*, v. 61: 373-380.

Antwi-Boasiako, C. ; A. Damoah (2010) Investigation of synergistic effects of extracts from *Erythrophleum suaveolens*, *Azadirachta indica*, and *Chromolaena odorata* on the durability of *Antiaris toxicaria*. *International Biodeterioration and Biodegradation*, v.64: 97-103.

Aoki, T. ; T. Akashi ; S.-I. Ayabe (2000) Flavonoids of Leguminous Plants: Structure, Biological Activity, and Biosynthesis. *Journal of Plant Research*, v.113: 475 – 488.

ASTM Standard D2017-81(1994)e1 (2002) Standard Test Method for Accelerated Laboratory Test of Natural Decay Resistance of Woods. ASTM International, West Conshohocken, PA, 2003, DOI: 10.1520/D2017-81R94E01, www.astm.org.

ASTM-American Society for Testing and Materials (1993) Standard Method of accelerated laboratory testing of natural decay resistance of wood ASTM D 2017. *In: Annual Book of ASTM Standards*, vol. 4.09, 344-348.

Ayres, M.C.C. ; S.P. Escórcio ; D.A.da Costa ; M.H. Chaves (2008) Constituintes químicos das folhas de *Qualea grandiflora*: atribuição dos dados de RMN de dois flavonóides glicosilados acilados diastereoisoméricos. *Química Nova*, v.31(6): 1481-1484.

Babula, P. ; V. Adam ; L. Havel ; R. Kizek (2009) Noteworthy secondary metabolites naphthoquinones - Their occurrence, pharmacological properties and analysis. *Current Pharmaceutical Analysis*, v.5: 47-68.

Badiee, P. ; P. Kordbacheh ; A. Alborzi ; S. Malekhoseini ; M. Ramzi ; H. Mirhendi ; M. Mahmoodi ; E. Shakiba (2009) Study on invasive fungal infections in immunocompromised patients to present a suitable early diagnostic procedure. *International Journal of Infectious Diseases*, v.13(1): 97-102.

Baixench, M.T. ; N. Aoun ; M. Desnos-Olliver ; D. Garcia-Hermoso ; S. Bretagne ; S. Ramires ; C. Piketty ; E. Dannaoui (2007) Acquired resistance to echinocandins in *Candida*

albicans: case report and review. *Journal of Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.59: 1076-1083.

Bakkali, F. ; S. Averbeck ; D. Averbeck ; M. Idaomar (2008) Biological effects of essential oils-A review. *Food and Chemical Toxicology*, v.46: 446-475.

Barbosa, A.P. ; C.S. Nascimento ; J.W. Morais (2007) Studies on the antitermitic properties of wood and bark crude extracts of forest species from Central Amazonian, Brazil. *Acta Amazonica*, v.37(2): 213-218.

Bastert, J. ; M. Schaller ; H.C. Korting ; E.G.V. Evans (2001) Current and future approaches to antimycotic treatment in the era of resistant fungi and immunocompromised hosts. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v.17(2): 81-91.

Beghyn, T. ; R. Deprez-Poulain ; N. Willand ; B. Folleas ; B. Deprez (2008) Natural Compounds: Leads or Ideas? Bioinspired Molecules for Drug Discovery. *Chemical Biology and Drug Design* ; v.72: 3-15.

Binbuga, N. ; C. Ruhs ; J.K. Hasty ; W.P. Henry ; T.P. Schultz (2008) Developing environmentally benign and effective organic wood preservatives by understanding the biocidal and non-biocidal properties of extractives in naturally durable heartwood. *Holzforschung*, v. 62(3): 264-269.

Blake, S. ; G. Jones (1963) Extractives from *Eperua falcata*. The petrol-soluble constituents. *Journal of the Chemical Society*: 430-433.

Bläske, V.U. ; H. Hertel (2001) Repellent and toxic effects of plant extracts on subterranean termites (Isoptera: Rhinotermitidae). *Journal of Economic Entomology*, v. 94(5): 1200-1208.

Borges, L.M. ; S.M. Cragg ; J. Bergot ; J.R. Williams ; B. Shayler ; G.S. Sawyer (2008) Laboratory screening of tropical hardwoods for natural resistance to the marine borer

Limnoria quadripunctata: the role of leachable and non-leachable factors. *Holzforchung*, v.62: 99-111.

Brown, A.J.P. ; F.C. Odds ; N.A.R. Gow (2007) Infection-related gene expression in *Candida albicans*. *Current Opinion in Microbiology*, v.10(4): 307-313.

Bryant, J.P. ; F.S. Chapin ; D.R. Klein (1983) Carbon/nutrient balance of boreal plants in relation to vertebrate herbivore. *Oikos*, v. 40: 357 – 368.

Bultman, J.D. ; C.R. Southwell (1976) Natural Resistance of Tropical American Woods to Terrestrial Wood-Destroying Organisms. *Biotropica*, v.8(2): 71-95.

Burtin, P. ; C. Jay-Allemand, J.P. Charpentier ; G. Janin (1998) Natural wood colouring process in *Juglans* sp. (*J. nigra*, *J. regia* and hybrid *J. nigra* 23 x *J. regia*) depends on native phenolic compounds accumulated in the transition zone between sapwood and heartwood. *Trees*, v. 12: 258-264.

Butler, M.S. (2005) Natural products to drugs: natural product derived compounds in clinical trials. *Natural Products Reports*, v.22: 162-195.

Calderone, R.A. ; W.A. Fonzi (2001) Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends in Microbiology*, v.9(7): 327– - 335.

Carlini, C.R. ; M.F. Grossi-De-Sá (2002) Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon* v.40(11): 1515-1539.

Carneiro, J.S. ; L. Emmert ; G.H. Sternadt ; J.C. Mendes ; G.F. Almeida (2009) Decay susceptibility of Amazon wood species from Brazil against white rot and brown rot decay fungi. *Holzforchung*, v.63: 767-772.

Carter, F.L. ; A.M. Garlo ; J.S. Stanley (1978) Termiticidal components of wood extracts: 7-methyljuglone from *Diospyros virginiana*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.26(4): 869-873.

Carter, F.L. ; C.R.R. de Camargo (1983) Testing antitermitic properties of Brazilian woods and their extracts. *Wood and Fiber Science*, v.15(4): 350-357.

Chan, M.M.Y. (2002) Antimicrobial effect of resveratrol on dermatophytes and bacterial pathogens of the skin. *Biochemical Pharmacology*, v.63: 99-104.

Chan, W.R. ; W.G.C. Forsyth ; C.H. Hassall (1958) 644.The constitution of the leucoanthocyanidin, peltogynol. *Journal of the Chemical Society*: 3174-3179.

Chang, S.-T. ; S.-S. Cheng ; S.-Y. Wang (2001) Antitermitic activity of essential oils and components from Taiwan (*Taiwania cryptomerioides*). *Journal of Chemical Ecology*, v. 27(4): 717-724.

Chave, J. ; H.C. Muller-Landau ; T.R. Baker ; T.A. Easdale ; H. ter Steege ; C.O. Webb (2006) Regional and phylogenetic variation of wood density across 2456 neotropical tree species. *Ecological Applications*, v.16(6) : 2356 – 2367.

Cheng, S.-S. ; H.-T. Chang ; C.-L. Wu ; S.-T. Chang (2007) Anti-termitic activities of essential oils from coniferous trees against *Coptotermes formosanus*. *Bioresource Technology*, v.98: 456-459.

Cheng, S.S. ; J.Y. Liu ; Y.R. Hsui ; S.T. Chang (2006) Chemical polymorphism and antifungal activity of essential oils from leaves of different provenances of indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*). *Bioresource and Technology*, v.97: 306-312.

CIRAD (1983) Bois des DOM-TOM-Tome I. CIRAD-Forêt. p.3.

Clausen, C.A. ; V. Yang (2007) Protecting wood from mould, decay, and termites with multi-component biocide systems. *International Biodeterioration and Biodegradation*, v.59(1): 20-24.

Cocker, W. ; T. Dahl ; C. Dempsey ; T.B.H. McMurry (1962) 957. Extractives from woods. Part I. Extractives from *Andira inermis* (Wright) H.B.K. *Journal of the Chemical Society*: 4906-4909.

Constantino, R. (1998) Catalog of the living termites of the New World (Insecta: Isoptera). *Arquivos de Zoologia*, v.35(2): 135-230.

Constantino, R. (2002) An illustrated key to Neotropical termite genera (Insecta:isoptera) based primarily on soldiers. *Zootaxa*, v.67: 1-40.

Costa, E. S. ; C. A. Hiruma-Lima ; E. O. Lima ; G. C. Sucupira ; A. O. Bertolin ; S. F. Lolis ; F. D. P. Andrade ; W. Vilegas ; A. R. M. Souza-Brito (2008) Antimicrobial Activity of Some Medicinal Plants of the Cerrado, Brazil. *Phytotherapy Research*, v.22: 705-707.

Cragg, G.M. ; D.J. Newman (2005) Plants as a source of anti-cancer agents. *Journal of Ethnopharmacology*, v.100: 72-79.

Cruz, M.C.S. ; P.O. Santos ; A.M. Barbosa Jr. ; D.L.F.M. de Mélo ; C.S. Alviano ; A.R. Antonioli ; D.S. Alviano ; R.C. Trindade (2007) Antifungal activity of Brazilian medicinal plants involved in popular treatment of mycoses. *Journal of Ethnopharmacology*, v.111(2): 409-412.

Dakora, F. D. ; D. A. Phillips (1996) Diverse functions of isoflavonoids in legumes transcend anti-microbial definitions of phytoalexins. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v.49: 1 – 20.

De Almeida, J.G.L. (2007) Contribuição ao conhecimento químico de plantas do nordeste: *Andira surinamensis* e *Piper divaricatum*. Dissertação de Mestrado, Fortaleza, 160 p.

De Almeida, M. E. ; O. R. Gottlieb ; J. R. de Sousa ; M. A. Teixeira (1974) New peltogynoids from three *Peltogyne* species. *Phytochemistry*, v.13: 1225–1228.

De Jesus, M.A. ; J.W. Morais ; R.L.S. Abreu ; M.F.C. Cardias (1998) Natural durability of 46 Amazonian woods species in an in-ground essay in a forest environment. *Scientia Forestalis*, v.54: 81-92.

De Moura, K.C.G. ; F.S. Emery ; C. Neves-Pinto ; M.D.C.F.R. Pinto ; A.P. Dantas ; K. Salomão ; S.L. De Castro ; A.V. Pinto (2001) Trypanocidal Activity of Isolated Naphthoquinones from *Tabebuia* and Some Heterocyclic Derivatives: A Review from an Interdisciplinary Study. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v.12(3):325-338.

De Ugaz, O.L. ; J.C.L. Sanchez ; R.P.U. Sanchez ; M.S. Tempesta (1991) Flavonoids from *Andira inermis*. *Fitoterapia*, v. 62 (1): 89 – 90.

Demain, A.L. (2009) Antibiotics: Natural Products Essential to Human Health. *Medicinal Research Reviews*, v.29 (6): 821-842.

Dembitsky, V.M. (2008) Bioactive cyclobutane-containing alkaloids. *Journal of Natural Medicines*, v.62 : 1 – 33.

Departement des Forêts (2005) Evaluation des ressources forestières mondiales. Guyane Française. Rapport National. Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture, p. 2.

Detienne, P. ; D. Fouquet ; B. Parant (1989) Les Bois Guyanais-Propriétés et utilisation. *Revue Bois et Forêts des Tropiques*, n° 219: 125-143.

Dickson, R. A. ; P. J. Houghton ; P. J. Hylands (2007) Antibacterial and antioxidant cassane diterpenoids from *Caesalpinia benthamiana*. *Phytochemistry*, v.68: 1436–1441.

Doolittle, M. ; A. Raina ; A. Lax ; R. Boopathy (2007) Effect of natural products on gut microbes in Formosan subterranean termite, *Coptotermes formosanus*. *International Biodeterioration and Biodegradation*, v.59(1): 69-71.

Dzoyem, J.P. ; J.G. Tangmouo ; D. Lontsi ; F. X. Etoa ; P. J. Lohoue (2007) *In Vitro* Antifungal Activity of Extract and Plumbagin from The Stem Bark of *Diospyros crassiflora* Hiern (Ebenaceae). *Phytotherapy Research*, v.21: 671-674.

Erasto, P. ; G. Bojase-Moleta ; R.R.T. Majinda (2004) Antimicrobial and antioxidant flavonoids from the root wood of *Bolusanthus speciosus*. *Phytochemistry*, v.65: 875 – 880.

Evans, P. (2003) Emerging technologies in wood protection. *Forest Products Journal*, v.53(1): 14-22.

Falcão, M.J. ; Y.B.M. Pouliquem ; M.A.S. Lima ; N.V. Gramosa ; L.V. Costa-Lotufo ; G.C.G. Militão ; C. Pessoa ; M.O. Moraes ; E.R. Silveira (2005) Cytotoxic Flavonoids from *Platymiscium floribundum*. *Journal of Natural Products*, v.68 : 423-426.

Faraji, F. (2005) Etude de la durabilité d'un composite multicouches en mélange de placages de durabilité variable. Tese de doutorado, Ecole Nationale du Génie Rural, des Eaux et des Forêts. Montpellier, 179 p.

Fokialakis, N. ; W.L. Osbrink ; L.K. Mamonov ; N.G. Gemejeva ; A.B. Mims ; A.L. Skaltsounis ; A.R. Lax ; C.L. Cantrell (2006) Antifeedant and toxicity effects of thiophenes from four *Echinops* species against the Formosan subterranean termite, *Coptotermes formosanus*. *Pest Management Science*, v.62(9): 832-838.

Fontenelle, R.O.S. ; S.M. Morais ; E.H.S. Brito ; R.S.N. Brilhante ; R.A. Cordeiro ; N.R.F. Nascimento ; M.R. Kerntopf ; J.J.C. Sidrim ; M.F.G. Rocha (2008) Antifungal activity of

essential oils of Croton species from the Brazilian Caatinga biome. *Journal of Applied Microbiology*, v.104(5): 1383-1390.

Fougerousse, M. (1960) Durabilité naturelle des bois. *Bois et Forêts des Tropiques*, v.73: 43-56.

Franca, N.C. ; O.R. Gottlieb ; D.T. Coxon (1977) Rubrenolide and rubrynlolide : an alkene-alkyne pair from *Nectandra rubra*. *Phytochemistry*, v.16 : 257 – 262.

Freeman, M.H. ; D.D. Nicholas ; T.P. Schultz (2006) Nonarsenical Wood Protection: Alternatives for Chromated Copper Arsenate, Creosote and Pentachlorophenol *In: Environmental Impacts of Treated Wood*, ed. T.G. Townsend, CRC Press, and Boca Raton, FL.

Freeman, M.H. ; T.F. Shupe ; R.P. Vlosky ; H.M. Barnes (2003). Past, present and future of the wood preservation industry. *Forest Products Journal*, v.53(10): 8-15.

Freixa, B. ; R. Vila ; L. Vargas ; N. Lozano ; T. Adzet ; S. Cañigüeral (1998) Screening for antifungal activity of nineteen Latin American plants. *Phytotherapy Research*, v.12(6): 427-430.

Fujita, M. ; H. Harada (1991) Ultrastructure and formation of wood cell, 1 - 50. *In: Wood and cellulosic chemistry*. Hon, D.N.S. ; N. Shiraishi (editeurs), 2° édition, 907pp.

Ganapaty, S. ; P.S. Thomas ; S. Fotso ; H. Laatsch (2004) Antitermitic quinones from *Diospyros sylvatica*. *Phytochemistry*, v.65(9): 1265-1271.

Georgopapadakou, N.H. ; A. Bertasso (1992) Effects of squalene epoxidase inhibitors on *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.36(8): 1779-1781.

Georgopapadakou, N.H. ; T.J. Walsh (1996) Antifungal agents: Chemotherapeutic targets and immunologic strategies. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.40(2): 279-291.

Gertsch, J. (2009) How scientific is the science in ethnopharmacology? Historical perspectives and epistemological problems. *Journal of Ethnopharmacology*, v.122: 177-183.

Giddey, K. ; M. Monod ; J. Barblan ; A. Potts ; P. Waridel ; C. Zaugg ; M. Quadroni (2007) Comprehensive analysis of proteins secreted by *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton violaceum* under *in vitro* conditions. *Journal of Proteome Research*, v.6(8): 3081-3092.

Gierlinger N. ; D. Jacques ; M. Grabner ; R. Wimmer ; M. Schwanninger ; P. Rozenberg ; L.E. Pâques (2004) Colour of larch heartwood and relationships to extractives and brown-rot decay resistance. *Trees*, v.18: 102-108.

Gonçalves, F.G. ; J.T.S. Oliveira (2006) Resistance to the attack of dry-wood termites (*Cryptotermes brevis*) of six wood species. *Cerne*, v. 12(1): 80-83.

Goodell, B. ; J. Jellison ; J. Liu ; G. Daniel ; A. Paszczynski ; F. Fekete ; S. Krishnamurthy ; L. Jun ; G. Xu (1997) Low molecular weight chelators and phenolic compounds isolated from wood decay fungi and their role in the fungal biodegradation of wood. *Journal of Biotechnology*, v.53: 133-162.

Gordon, M.A. ; E.W. Lapa ; M.S. Fitter ; M. Lindsay (1980) Susceptibility of Zoopathogenic Fungi to Phytoalexins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.17 (2): 120-123.

Grabner, M. ; U. Müller ; N. Gierlinger ; R. Wimmer (2005) Effects of heartwood extractives on mechanical properties of larch. *IAWA Journal*, v. 26: 211-220.

Granato, D. ; D.S. Nunes ; P.P. De Mattos ; E. De Moura Rios ; A. Glinski ; L.C. Rodrigues ; G Zanusso Jr. (2005) Chemical and biological evaluation of rejects from the wood industry. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v.48: 237-241.

Grassé, P.-P.(1982) Chapitre X-La Digestion du Bois *In: Termitologia-Anatomie, Physiologie, Biologie, Systématique des Termites*, p. 248.

Guilley, E. ; J.P. Charpentier ; N. Ayadi ; G. Snakkers ; G. Nepveu ; B. Charrier (2004) Decay resistance against *Coriolus versicolor* in Sessile oak [*Quercus petraea* Liebl.: Analysis of the between-tree variability and correlations with extractives, tree growth and other basic wood properties. *Wood Science and Technology*, v.38(7): 539-554.

Gupta, A.K. ; E.A. Cooper (2008) Update in Antifungal Therapy of Dermatophytosis. *Mycopathologia*, v.166 : 353 – 367.

Gurgel, L.A. ; J.J.C. Sidrim ; D.T. Martins ; V.Cechinel Filho ; V.S. Rao (2005) *In vitro* antifungal activity of dragon's blood from *Croton urucurana* against dermatophytes. *Journal of Ethnopharmacology*, v.97(2): 409-412.

Hammel, K.E. ; A.N. Kapich ; K.A. Jensen Jr. ; Z.C. Ryan (2002) Reactive oxygen species as agents of wood decay by fungi. *Enzyme and Microbial Technology*, v.30(4): 445-453.

Haraguchi, H. ; R. Hayashi ; T. Ishizu ; A. Yagi (2003) A flavone from *Manilkara indica* as a specific inhibitor against aldose reductase *in vitro*. *Planta Medica*, v.69: 853-855.

Hart, J.H. ; D.M. Shrimpton (1979) Role of stilbenes in resistance of wood to decay. *Phytopatology*, v.69: 1138-1143.

Harun, J. ; P. Labosky Jr (1985) Antitermitic and antifungal properties of selected bark extractives *Wood and Fiber Science*, v.17(3): 327-335.

Harvey, A.L. (2008) Natural products in drug discovery. *Drug Discovery Today*, v.13 (19/20): 894-901.

Hay, R. J. (2006) Fungal infections. *Clinics in dermatology*, v.24(3): 201-212.

Heinonen, S.-M. ; K. Wähälä ; H. Adlercreutz (2004) Identification of Urinary Metabolites of the Red Clover Isoflavones Formononetin and Biochanin A in Human Subjects. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, v.52 : 6802-6809.

Hsu, F.L. ; H.T. Chang ; S.T. Chang (2007) Evaluation of antifungal properties of octyl gallate and its synergy with cinnamaldehyde. *Bioresource Technology*, v.98(4): 734-738.

Iaconelli, S. ; B. Simmen (2002) Taste thresholds and suprathreshold responses to tannin-rich plant extracts and quinine in a primate species (*Microcebus murinus*). *Journal of Chemical Ecology*, v.28: 2315-2326.

Iida, N. ; K. Takara ; N. Ohmoto ; T. Nakamura ; T. Kimura ; A. Wada ; M. Hirai ; T. Sakaeda ; K. Okumura (2001) Reversal effects of antifungal drugs on multidrug resistance in MDR1-Overexpressing HeLa Cells. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, v.24 : 1032 – 1036.

Imai, T ; S. Inoue ; N. Ohdaira ; Y. Matsushita ; R. Suzuki ; M. Sakurai ; J.M. Henriques de Jesus ; S. Kiyoka Ozaki ; Z. Finger ; K. Fukushima (2008) Heartwood extractives from the Amazonian trees *Dipteryx odorata*, *Hymenaea courbaril*, and *Astronium lecointei* and their antioxidant activities. *Journal of Wood Science*, v.54: 470-475.

Inamori, Y. ; Y. Shakagami ; Y. Morita ; M. Shibata ; M. Sugiura ; Y. Kumeda ; T. Okabe ; H. Tsujibo ; N. Ishida (2000) Antifungal activity of hinokitiol-related compounds on wood-rotting fungi and their insecticidal activities. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v.23(8): 995-997.

Islam, M.N. ; K. Ando ; H. Yamauchi ; Y. Kobayashi ; N. Hattori (2008) Comparative study between full cell and passive impregnation method of wood preservation for laser incised Douglas fir lumber. *Wood Science & Technology*, v.42: 343–350.

Islam, Md.M. ; Md.I. Shams ; G.N.M. Ilias ; Md.O. Hannan (2009) Protective antifungal effect of neem (*Azadirachta indica*) extracts on mango (*Mangifera indica*) and rain tree (*Albizia saman*) wood. *International Biodeterioration and Biodegradation*, v.63: 241-243.

Jang, D.S. ; E.J. Park ; M.E. Hawthorne ; J.S. Vigo ; J.G. Graham ; F. Cabieses ; B.D. Santarsiero ; A.D. Mesecar ; H.H.S. Fong ; R.G. Mehta ; J.M. Pezzuto ; A.D. Kinghorn (2003) Potential Cancer Chemopreventive Constituents of the Seeds of *Dipteryx odorata* (Tonka Bean). *Journal of Natural Products*, v.66(5) : 583 – 587.

Jiménez-González, L. ; M. Alvarez-Corral ; M. Muñoz-Dorado ; I. Rodríguez-García (2008) Pterocarpan: interesting natural products with antifungal activity and other biological properties. *Phytochemical Reviews*, v.7: 125–154.

Kaimoyo, E. ; H.D. VanEtten (2008) Inactivation of pea genes by RNAi supports the involvement of two similar O-methyltransferases in the biosynthesis of (+)-pisatin and of chiral intermediates with a configuration opposite that found in (+)-pisatin. *Phytochemistry*, v.69 : 76–87.

Kappler, A. ; A. Brune (2002) Dynamics of redox potential and changes in redox state of iron and humic acids during gut passage in soil-feeding termites (*Cubitermes* spp.). *Soil Biology and Biochemistry*, v.34(2): 221-227.

Karou, D. ; A. Savadogo ; A. Canini ; S. Yameogo ; C. Montesano ; J. Simpore ; V. Colizzi ; A.S. Traore (2006) Antibacterial activity of alkaloids from *Sida acuta*. *African Journal of Biotechnology*, v.5 (2): 195-200.

Kartal, S.N. ; W.J. Hwang ; Y. Imamura ; Y. Sekine (2006) Effect of essential oil compounds and plant extracts on decay and termite resistance of wood. *Holz als Roh – und Werkstoff*, v.64: 455-461.

Kido, T. ; M. Taniguchi ; K. Baba (2003) Diterpenoids from Amazonian crude drug of Fabaceae. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, v.51: 207–208.

King, F.E. ; G. Jones (1955) The chemistry of extractives from hardwoods. Part XXI. The structure of eperuic acid. *Journal of the Chemical Society*: 658-665.

Kleist G. ; U. Schmitt (1999) Evidence of accessory compounds in vessel walls of Sapelli heartwood (*Entandrophragma cylindricum*) obtained by transmission electron microscopy. *Holz als Roh – und Werkstoff*, v. 57:93-95.

Kondo, T. ; S. Kurotori ; M. Teshima ; M. Sumimoto (1963) The termiticidal wood-extractive from *Kalopanax septemlobus* Koids. *Mokuzai Gakkaishi*, v.9(4): 125-129.

Koroishi, A.M. ; S.R. Foss ; D.A.G. Cortez ; T. Ueda-Nakamura ; C.V. Nakamura ; B.P. Dias Filho (2008) *In vitro* antifungal activity of extracts and neolignans from *Piper regnellii* against dermatophytes. *Journal of Ethnopharmacology*, v.117 : 270 – 277.

Kraft, C. ; K. Jenett-Siems ; I. Köhler ; K. Siems ; D. Abbiw ; U. Bienzle ; E. Eich (2002) Andiol A and B, two unique 6-hydroxymethylpterocarpenes from *Andira inermis*. *Zeitschrift fur Naturforschung – Section C Journal of Biosciences*, v.57(9-10): 785-790.

Kraft, C. ; K. Jenett-Siems ; K. Siems ; M.P. Gupta ; U. Bienzle ; E. Eich (2000) Antiplasmodial activity of isoflavones from *Andira inermis*. *Journal of Ethnopharmacology*, v.73: 131–135.

Kraft, C. ; K. Jenett-Siems ; K. Siems ; P.N. Solis ; M.P. Gupta ; U. Bienzle ; E. Eich (2001) Andinermals A-C, antiplasmodial constituents from *Andira inermis*. *Phytochemistry*, v.58(5): 769-774.

Lacoste, J.F. ; D.Y. Alexandre (1991) Kopi (*Goupia glabra* Aubl.), a promising timber tree for forestry: a literature review. *Annals of Forest Science*, v.48: 429-441.

Lajide, L. ; P. Escouba ; J. Mizutani (1995) Termite antifeedant activity in *Xylopia aethiopica*. *Phytochemistry*, v. 40(4): 1105-1112.

Lee, J.Y. ; J.H. Lee ; J.H. Park ; S.-Y. Kim ; J.Y. Choi ; S.H. Lee ; Y.S. Kim ; S.S. Kang ; E.-C. Jang ; Y. Han (2009) Liquiritigenin, a licorice flavonoid, helps mice resist disseminated candidiasis due to *Candida albicans* by Th1 immune response, whereas liquiritin, its glycoside form, does not. *International Immunopharmacology*, v.9 : 632–638.

Li, J. W.-H. ; J. C. Vederas (2009) Drug Discovery and Natural Products: End of an Era or an Endless Frontier? *Science*, v.325: 161–165.

Li, L. ; S. Redding ; A. Dongari-Bagtzoglou (2007) *Candida glabrata*, an emerging oral opportunistic pathogen. *Journal of Dental Research*, v.86(3): 204-215.

Lima, J.T ; J.R.G.S. Almeida ; J.M. Barbosa-Filho ; T.S. Assis ; M.S. Silva ; E.V.L. Da-Cunha ; R. Braz-Filho ; B.A. Silva (2005) Spasmolytic action of diplotropin, a furanoflavan from *Diplotropis ferruginea* Benth., involves calcium blockade in guinea-pig ileum. *Zeitschrift fur Naturforschung-Section B Journal of Chemical Sciences*, v.60(10): 1093-1100.

Lopes, N.P. ; M.J. Katoa ; M. Yoshida (1999) Antifungal constituents from roots of *Virola surinamensis*. *Phytochemistry*, v.40: 18 – 22.

Lupi, O. ; S.K. Tyring ; M.R. McGinnis (2005) Tropical dermatology: Fungal tropical diseases. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v.53(6): 931-951.

Ma, J. ; X.-D. Luo ; P. Protiva ; H. Yang ; C. Ma ; M. J. Basile ; I.B. Weinstein ; E.J. Kennelly (2003) Bioactive novel polyphenols from the fruit of *Manilkara zapota* (sapodilla). *Journal of Natural Products*, v.66: 983-986.

Mabberley, D.J. (1997) *The Pant Book-A Portable Dictionary of the vascular plants*. Cambridge University Press.

Mabicka, A. ; S. Dumarçay ; E. Gelhaye ; P. Gérardin (2004) Inhibition of fungal degradation of wood by 2-hydroxypyridine-N-oxide. *Holzforschung*, v.58: 566-568.

Mabicka, A. ; S. Dumarçay ; N. Rouhierb ; M. Linderc ; J.P. Jacquot ; P. Gérardin ; E. Gelhaye (2005) Synergistic wood preservatives involving EDTA, irganox 1076 and 2-hydroxypyridine-N-oxide. *International Biodeterioration and Biodegradation*, v.55: 203-211.

Magela V. Júnior, G. ; C.M.M. Sousa ; A.J. Cavaleiro ; J.H.G. Lago ; M.H. Chaves (2008) Phenolic derivatives from fruits of *Dipteryx lacunifera* Ducke and evaluation of their antiradical activities, *Helvetica Chimica Acta* v.91: 2159-2167.

Malan, E. ; D. G. Roux (1974) (+)-2,3-Trans-pubeschin, the first catechin analogue of peltogynoids from *Peltogyne pubescens* and *P. venosa*. *Phytochemistry*, v.13: 1575–1579.

Malhi, Y. ; J.T. Roberts ; R.A. Betts ; T.J. Killeen ; W. Li ; C.A. Nobre (2008) Climate change, deforestation and the fate of the Amazon. *Science*, v.319: 169-172.

Maoz, M. ; I. Weitz ; M. Blumenfeld ; C. Freitag ; J. J. Morrell (2007) Antifungal activity of plant derived extracts against *G. trabeum*. *The International Research Group on Wood Protection*. Jackson Lake Lodge, Wyoming USA.

Martinez-Rossi, N.M. ; N.T.A. Peres ; A. Rossi (2008) Antifungal resistance mechanisms in dermatophytes. *Mycopathologia*, v.166(5-6): 369-383.

Martins, C.V.B. ; D.L. da Silva ; A.T.M. Neres ; T.F.F. Magalhães ; G.A. Watanabe ; L.V. Modolo ; A.A. Sabino ; A. de Fátima ; M.A. de Resende (2009a) Curcumin as a promising antifungal of clinical interest. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v.63: 337-339.

Martins, C.V.B. ; M.A. de Resende ; D.L. da Silva ; T.F.F. Magalhães ; L.V. Modolo ; R.A. Pilli ; A. Fátima (2009b) *In vitro* studies of anticandidal activity of goniotalamin enantiomers. *Journal of Applied Microbiology*, v.107: 1279-1286.

Matan N. ; W. Woraprayote ; W. Saengkrajang ; N. Sirisombat ; N. Matan (2009) Durability of rubberwood (*Hevea brasiliensis*) treated with peppermint oil, eucalyptus oil,

and their main components. *International Biodeterioration and Biodegradation*, v.63: 621-625.

Matta, D.A. ; L.P. Almeida ; A.M. Machado ; A.C. Azevedo ; E.J.U. Kusanob ; N.F. Travassos ; R. Salomão ; A.L. Colombo (2007) Antifungal susceptibility of 1000 *Candida* bloodstream isolates to 5 antifungal drugs: results of a multicenter study conducted in São Paulo, Brazil, 1995-2003. *Diagnostic of Microbiological Infectious Diseases*, v.57: 399-404.

Maximo, P. ; A. Lourenço (1998) A pterocarpan from *Ulex parviflorus*. *Phytochemistry*, v.48(2) : 359 – 362.

Mckey, D. (1974) Adaptative patterns in alkaloid physiology. *American Naturalist*, v.108: 305-320.

McMurry, T.B.H. ; E. Martin ; D.M.X. Donnelly ; J.C. Thompson (1972) 3-Hydroxy-9-methoxy and 3-methoxy-9-hydroxypterocarpan. *Phytochemistry*, v.11 (11): 3283-3286.

Meepagala, K. M. ; W. Osbrink ; G. Sturtz ; A. Lax (2006) Plant-derived natural products exhibiting activity against formosan subterranean termites (*Coptotermes formosanus*). *Pest Management Science*, v.62(6): 565-570.

Melo e Silva, F. ; J.E. de Paula ; L.S. Espindola (2009) Evaluation of the antifungal potential of Brazilian Cerrado medicinal plants. *Mycoses*, v.52: 511-517.

Mesa-Siverio, D. ; A. Estévez-Braun ; Á.G. Ravelo ; J.R. Murguia ; A. Rodríguez-Afonso (2003) Novel DNA-Damaging Tropolone Derivatives from *Goupia glabra*. *European Journal of Organic Chemistry*, v.21: 4243-4247.

Michael, J.P. (2004) Indolizidine and quinolizidine alkaloids. *Natural Products Reports*, v.21 : 625 – 649.

Miller, R.W. ; G.F. Spencer ; A.R. Putnam (1989) (-)-5'-methoxysativan, a new isoflavan from alfafa. *Journal of Natural Products*, v. 52 (3) : 634 – 636.

Ministério da Agricultura, Insituto de Pesquisas e Estudos Florestais (IPEF). Portaria Nº 329, de 02 de setembro de 1985 .

Ministério do Meio Ambiente-MMA, Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis (IBAMA). Lei Nº 4.797, de 20 de outubro de 1965.

Ministério do Meio Ambiente-MMA, Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis (IBAMA). Portaria Nº 2748, de 16 de março de 1972.

Mosedale, J.R. ; B. Charrier ; N. Crouch ; G. Janin ; P.S. Savill (1996) Variation in the composition and content of ellagitannins in the heartwood of European oaks (*Quercus robur* and *Q. petraea*): A comparison of two French forests and variation with heartwood age. *Annals of Forest Science*, v. 53: 1005-1018.

Muñoz, V. ; M. Sauvain ; G. Bourdy ; J. Callapa ; S. Bergeron ; I. Rojas ; J.A. Bravo ; L. Balderrama ; B. Ortiz ; A. Gimenez ; E. Deharo (2000) A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach Part I. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by the Chacobo Indians. *Journal of Ethnopharmacology*, v.69: 127-137.

Nasser, A. L. M. ; L. P. Mazzolin ; C. A. Hiruma-Lima ; L. S. Santos ; M. N. Eberlin ; A. R. Monteiro de Souza Brito ; W. Vilegas (2006) Preparative Droplet Counter-Current Chromatography for the Separation of the New Nor-Seco-Triterpene and Pentacyclic Triterpenoids from *Qualea Parviflora*. *Chromatographia*, v.64:665-669.

Navarro García, V.M. ; A. Gonzalez ; M. Fuentes ; M. Aviles ; M.Y. Rios ; G. Zepeda ; M.G. Rojas (2003) Antifungal activities of nine traditional Mexican medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, v.87(1): 85-88.

NCCLS (2002) Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica de Fungos Filamentosos ; Norma Aprovada. NCCLS document M38-A (ISBN 1-56238-470-8).

NCCLS (2002). Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras ; Norma Aprovada— Segunda Edição. NCCLS document M27-A2 [ISBN 1-56238-469-4].

Ndhlala, A.R. ; K. Chitindingu ; C. Mupure ; T. Murenje ; F. Ndhlala ; M.A. Benhura ; M. Muchuweti (2008) Antioxidant properties of methanolic extracts from *Diospyros mespiliformis* (jackal berry), *Flacourtia indica* (Batoka plum), *Uapaca kirkiana* (wild loquat) and *Ziziphus mauritiana* (yellow berry) fruits. *International Journal of Food Science and Technology*, v.43: 284-288.

Newman, D. J. ; G. M. Cragg (2007) Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products*, v.70: 461–477.

Nicholas, D.D. ; D. Crawford (2003) Concepts in the Development of New Accelerated Test Methods for Wood Decay. *In: Wood Deterioration and Preservation*, American Chemical Society, Washington, DC, p. 288 – 312.

Nucci, M. ; K.A. Marr (2005) Emerging Fungal Diseases. *Clinical Infectious Diseases*, v.41: 521-526.

Office National des Forêts (2003) Code Forestier de Guyane. *Office National des Forêts*.

Ohkuma, M. (2003) Termite symbiotic systems: efficient bio-recycling of lignocellulose. *Applied Microbiology Biotechnology*. v.61: 1-9.

Ohmura, W. ; S. Doi ; M. Aoyama ; S. Ohara (2000) Antifeedant activity of flavonoids and related compounds against the subterranean termite *Coptotermes formosanus* Shiraki. *Journal of Wood Science*, v. 46: 149-153.

Ohnawa, M. ; Y Kuroda ; K. Katsuya ; H. Takei (1992) Ability of fungi inhabiting larch trunks with butt-rot to utilize wood components *in vitro*. *Journal of Japanese Forest Sciences*, 74: 300-307.

Oliveira, A.B. ; M. Iracema ; L.M. Madruga ; O.R. Gottlieb (1978) Isoflavonoids from *Myroxylon balsamum*. *Phytochemistry*, v.17 (3): 593 – 595.

Omar, S. ; B. Lemonnier ; N. Jones ; C. Ficker ; M.L. Smith ; C. Neema ; G.H.N. Towers ; K. Goel ; J.T. Arnason (2000) Antimicrobial activity of extracts of eastern North American hardwood trees and relation to traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, v.73(1-2): 161-170.

Onuorah, E.O. (2000) The wood preservative potentials of heartwood extracts of *Milicia excelsa* and *Erythrophleum suaveolens*. *Bioresource Technology*, v.75: 171-173.

Onuorah, E.O. (2002) Relative efficacy of heartwood extracts and proprietary wood preservatives as wood protectants. *Journal of Forestry Research*, v.13(3): 183-190.

Pacciaroni, A.V. ; M.A. Gette ; M. Derita ; L. Ariza-Espinar ; R.R. Gil ; S.A. Zacchino ; G.L. Silva (2008) Antifungal Activity of *Heterothalamus alienus* Metabolites. *Phytotherapy Research*, v.22: 524-528.

Paes, J.B. ; R.R. Melo ; C.R. Lima (2007) Natural resistance of seven woods to xylophagous fungi and termites under laboratory condition . *Cerne*, v.13(2): 160-169.

Paes, J.B. ; V.M. Morais ; D.W. de Farias Sobrinho ; O.A. Bakke (2004) Natural resistance of wood of nine Brazilian semi-arid region tree species to subterranean termites, under laboratory condition. *Cerne*, v.9(1): 36-47.

Pappas, P.G. ; J.H. Rex ; J. Lee ; R.J. Hamill ; R.A. Larsen ; W. Powderly ; C.A. Kauffman ; N. Hyslop ; J.E. Mangino ; S. Chapman ; H.W. Horowitz ; J.E. Edwards ; W.E. Dismukes (2003) A prospective observational study of candidemia: epidemiology, therapy, and influences on mortality in hospitalized adult and pediatric patients. *Clinical Infectious Diseases*, v.37: 634-643.

Park M.-J., K.S. Gwak ; I. Yang ; W.S. Choi ; H.J. Jo ; J.W. Chang ; E.B. Jeung ; I.G. Choi (2007) Antifungal Activities of the Essential Oils in *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. Et Perry and *Leptospermum petersonii* Bailey and their Constituents against Various Dermatophytes. *The Journal of Microbiology*, 460-465.

Park, B.-S. ; H.-K. Lee ; S.-E. Lee ; X.-L. Piao ; G.R. Takeoka ; R.Y. Wong ; Y.-J. Ahn. (2006) Antibacterial activity of *Tabebuia impetiginosa* Martius ex DC (Taheebo) against *Helicobacter pylori*. *Journal of Ethnopharmacology*, v.105(1-2): 255-262.

Pearce R.B. (1996) Tansley Review No. 87: Antimicrobial defences in the wood of living trees. *New Phytologist*, v. 132: 203-233.

Peres Filho, O. ; A. Dorval ; M.J. Duda ; R.G. Moura (2006) *Nasutitermes* sp. (Isoptera, Termitidae) response to extract from four Brazilian woods. *Scientia Florestalis*, v.71: 51-54.

Perez, H. ; F. Diaz ; J.D. Medina (1997) Chemical investigation and in vitro antimalarial activity of *Tabebuia ochracea* ssp. *Neochrysantha*. *International Journal of Pharmacognosy*, v.35(4): 227-231.

Peumans, W.J. ; E.J. Van Damme (1995) Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiology*, v.109(2): 347-352.

Pfitscher, A. ; E. Reitera ; A. Jungbauer (2008) Receptor binding and transactivation activities of red clover isoflavones and their metabolites. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, v.112 : 87–94.

Pinto, C.N., A.P. Dantas ; K.C.G De Moura ; F.S. Emery ; P.F. Polequevitch ; M.C.F.R. Pinto ; S.L. De Castro ; A.V. Pinto (2000) Chemical reactivity studies with naphthoquinones from *Tabebuia* with anti-trypanosomal efficacy. *Arzneimittel-Forschung/Drug Research*, v. 50(12): 1120-1128.

Plomion, C. ; G. Leprovost ; A. Stokes (2001) Wood Formation in Trees *Plant Physiology*, v.127: 1513-1523.

Pollet, C. ; B. Jourez ; J. Hébert (2008) Natural durability of black locust (*Robinia pseudoacacia*) wood grown in Wallonia, Belgium. *Canadian Journal of Forest Research*, v.38: 1366 - 1372.

Portillo, A. ; R. Vila ; B. Freixa ; E. Ferro ; T. Parella ; J. Casanova ; S. Cañigüeral (2005) Antifungal sesquiterpene from the root of *Vernonanthura tweedieana*. *Journal of Ethnopharmacology*, v.97(1): 49-52.

Portillo, A. ; R. Vila ; B. Freixa ; T. Adzet ; S. Canigüeral (2001) Antifungal activity of Paraguayan plants used in traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, v.76(1): 93-98.

Powell, M. ; L.M. Stephens ; L. Francis ; M.J. Kennedy (2000) Natural durability transfer from sawmill residues of white cypress (*Callitris glaucophylla*) ; 2: Laboratory fungal bioassays. Doc n° IRG/WP 00-20204. *The International Research Group on Wood Preservation*, Hawaii.

Preston, A.F. (2000) Wood preservation-Trends of today that will influence the industry tomorrow. *Forest Products Journal*, v.50(9): 12-19.

Pyun, M.-S. ; S. Shin (2006) Antifungal effects of the volatile oils from *Allium* plants against Trichophyton species and synergism of the oils with ketoconazole. *Phytomedicine*, v.13: 394-400.

Ragon, K.W. ; D.D. Nicholas ; T.P. Schultz (2008) Termite-Resistant heartwood: the effect of the non-biocidal antioxidant properties of the extractives (Isoptera: Rhinotermitidae). *Sociobiology*, v. 52 (1): 47-54.

Rao, M.M. and D.G.I. Kingston (1982) Plant anticancer agents. XII. Isolation and structure elucidation of new cytotoxic quinones from *Tabebuia cassinoides*. *Journal of Natural Products*, v.45 (5): 600-604.

Raška, M. ; J. Běláková ; M. Křupka ; E. Weigl (2007) Candidiasis-Do we need to fight or to tolerate the *Candida* fungus? *Folia Microbiologica*, v.52(3): 297-312.

Rasmann, S ; A.A. Agrawal (2009) Plant defense against herbivory: progress in identifying synergism, redundancy, and antagonism between resistance traits. *Current Opinion in Plant Biology*, 12:473-478.

Rayzal, M. (1998) Le bois: de l'arbre à l'ouvrage *In*: Guide de la Preservation du Bois. *Centre Technique du Bois et de l'Ameublement*, 3-4.

Ricker, M. ; G. Veen ; D.C. Daly ; L. Witte ; M. Sinta V. ; J. Chota I. ; F.-C. Czygan (1994) Alkaloid Diversity in Eleven Species of *Ormosia* and in *Clathrotropis macrocarpa* (Leguminosae -Papilionoideae). *Brittonia*, v.46(4) : 355 – 371.

Ríos, J.L. ; M.C. Recio (2005) Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, v.100: 80-84.

Rodrigues, A. ; M. Royer ; N. Amusant ; J. Beauchêne ; G. Herbette ; V. Eparvier ; A. Thibaut ; L.S. Espíndola ; B. Thibaut ; D. Stien (2009) Antinomic natural self-protection mechanism in long-lasting woods: a case study with three tropical species from French Guiana. Doc. N° IRG/WP 09-10696. *The International Research Group on Wood Protection*. Beijing, China.

Rojas, R. ; B. Bustamante ; J. Bauer ; I. Fernández ; J. Albán ; O. Locka (2003) Antimicrobial activity of selected Peruvian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, v.88: 199-204.

Royer, M. (2008) Les molécules responsables de la stabilité des bois: cas des bois tropicaux de Guyane. Thèse de doctorat, Université des Antilles et de la Guyane, Cayenne, France, 222p.

Royer, M. ; D. Stien ; J. Beauchêne ; G. Herbette ; J.P. McLean ; A. Thibaut ; B. Thibaut (2010) Extractives of the tropical wood wallaba (*Eperua falcata* Aubl.) as natural anti-swelling agents. *Holzforschung*, v.64: 211-215.

Sá, R.A. ; A.C.C. Argolo ; T.H. Napoleão, F.S. Gomes ; N.D.L. Santos ; C.M.L. Melo ; A.C. Albuquerque ; H.S. Xavier ; L.C.B.B. Coelho ; L.W. Bieber ; P.M.G. Paiva (2009a) Antioxidant, *Fusarium* growth inhibition and *Nasutitermes corniger* repellent activities of secondary metabolites from *Myracrodruon urundeuva* heartwood. *International Biodeterioration and Biodegradation*, v.63: 470-477.

Sá, R.A. ; F.S. Gomes ; T.H. Napoleão ; N.D.L. Santos ; C.M.L. Melo ; N.B. Gusmão ; L.C.B.B. Coelho ; P.M.G. Paiva ; L.W. Bieber (2009b) Antibacterial and antifungal activities of *Myracrodruon urundeuva* heartwood. *Wood Science and Technology*, v.43: 85-95.

Sá, R.A. ; T.H. Napoleão ; N.D.L. Santos ; F.S. Gomes ; A.C. Albuquerque ; H.S. Xavier ; L.C.B.B. Coelho ; L.W. Bieber ; P.M.G. Paiva (2008) Induction of mortality on *Nasutitermes corniger* (Isoptera, Termitidae) by *Myracrodruon urundeuva* heartwood lectin. *International Biodeterioration and Biodegradation*, v.62(4): 460-464.

Sanglard, D. ; F. C. Odds (2002) Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *Lancet Infectious Diseases*, v.2: 73–85.

Santana, A.L.B.D. ; C.A. Maranhão ; J.C. Santos ; F.M. Cunha ; G.M. Conceição ; L.W. Bieber ; M.S. Nascimento (2010) Antitermitic activity of extractives from three Brazilian

hardwoods against *Nasutitermes corniger*. *International Biodeterioration and Biodegradation*, v.64: 7-12.

Scheffer T.C. ; J.J. Morrell (1998) Natural durability of wood: a worldwide checklist of species. Forest Research Laboratory Research Contribution 22, Oregon State University, Corvallis, OR, 58pp.

Scheffrahn, R. H. (1991) Allelochemical resistance of wood to termites. *Sociobiology*, v.19(1): 257-282.

Schultz T. P. ; W. B. Harms ; T. H. Fischer ; K.D. McMurtrey ; J. Minn ; D. D. Nicholas (1995) Durability of angiosperm heartwood: the importance of extractives. *Holzforschung* 49: 29–34.

Schultz, T. P. ; D. D. Nicholas (2000) Naturally durable heartwood: evidence for a proposed dual defensive function of the extractives. *Phytochemistry*, v.54(1): 47-52.

Schultz, T.P., K. Ragon ; D.D. Nicholas (2008) A hypothesis on a second non-biocidal property of wood extractives, in addition to toxicity, that affects termite behavior and mortality. Doc n° IRG/WP 08-10638. *International Research Paper on Wood Preservation*, Stanbul, Turkey.

Schultz, T.P. ; D.D. Nicholas (2002) Development of environmentally-benign wood preservatives based on the combination of organic biocides with antioxidants and metal chelators. *Phytochemistry*, v.61: 555-560.

Schultz, T.P. ; D.D. Nicholas ; A.F. Preston (2007) A brief review of the past, present and future of wood preservation. *Pest Management Science*, v.63(8): 784-788.

Schultz, T.P. ; D.D. Nicholas ; G.T. Kirker ; M.L. Prewitt ; S.V. Diehl (2006) Effect of the antioxidant BHT on reducing depletion of chlorothalonil in treated wood after 54 months of ground-contact exposure. *International Biodeterioration and Biodegradation*, v.57: 45-50.

Schultz, T.P. ; T.F. Hubbard ; L. Jin ; T.H. Fisher ; D.D. Nicholas (1990) Role of stilbenes in the natural durability of wood: fungicidal structure-activity relationships. *Phytochemistry*, v. 29(5): 1501-1507.

Schulze, M. ; J. Grogan ; C. Uhl ; M. Lentini ; E. Vidal (2008) Evaluating ipê (*Tabebuia*, Bignoniaceae) logging in Amazonia: Sustainable management or catalyst for forest degradation? *Biological Conservation*, v.141: 2071-2085.

Schwarze, F.W.M.R. (2007) Wood decay under the microscope. *Fungal Biology Reviews*, v.21(4): 133-170.

Sekine, N. ; T. Ashitani ; T. Murayama, S. Shibutani, S. Hattori ; K. Takahashi (2009) Bioactivity of Latifolin and Its Derivatives against Termites and Fungi. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 57: 5707-5712.

Shai, L.J. ; L.J. McGaw ; P. Masoko ; J.N. Eloff (2008) Antifungal and antibacterial activity of seven traditionally used South African plant species active against *Candida albicans*. *South African Journal of Botany*, v.74(4): 677-684.

Shelton, T.G. ; K. Grace (2003) Chapter 13 - Termite Physiology in relation to wood degradation and termite control. *In* : Wood deterioration and preservation – advances in our world. 1° edition, 242 – 250.

Shi, J.L. ; D. Kocaefe ; T. Amburgey ; J. Zhang (2007) A comparative study on brown-rot fungus decay and subterranean termite resistance of thermally-modified and ACQ-C-treated wood. *Holz als Roh-und Werkstoff*, v.65(5): 353-358.

Shibutani, S. ; K. Takata ; S. Doi (2007) Quantitative comparisons of antitermite extractives in heartwood from the same clones of *Cryptomeria japonica* planted at two different sites. *Journal of Wood Science*, v. 53: 285-290.

Shin, J.J. ; J.S. Kim ; S.J. Han ; M.J. Ha ; H.M. Lee (2003) Pesticide formulation composed of natural components-WO 03/037 087.

Silva, B.P. ; L.S.M. Velozo ; J.P. Parente (2000) Biochanin A triglycoside from *Andira inermis*. *Fitoterapia*, v.71(6): pp. 663-667.

Silva, C.A. ; M.B.B. Monteiro ; S. Brazolin ; G.A.C. Lopez ; A. Richter ; M.R. Braga (2007) Biodeterioration of brazilwood *Caesalpinia echinata* Lam. (Leguminosae-Caesalpinioideae) by rot fungi and termites. *International Biodeterioration and Biodegradation*, v.60(4): 285-292.

Silva, V.C. ; A.N. Alves ; A. Santana ; M.G. Carvalho (2006) Constituintes fenólicos e terpenóides isolados das raízes de *Andira fraxinifolia* (Fabaceae). *Química Nova*, v.29 (6): 1184-1186.

Silva, V.C. ; M.G. De Carvalho ; H.R. Borba ; S.L.C. Silva (2008) Anthelmintic activity of flavonoids isolated from roots of *Andira anthelmia* (Leguminosae). *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v.18(4): 573-576.

Smith, S. (2000) Pesticide Formulation AU. Patent N° 00/04780.

Sreelatha, T., A. Hymavathi ; J.M. Murthy ; P.U. Rani ; J.M. Rao ; K.S. Babu (2010) Bioactivity-guided isolation of mosquitocidal constituents from the rhizomes of *Plumbago capensis* Thunb. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* v.20(9): 2974-2977.

Stafford, H.A. (1997) Roles of Flavonoids in Symbiotic and Defense Functions in Legume Roots. *Botanical Review*, v.63 (1) : 27 – 39.

Stevenson, P.C. ; H.C. Turner ; M. P. Haware (1997) Phytoalexin accumulation in the roots of chickpea (*Cicer arietinum* L.) seedlings associated with resistance to fusarium wilt (*Fusarium oxysporum* f.sp. ciceri). *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v.50 : 167 – 178.

Strippoli, V. ; F.D. D'Auria ; M. Tecca ; A. Callari ; G. Simonetti (2000) Propyl gallate increases in vitro antifungal imidazole activity against *Candida albicans*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v.16: 73-76.

Stürtz, M. ; V. Lander ; W. Schmidt ; P. Winterhalter (2006) Preparative isolation of isoflavones from soy and red clover. *Molecular Nutrition & Food Research*, v.50 : 356 – 361.

Su, A. B.-N. ; B.Y. Hwang ; H. Chai ; E.J. Carcache-Blanco ; L.B.S. Kardono ; J.J. Afriastini ; S. Riswan ; R. Wild ; N. Laing ; N.R. Farnsworth ; G.A. Cordell ; S.M. Swanson ; A.D. Kinghorn (2004) Activity-guided fractionation of the leaves of *Ormosia sumatrana* using a proteasome inhibition. *Journal of Natural Products*, v.67: 1911-1914.

Sullivan, G. (1982) Occurrence of Umbelliferone in the Seeds of *Dipteryx odorata* (Aubl.) Willd. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.30 : 609 – 610.

Suzuki, M.R. ; C.G. Hunt ; C.J. Houtman ; Z.D. Dalebroux ; K.E. Hammel (2006) Fungal hydroquinones contribute to brown rot of wood. *Environmental Microbiology*, v.8(12): 2214-2223.

Svetaz, L. ; F. Zuljana ; M. Derita ; E. Petenatti ; G. Tamayo ; A. Cáceres ; V.Cechinel Filho ; A. Giménez ; R. Pinzón ; S.A. Zacchino ; M. Gupta (2010) Value of the ethnomedical information for the discovery of plants with antifungal properties. A survey among seven Latin American countries. *Journal of Ethnopharmacology*, v.127: 137-158.

Taylor, A.M. ; B.L. Gartner ; J.J. Morrell (2002) Heartwood Formation and Natural Durability-A review. *Wood and Fiber Science*, v.34: 587-611.

Taylor, A.M. ; B.L. Gartner ; J.J. Morrell ; K. Tsunoda (2006) Effects of heartwood extractive fractions of *Thuja plicata* and *Chamaecyparis nootkatensis* on wood degradation by termites or fungi. *Journal of Wood Science*, v.52(2): 147-153.

Tempete, C. ; G. H. Werner ; F. Favre ; A. Rojas ; N. Langlois (1995) *In vitro* cytostatic activity of 9-demethoxypropothramycin. *Bulletin European Journal of Medicinal Chemistry*, v.30: 647–650.

Thévenon, M-F ; C. Roussel ; J-P Haluk (2001) Possible durability transfer from durable to non durable wood species: The study case of teak wood. *International Research Group on Wood Protection*. IRG/WP 01-10392, 6 p.

Thijs, L. ; B. Zwanenburg (2004) Rubrenolide, total synthesis and revision of its reported stereochemical structure. *Tetrahedron*, v.60 : 5237 – 5252.

Thulasidas, P.K. ; K.M. Bhat (2007) Chemical extractives compounds determining the brown-rot decay resistance of teak wood. *Holz Roh Werkst*, v. 65: 121-124.

Tuor, U. ; K. Winterhalter ; A. Fiechter (1995) Enzymes of white-rot fungi involved in lignin degradation and ecological determinants for wood decay. *Journal of Biotechnology*, v.41(1): 1-17.

Veitch, N. (2007) Isoflavonoids of the Leguminosae. *Natural Products Reports*, v.24 : 417–464.

Verma, M. ; S. Sharma ; R. Prasad (2009) Biological alternatives for termite control: A review. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v.63: 959–972.

Vermout, S. ; J. Tabart ; A. Baldo ; A. Mathy ; B. Losson ; B. Mignon (2008) Pathogenesis of Dermatophytosis. *Mycopathologia*, v.166: 267 – 275.

Vidal-Tessier, A.M. ; P. Delaveau ; B. Champion ; H. Jacquemin (1988) Lipophilic quinones of *Tabebuia serratifolia* (Vahl.) Nichols trunk wood. *Annales Pharmaceutiques Francaises*, v.46: 55-57.

Vincent, J.-L. ; Anaissie, E. ; Bruining, H. ; Demajo, W. ; El-Ebiary, M. ; Haber, J. ; Hiramatsu, Y. ; Nitenberg, G. ; Nyström, E-O. ; Pittet, D. ; Rogers, T. ; Sandven, E. ; Sganga, G. ; Schaller, M.-D. ; Solomkin (1998) epidemiology, diagnosis and treatment of systemic Candida infection in surgical patients under intensive care. *Journal of Intensive Care Medicine*, v.24: 206 - 216.

Walsh, T. J. ; R.W. Finberg ; C. Arndt ; J. Hiemenz ; C. Schwartz ; D. Bodensteiner ; P. Pappas ; N. Seibel ; R.N. Greenberg ; S. Dummer ; M. Schuster ; J.S. Holcenberg (1999) Liposomal Amphotericin B for Empirical Therapy in Patients with Persistent Fever and Neutropenia. *The New England Journal of Medicine*, v.340: 764 - 771.

Wang, S.Y. ; P.F. Chen ; S.T. Chang (2005) Antifungal activities of essential oils and their constituents from indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*) leaves against wood decay fungi. *Bioresource and Technology*, v. 96: 813-818.

Wanjala, C.C.W. ; B.F. Juma ; G. Bojase ; B.A. Gashe ; R.R.T. Majinda (2002) Erythrinaline alkaloids and antimicrobial flavonoids from *Erythrina latissima*. *Planta Medica*, v.68: 640–642.

Warnock, D.W. (2007) Trends in the epidemiology of invasive fungal infections. *Japanese Journal of Medical Mycology*, v.48(1): 1-12.

Watanabe, Y. ; R. Mihara ; T. Mitsunaga ; T. Yoshimura (2005) Termite repellent sesquiterpenoids from *Callitris glaucophylla* heartwood. *Journal of Wood Science*, v.51(5): 514-519.

Webster D. ; P. Taschereau ; R.J. Belland ; C. Sand ; R.P. Rennie (2008) Antifungal activity of medicinal plant extracts ; preliminary screening studies. *Journal of Ethnopharmacology*, v.115: 140-146.

Weig, M. ; A.J.P. Brown (2007) Genomics and the development of new diagnostics and anti-*Candida* drugs. *Trends in Microbiology*, v.15(7): 310-317.

Weitzman, I. ; R.C. Summerbell (1995) The dermatophytes. *Clinical Microbiology Reviews*, v.8(2): 240-259.

White, J.F. (2003) Insect repellent-US 2003/0 224 029.

Yamamoto, K. ; L. T. Hong (1988) Decay resistance of extractives from chengal (*Neobalanocarpus heimii*). *Journal of Tropical Forest Science*, v.1(1) : 51 – 55.

Yang, D.-Q. (2009) Potential utilization of plant and fungal extracts for wood protection. *Forest products journal*, v. 59 (4): 97-103.

Yen T.B. and S.T. Chang (2008a) Synergistic effects of cinnamaldehyde in combination with eugenol against wood decay fungi. *Bioresource Technology*, v.99: 232-236.

Yen, T.-B. ; H.-T. Chang ; C.-C. Hsieh ; S.-T. Chang (2008b) Antifungal properties of ethanolic extract and its active compounds from *Calocedrus macrolepis* var. *formosana* (Florin) heartwood. *Bioresource Technology*, v.99: 4871-4877.

Yoon, J. S. ; S. H. Sung ; J. H. Park ; Y. C. Kim (2004) Flavonoids from *Spatholobus suberectus*. *Archives of Pharmacal Research*, v.27 (6): 589-592.

Zhang, J.-W. ; J.-M. Gao ; T. Xua ; X.-C. Zhang ; Y.-T. Maa ; S. Jarussophon ; Y. Konishi (2009) Antifungal Activity of Alkaloids from the Seeds of *Chimonanthus praecox*. *Chemistry & Biodiversity*, v.6 : 838 – 845.

Anexos

Anexo 1 – Espécies sul americanas para as quais a resistência natural aos fungos lignívoros, aos cupins ou às brocas marinhas foi descrita.

TR = Très résistant, R = Résistant et NR = Non résistant.

Espèce	Champignons	Termites	Crustacés	Référence
<i>Aldina heterophylla</i>	NR/TR	R		de Jesus et <i>al.</i> , 1998 ; Tropix Database
<i>Alexa grandiflora</i>	R	R		Tropix Database
<i>Amburana cearensis</i>	TR	R		Paes et <i>al.</i> , 2004 ; Tropix Database
<i>Anacardium excelsum</i>	NR	NR		Bultman & Southwell, 1976
<i>Anacardium giganteum</i>	TR	NR		de Jesus et <i>al.</i> , 1998
<i>Anadenantera macrocarpa</i>	TR	-		Paes et <i>al.</i> , 2004
<i>Andira inermis</i>	NR	NR		Bultman & Southwell, 1976
<i>Andira parviflora</i>	NR	R		de Jesus et <i>al.</i> , 1998
<i>Andira spp.</i>	R	TR		Tropix Database
<i>Apuleia leiocarpa</i>	R	R		Tropix Database ; Carneiro et <i>al.</i> , 2009
<i>Araucaria angustifolia</i>	NR	NR		Tropix Database
<i>Aspidosperma desmanthum</i>	R		NR	Alves et <i>al.</i> , 2006 ; Borges et <i>al.</i> , 2008
<i>Aspidosperma megalocarpon</i>	NR	NR		Bultman & Southwell, 1976
<i>Aspidosperma obscurinervium</i>	NR	NR		de Jesus et <i>al.</i> , 1998
<i>Aspidosperma pyriformium</i>	TR	TR		Paes et <i>al.</i> , 2004
<i>Aspidosperma spp.</i>	TR	NR		Tropix Database
<i>Astronium balansae</i>	TR	R		Tropix Database
<i>Astronium gracile</i>	TR			Carneiro et <i>al.</i> , 2009
<i>Astronium graveolens</i>	NR	NR		Bultman & Southwell, 1976
<i>Astronium le-cointei</i>			NR	Borges et <i>al.</i> , 2008
<i>Astronium sp.</i>	TR			Alves et <i>al.</i> , 2006
<i>Avicennia marina</i>	NR	NR		Bultman & Southwell, 1976
<i>Bagassa guianensis</i>	TR	R		Tropix Database ; Carneiro et <i>al.</i> , 2009

<i>Balfourodendron riedelianum</i>	R	NR	Tropix Database	
<i>Bertholletia excelsa</i>	R	R	Tropix Database	
<i>Bombacopsis quinata</i>	NR	TR	Bultman & Southwell, 1976	
<i>Bombacopsis sessilis</i>	NR	NR	Bultman & Southwell, 1976	
<i>Bowdichia nitida</i>	NR	R	NR	Borges et al., 2008 ; Tropix Database
<i>Brosimum acutifolium</i>	NR		Carneiro et al., 2009	
<i>Brosimum paranarioides</i>	NR		Carneiro et al., 2009	
<i>Brosimum rubescens</i>	NR	R	Tropix Database	
<i>Brosimum sp</i>	NR	NR	Bultman & Southwell, 1976	
<i>Brosimum utile</i>	NR	NR	Tropix Database	
<i>Buchenavia oxycarpa</i>	TR	TR	de Jesus et al., 1998	
<i>Buchenavia sp.</i>	R	NR	Tropix Database	
<i>Bursera simaruba</i>	NR	NR	Bultman & Southwell, 1976	
<i>Byrsonima crassifolia</i>	NR	NR	Bultman & Southwell, 1976	
<i>Callitris glauca</i>	R	TR	Bultman & Southwell, 1976	
<i>Calophyllum brasiliense</i>	NR	TR/NR	Carter & Camargo, 1983 ; Tropix Database ; Bultman & Southwell, 1976	
<i>Carapa guianensis</i>	R	TR/NR	Carter & Camargo, 1983 ; Tropix Database	
<i>Carapa slateri</i>	NR	NR	Bultman & Southwell, 1976	
<i>Cariniana brasiliensis</i>	NR	R	Tropix Database	
<i>Cariniana pyriformis</i>	R/NR	TR/R	Tropix Database ; Bultman & Southwell, 1976	
<i>Caryocar brasiliense</i>		TR	Gonçalves & Oliveira, 2006	
<i>Caryocar costaricense</i>	R	R	Bultman & Southwell, 1976	
<i>Caryocar glabrum</i>	R	R	Tropix Database	
<i>Caryocar villosum</i>	TR		NR	Borges et al., 2008 ; Carneiro et al., 2009
<i>Cassia moschata</i>	R	R	Bultman & Southwell, 1976	
<i>Cedrela fissilis</i>		TR	Gonçalves & Oliveira, 2006	
<i>Cedrela mexicana</i>	NR	NR	Bultman & Southwell, 1976	
<i>Cedrela odorata</i>	R/NR	TR/NR	Carter & Camargo, 1983 ; Tropix Database ; Carneiro et al., 2009	
<i>Cedrelinga catenaeformis</i>	R	NR	Tropix Database	
<i>Centrolobium orinocense</i>	R	R	Bultman & Southwell, 1976	

<i>Chamaecrista duartei</i>			NR	Borges et al., 2008
<i>Chlorocardium rodiei</i>	TR	R	R	Borges et al., 2008 ; Tropix Database
<i>Chlorophora tinctoria</i>	TR	TR		Bultman & Southwell, 1976
<i>Chrysophyllum cainito</i>	NR	NR		Bultman & Southwell, 1976
<i>Chrysophyllum lucentifolium</i>	NR	NR		Tropix Database
<i>Clarisia racemosa</i>	TR	TR	NR	de Jesus et al., 1998 ; Borges et al., 2008 ; Tropix Database
<i>Clarisia racemosa</i>	TR			Carneiro et al., 2009
<i>Cocus nucifera</i>	NR	NR		Tropix Database
<i>Colubrina gladulosa</i>	TR	TR		Bultman & Southwell, 1976
<i>Conocarpus erectus</i>	R	TR		Bultman & Southwell, 1976
<i>Copaifera aromatica</i>	R	TR		Bultman & Southwell, 1976
<i>Copaifera duckei</i>	NR	NR		Tropix Database
<i>Copaifera multijuga</i>		TR		Carter & Camargo, 1983
<i>Cordia alliodora</i>	NR	NR		Bultman & Southwell, 1976
<i>Cordia goeldiana</i>	NR	R		Tropix Database ; Carneiro et al., 2009
<i>Cordia trichotoma</i>	TR	TR		Paes et al., 2007
<i>Cornus disciflora</i>	NR	NR		Bultman & Southwell, 1976
<i>Coumarouna oleifera</i>	NR	R		Bultman & Southwell, 1976
<i>Couratari guianensis</i>	NR	R		de Jesus et al., 1998
<i>Couratari multiflora</i>	NR			Carneiro et al., 2009
<i>Couratari sp.</i>	NR	NR		Tropix Database
<i>Couropita subsessilis</i>		R		Carter & Camargo, 1983
<i>Couroupita spp.</i>	NR	NR		Tropix Database
<i>Croton panamensis</i>	NR	NR		Bultman & Southwell, 1976
<i>Croton sonderianus</i>	R	R		Paes et al., 2007
<i>Dacryodes excelsa</i>	NR	NR		Tropix Database
<i>Dalbergia retusa</i>	TR	TR		Bultman & Southwell, 1976
<i>Dialium guianense</i>	NR	NR		Bultman & Southwell, 1976
<i>Dialyanthera otoba</i>	NR	NR		Bultman & Southwell, 1976
<i>Dicorynia guianensis</i>	R	R	R	Borges et al., 2008 ; Tropix Database

<i>Dicorynia paraensis</i>	R	R		Bultman & Southwell, 1976
<i>Dimorphandra polyandra</i>	R	R		Tropix Database
<i>Dinizia excelsa</i>	TR	TR	NR	de Jesus et al., 1998 ; Borges et al., 2008 ; Tropix Database
<i>Diphysa robinoides</i>	TR	TR		Bultman & Southwell, 1976
<i>Diploptropis purpurea</i>	NR/TR	NR		de Jesus et al., 1998 ; Carneiro et al., 2009
<i>Diploptropis</i> spp.		TR		Carter & Camargo, 1983
<i>Dipteryx odorata</i>	TR	TR	NR	de Jesus et al., 1998 ; Borges et al., 2008 ; Carneiro et al., 2009
<i>Dipteryx polyphylla</i>	TR	TR		de Jesus et al., 1998
<i>Dipteryx</i> spp.	TR	R		Tropix Database
<i>Endlicheria formosa</i>	TR	TR		de Jesus et al., 1998
<i>Enterolobium contortisiliquum</i>	NR	NR		Tropix Database
<i>Enterolobium cyclocarpum</i>	NR	NR		Bultman & Southwell, 1976
<i>Enterolobium schomburgkii</i>	TR	TR	TR	de Jesus et al., 1998 ; Borges et al., 2008 ; Tropix Database
<i>Eperua falcata</i>	TR	R		Tropix Database
<i>Eperua</i> sp.	TR	TR		de Jesus et al., 1998
<i>Erisma uncinatum</i>	R/NR	NR		Tropix Database ; Carneiro et al., 2009
<i>Erythrina glauca</i>	NR	NR		Bultman & Southwell, 1976
<i>Eschweilera decolarans</i>	R	NR		de Jesus et al., 1998
<i>Eschweilera sagotiana</i>	TR	TR		de Jesus et al., 1998
<i>Eschweilera</i> sp.	NR	NR		Bultman & Southwell, 1976
<i>Euxylophora paraensis</i>	TR	R		Tropix Database
<i>Genipa americana</i>	NR	NR		Bultman & Southwell, 1976
<i>Gliricidia sepium</i>	TR	TR		Bultman & Southwell, 1976
<i>Goupia glabra</i>	R	TR	R	Gonçalves & Oliveira, 2006 ; Borges et al., 2008 ; Tropix Database
<i>Guajacum officinale</i>	TR	TR		Bultman & Southwell, 1976
<i>Guarea longipetiola</i>	NR	NR		Bultman & Southwell, 1976
<i>Hieronima alchorneoides</i>	NR	NR		Bultman & Southwell, 1976
<i>Hippomane mancinella</i>	NR	NR		Bultman & Southwell, 1976
<i>Holopyxidium</i> sp.	TR	TR		de Jesus et al., 1998
<i>Hura crepitans</i>	NR	NR		Tropix Database ; Bultman & Southwell, 1976

<i>Hymenaea courbaril</i>	NR/R*/TR**	R/TR*	R	de Jesus et al., 1998 ; Borges et al., 2008 ; Tropix Database ; Bultman & Southwell, 1976* ; Carneiro et al., 2009**
<i>Hymenolobium excelsum</i>	NR	NR		de Jesus et al., 1998
<i>Hymenolobium petraeum</i>	NR			Carneiro et al., 2009
<i>Hymenolobium pulcherrimum</i>	NR	NR		de Jesus et al., 1998
<i>Hymenolobium sericeum</i>	NR	NR		de Jesus et al., 1998
<i>Hymenolobium spp.</i>	R	NR		Tropix Database
<i>Inga alba</i>	NR	NR		Tropix Database
<i>Iryanthera sp.</i>	TR	TR		de Jesus et al., 1998
<i>Jacaranda copaia</i>	NR	R		de Jesus et al., 1998 ; Tropix Database ; Carneiro et al., 2009
<i>Laetia procera</i>	NR			Carneiro et al., 2009
<i>Lafoensia puniceifolia</i>	NR	R		Bultman & Southwell, 1976
<i>Laguncularia racemosa</i>	NR	NR		Bultman & Southwell, 1976
<i>Lecythis ampla</i>	R	R		Bultman & Southwell, 1976
<i>Lecythis pisonis</i>	TR	TR		Tropix Database
<i>Lecythis poiteaui</i>			NR	Borges et al., 2008
<i>Lecythis prancei</i>			NR	Borges et al., 2008
<i>Leucaena leucocephala</i>	TR	NR		Paes et al., 2007
<i>Licania arborea</i>	NR	NR		Bultman & Southwell, 1976
<i>Licaria canela</i>	TR	TR		de Jesus et al., 1998
<i>Licaria pittieri</i>	NR	NR		Bultman & Southwell, 1976
<i>Licaria sp.</i>	TR	TR		de Jesus et al., 1998
<i>Lophira procera</i>	NR	R		Bultman & Southwell, 1976
<i>Luehea seemannii</i>	NR	NR		Bultman & Southwell, 1976
<i>Magnolia sororum</i>	NR	NR		Bultman & Southwell, 1976
<i>Manilkara bidentata</i>	TR/R	R/TR	NR	Borges et al., 2008 ; Tropix Database
<i>Manilkara bidentata</i>	R	TR		Bultman & Southwell, 1976
<i>Manilkara huberi</i>	NR/TR	NR		de Jesus et al., 1998 ; Carneiro et al., 2009
<i>Maquira coriacea</i>	NR	NR		Tropix Database
<i>Marmaroxylon racemosum</i>	TR			Alves et al., 2006

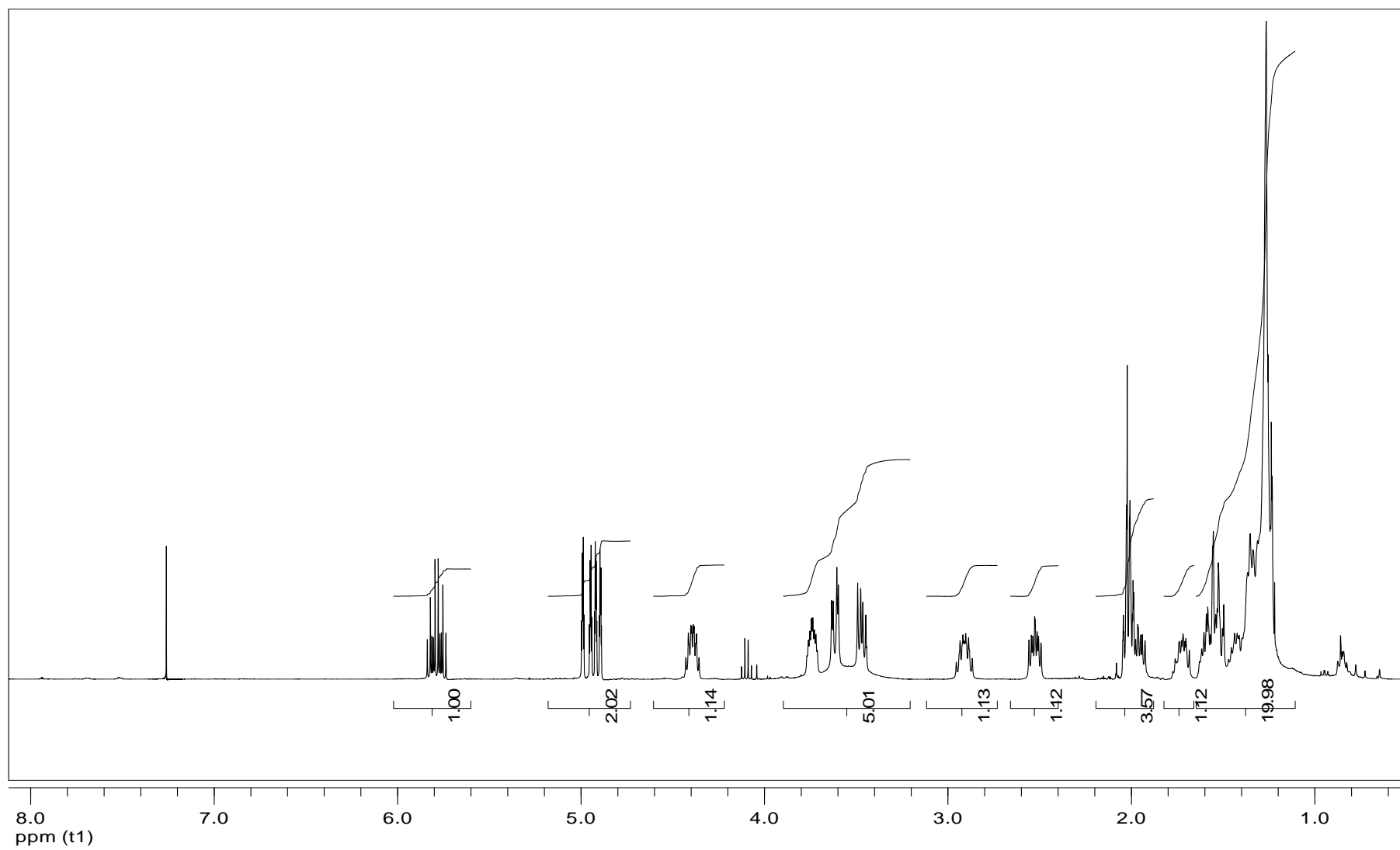
<i>Mezilaurus itauba</i>	TR	TR	NR	Carter & Camargo, 1983 ; de Jesus et al., 1998 ; Borges et al., 2008 ; Tropix Database ; Carneiro et al., 2009
<i>Mezilaurus</i> sp.	TR	TR		de Jesus et al., 1998
<i>Micandra siphonioides</i>		NR		Carter & Camargo, 1983
<i>Micropholis</i> spp.	NR	NR		Tropix Database
<i>Mimosa caesalpiniiifolia</i>	TR	TR		Paes et al., 2007
<i>Mimosa tenuiflora</i>	TR	TR		Paes et al., 2007
<i>Minquartia guianensis</i>	R	TR	TR	Borges et al., 2008 ; Bultman & Southwell, 1976
<i>Mora excelsa</i>	TR	TR		Tropix Database
<i>Mora oleifera</i>	NR	NR		Bultman & Southwell, 1976
<i>Moronobea coccinea</i>	TR	NR		Tropix Database
<i>Mouriri callocarpa</i>	TR			Alves et al., 2006
<i>Myracrodouon urundeuva</i>	TR	TR		Paes et al., 2004
<i>Myroxylon balsamum</i>	NR	R		Bultman & Southwell, 1976
<i>Nectandra rubra</i>	TR	TR	TR	de Jesus et al., 1998 ; Borges et al., 2008
<i>Nectandra</i> sp.	NR	NR		Tropix Database
<i>Nectandra whitei</i>	NR	NR		Bultman & Southwell, 1976
<i>Ochroma pyramidale</i>	NR	NR		Tropix Database
<i>Ocotea cymbarum</i>	TR	TR		Carter & Camargo, 1983 ; de Jesus et al., 1998
<i>Ocotea dendrodaphne</i>	R	TR		Bultman & Southwell, 1976
<i>Ocotea fragrantissima</i>			NR	Borges et al., 2008
<i>Ocotea porosa</i>	R	R		Tropix Database
<i>Ocotea rodiei</i>	TR	TR		Bultman & Southwell, 1976
<i>Ormosia coccinea</i>	R	NR		Tropix Database
<i>Paramachaerium gruberi</i>	NR	NR		Bultman & Southwell, 1976
<i>Parinari excelsa</i>	TR			Alves et al., 2006
<i>Parinari montana</i>	NR	R		de Jesus et al., 1998
<i>Parkia multijuga</i>	NR	TR		de Jesus et al., 1998 ; Tropix Database ; Carneiro et al., 2009
<i>Parkia nitida</i>	NR	TR		de Jesus et al., 1998
<i>Parkia</i> sp.	NR	NR		de Jesus et al., 1998

<i>Pelliciera rhizophorae</i>	NR	NR		Bultman & Southwell, 1976
<i>Peltogyne catingae</i>	TR	TR		de Jesus et al., 1998
<i>Peltogyne paniculata</i>	TR			Alves et al., 2006
<i>Peltogyne purpurea</i>	NR	NR		Bultman & Southwell, 1976
<i>Peltogyne sp.</i>	R	TR	NR	Borges et al., 2008 ; Tropix Database
<i>Peniaclethra macroloba</i>	NR	NR		Bultman & Southwell, 1976
<i>Phoebe johnstonii</i>	NR	NR		Bultman & Southwell, 1976
<i>Pinus caribea</i>	NR	NR		Bultman & Southwell, 1976
<i>Pinus patula</i>	NR	NR		Tropix Database
<i>Piptadenia macrocarpa</i>		TR		Paes et al, 2004
<i>Piptadenia suaveolens</i>	TR	TR		de Jesus et al., 1998
<i>Pithecellobium mangense</i>	R	TR		Bultman & Southwell, 1976
<i>Pithecellobium racemosum</i>	NR	R		de Jesus et al., 1998
<i>Platymiscium pinnatum</i>	R	R/TR		Tropix Database ; Bultman & Southwell, 1976
<i>Platonia insignis</i>	R	R		Tropix Database
<i>Platymiscium ulei</i>		TR		Carter & Camargo, 1983
<i>Pouteria campechiana</i>	NR	NR		Bultman & Southwell, 1976
<i>Pouteria guianensis</i>			NR	Borges et al., 2008
<i>Pouteria pachycarpa</i>	NR			Carneiro et al., 2009
<i>Prioria copaifera</i>	NR	NR		Bultman & Southwell, 1976
<i>Prosopis juliflora</i>	R	R		Paes et al, 2004
<i>Protium spp.</i>	NR	NR		Tropix Database
<i>Protium tenuifolium</i>	TR	TR		de Jesus et al., 1998
<i>Pseudopiptadenia psilostachya</i>	R	R		Tropix Database
<i>Pseudotsuga menziesii</i>	NR	NR		Bultman & Southwell, 1976
<i>Qualea sp.</i>	R	NR		de Jesus et al., 1998 ; Tropix Database
<i>Quercus robur</i>			NR	Borges et al., 2008
<i>Rhizophora brevistyla</i>	NR	NR		Bultman & Southwell, 1976
<i>Sacoglottis guianensis</i>	NR	R	TR	de Jesus et al., 1998 ; Borges et al., 2008
<i>Schefflera morototoni</i>	NR	NR		Tropix Database

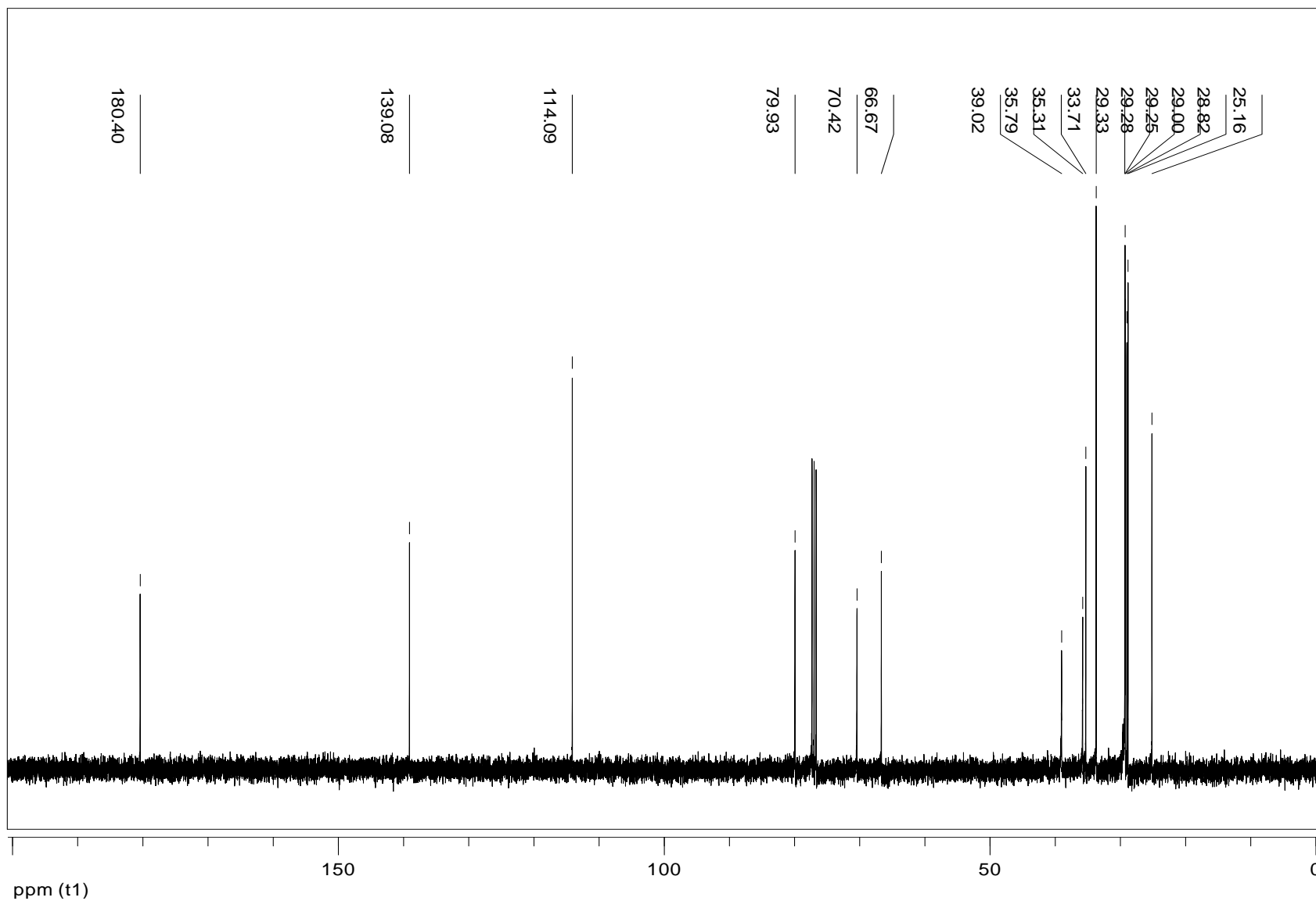
<i>Schinopsis brasiliensis</i>	TR	TR	Paes et al, 2004
<i>Schizolobium parahyba</i>		NR	Gonçalves & Oliveira, 2006
<i>Sclerolobium sp.</i>	NR	TR/NR	de Jesus et al., 1998 ; Tropix Database
<i>Scleronema micranthum</i>	NR	R/NR	de Jesus et al., 1998 ; Tropix Database
<i>Senna siamea</i>	TR	TR	Paes et al, 2004
<i>Sextonia rubra</i>	NR/TR	R	Tropix Database ; Carneiro et al., 2009
<i>Shorea sp.</i>		R	Borges et al., 2008
<i>Simarouba amara</i>	NR	NR	Tropix Database ; Carneiro et al., 2009
<i>Sterculia apetala</i>	NR	NR	Tropix Database ; Bultman & Southwell, 1976
<i>Swartzia grandifolia</i>	TR	R	Tropix Database
<i>Swartzia ingaefolia</i>	TR	TR	de Jesus et al., 1998
<i>Swartzia panacoco</i>	TR	R	Tropix Database
<i>Swartzia panamensis</i>	R	TR	Bultman & Southwell, 1976
<i>Sweetia nitens</i>		TR	Carter & Camargo, 1983
<i>Sweetia panamensis</i>	NR	NR	Bultman & Southwell, 1976
<i>Swietenia macrophylla</i>	NR/R	NR/TR	Tropix Database ; Bultman & Southwell, 1976
<i>Symphonia globulifera</i>	NR	NR	Tropix Database ; Bultman & Southwell, 1976
<i>Tabebuia aurea</i>	R	-	Paes et al, 2004
<i>Tabebuia chrysantha</i>	R	TR	Bultman & Southwell, 1976
<i>Tabebuia guayacan</i>	R	TR	R Borges et al., 2008 ; Bultman & Southwell, 1976
<i>Tabebuia impetiginosa</i>	TR	TR	Paes et al, 2004
<i>Tabebuia incana</i>	TR		Carneiro et al., 2009
<i>Tabebuia pentaphylla</i>	NR	NR	Bultman & Southwell, 1976
<i>Tabebuia sp.</i>	TR	TR	Tropix Database
<i>Tachigalia myrmecophylla</i>		TR	Gonçalves & Oliveira, 2006
<i>Tachigalia sp.</i>	R	NR	de Jesus et al., 1998
<i>Tectona grandis</i>	TR	TR	Paes et al., 2007
<i>Terminalia amazonica</i>	NR	NR	Bultman & Southwell, 1976
<i>Terminalia cattapa</i>	NR	NR	Bultman & Southwell, 1976
<i>Terminalia myriocarpa</i>	NR	NR	Bultman & Southwell, 1976

<i>Ternstroemia seemanii</i>	NR	NR	Bultman & Southwell, 1976
<i>Tetragastris altissima</i>	NR	R	Tropix Database
<i>Tetragastris panamensis</i>	NR	NR	Bultman & Southwell, 1976
<i>Tetrathylacium johansenii</i>	NR	NR	Bultman & Southwell, 1976
<i>Toona ciliata</i>		TR	Gonçalves & Oliveira, 2006
<i>Trattinickia aspera</i>	NR	NR	Bultman & Southwell, 1976
<i>Trattinickia rhoifolia</i>	NR		Carneiro et al., 2009
<i>Trichilia tuberculata</i>	NR	NR	Bultman & Southwell, 1976
<i>Vateirea guianensis</i>	R	R	Tropix Database
<i>Vateirea paraensis</i>	TR		Carneiro et al., 2009
<i>Virola caducifolia</i>	NR		Carneiro et al., 2009
<i>Virola sp.</i>	NR	NR	Tropix Database
<i>Vitex floridula</i>	NR	NR	Bultman & Southwell, 1976
<i>Vochysia ferruginea</i>	NR	NR	Bultman & Southwell, 1976
<i>Vochysia guianensis</i>	TR	NR	de Jesus et al., 1998
<i>Vochysia maxima</i>	TR/NR	NR	de Jesus et al., 1998 ; Carneiro et al., 2009
<i>Vochysia sp.</i>	NR	NR	Tropix Database
<i>Vouacapoua americana</i>	TR	R	Tropix Database ; Bultman & Southwell, 1976
<i>Zanthoxylum belizense</i>	NR	NR	Bultman & Southwell, 1976
<i>Zygia racemosa</i>	R	TR	Tropix Database

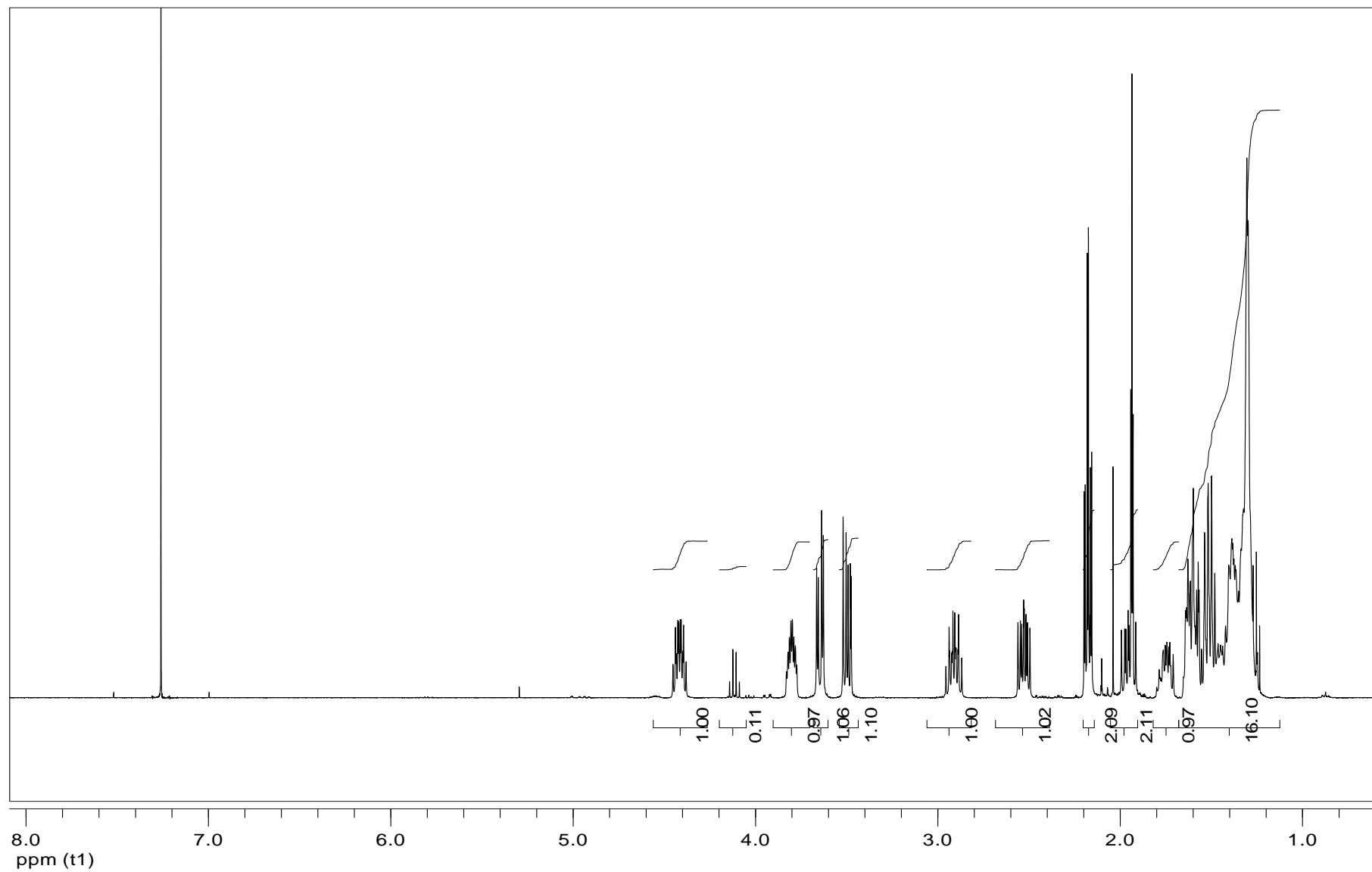
Anexo 2 - Espectros de RMN ^1H do rubrenolídeo (1) em CDCl_3



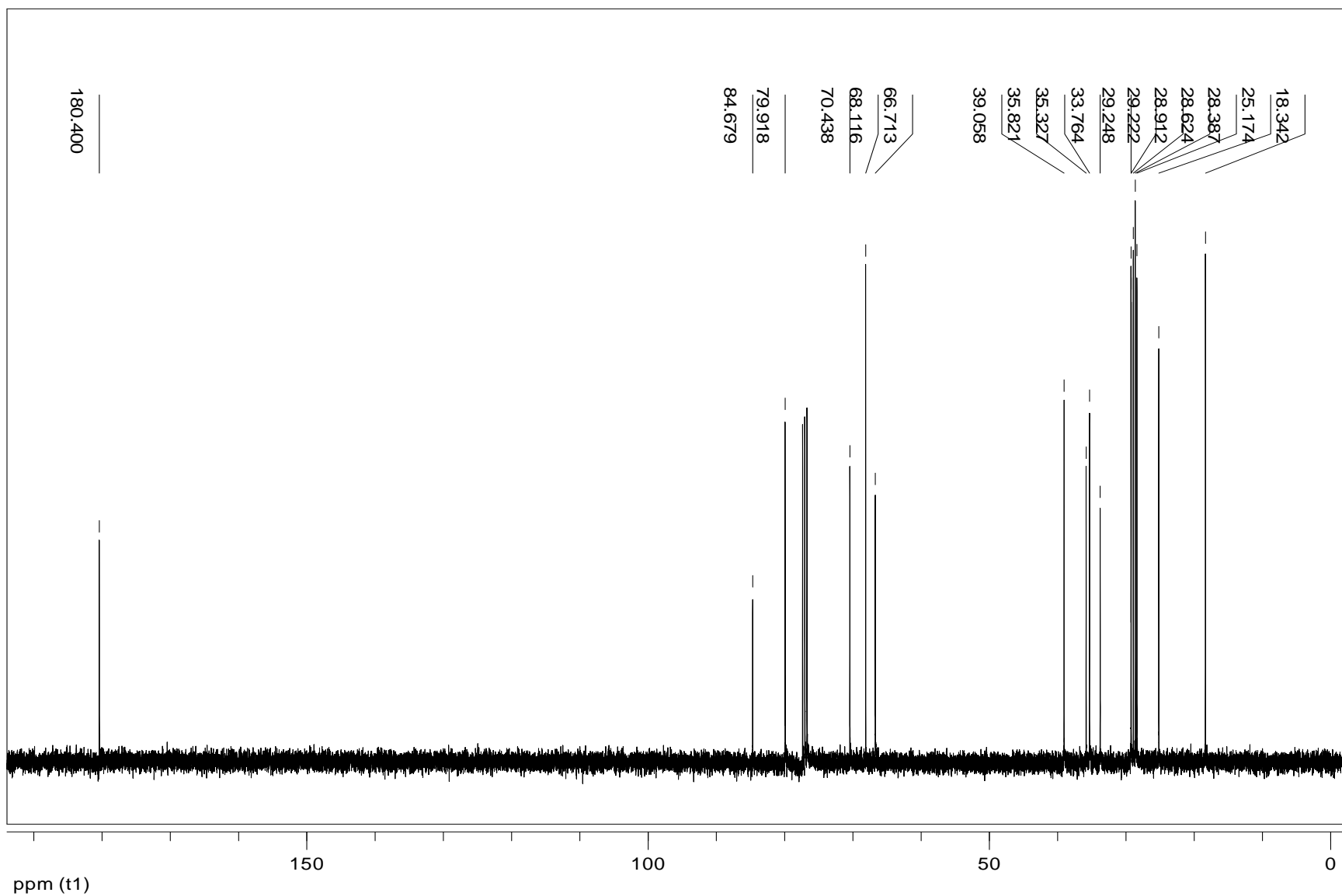
Anexo 3 - Espectro de RMN¹³C do rubrenolídeo (1) em CDCl₃



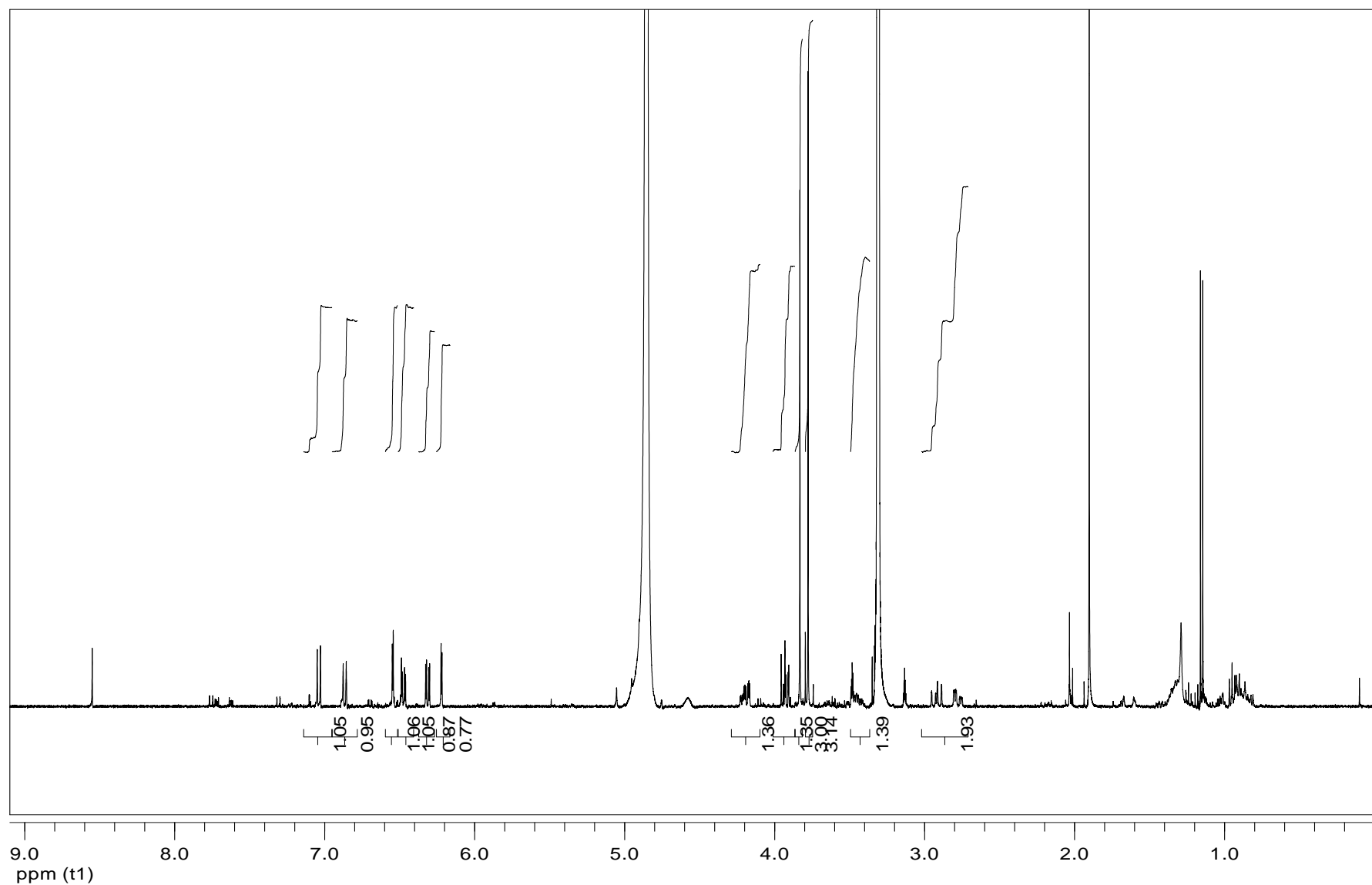
Anexo 4 - Espectro de RMN ¹H do rubrinolídeo (2) em CDCl₃.



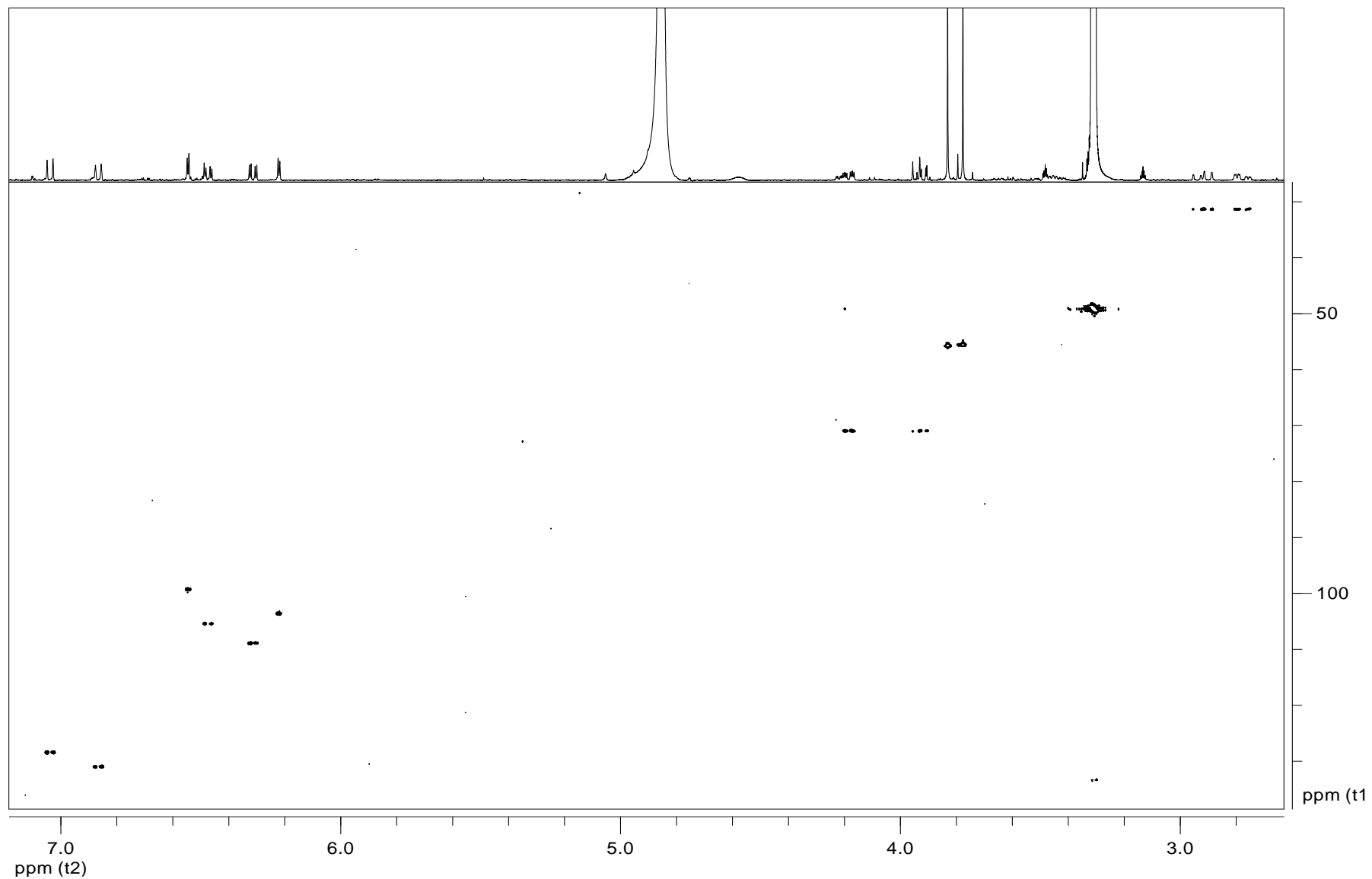
Anexo 5 - Espectro de RMN ¹³C do rubrinolídeo (2) em CDCl₃.



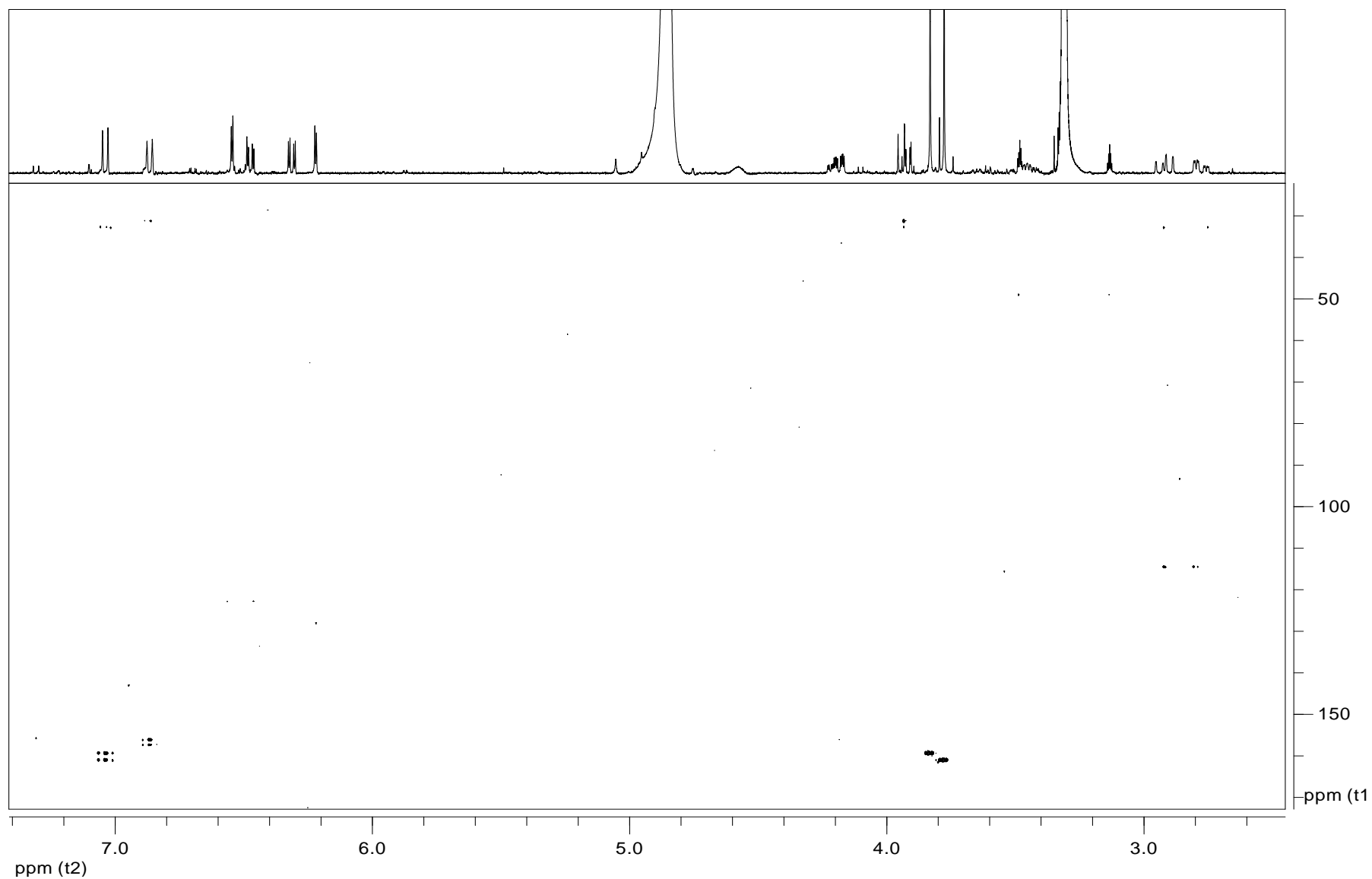
Anexo 6 - Espectro de RMN ¹H da sativana (3) em CD₃OD.



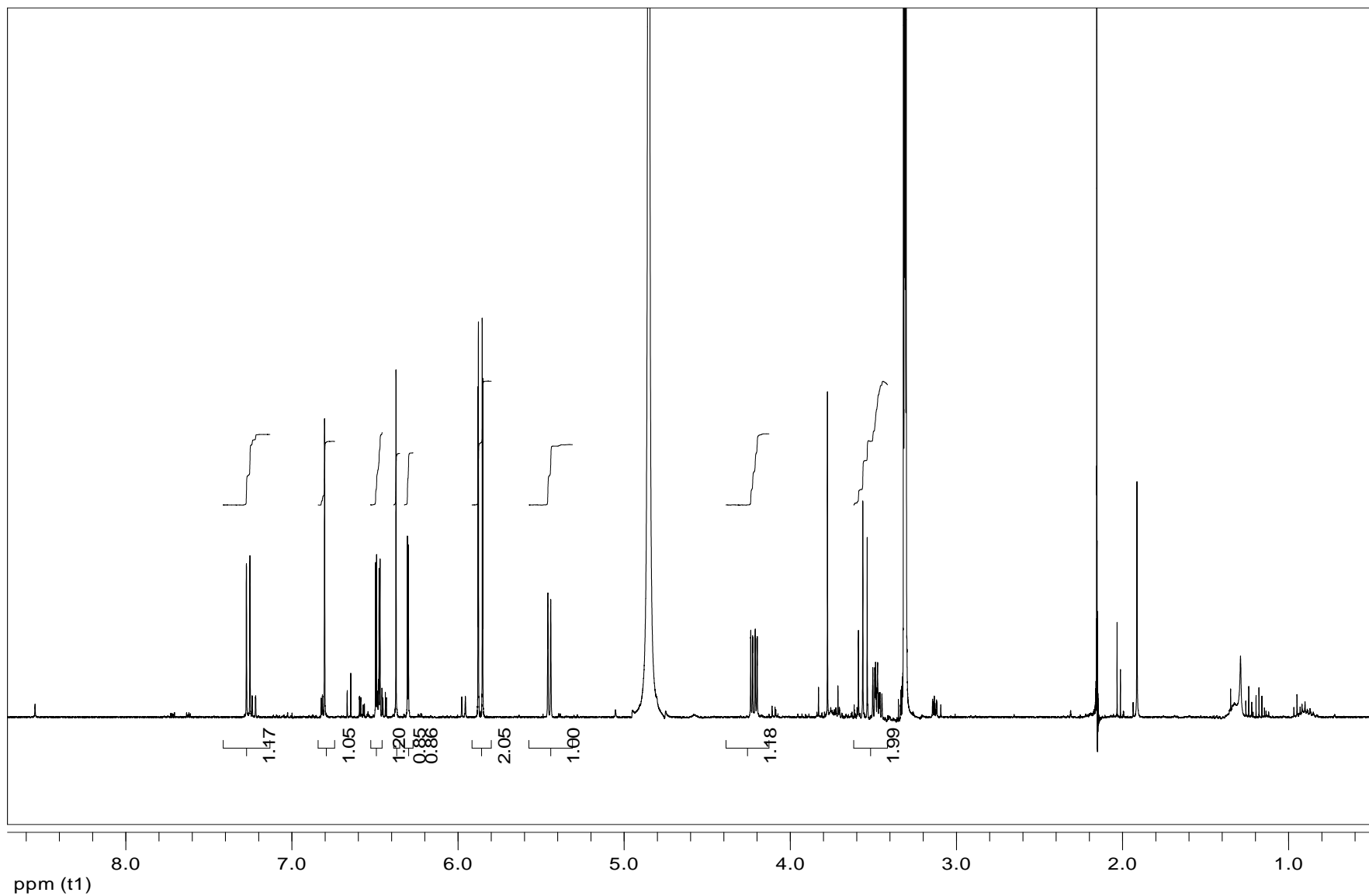
Anexo 7 - Espectros de HSQC da sativana (3) em CD₃OD



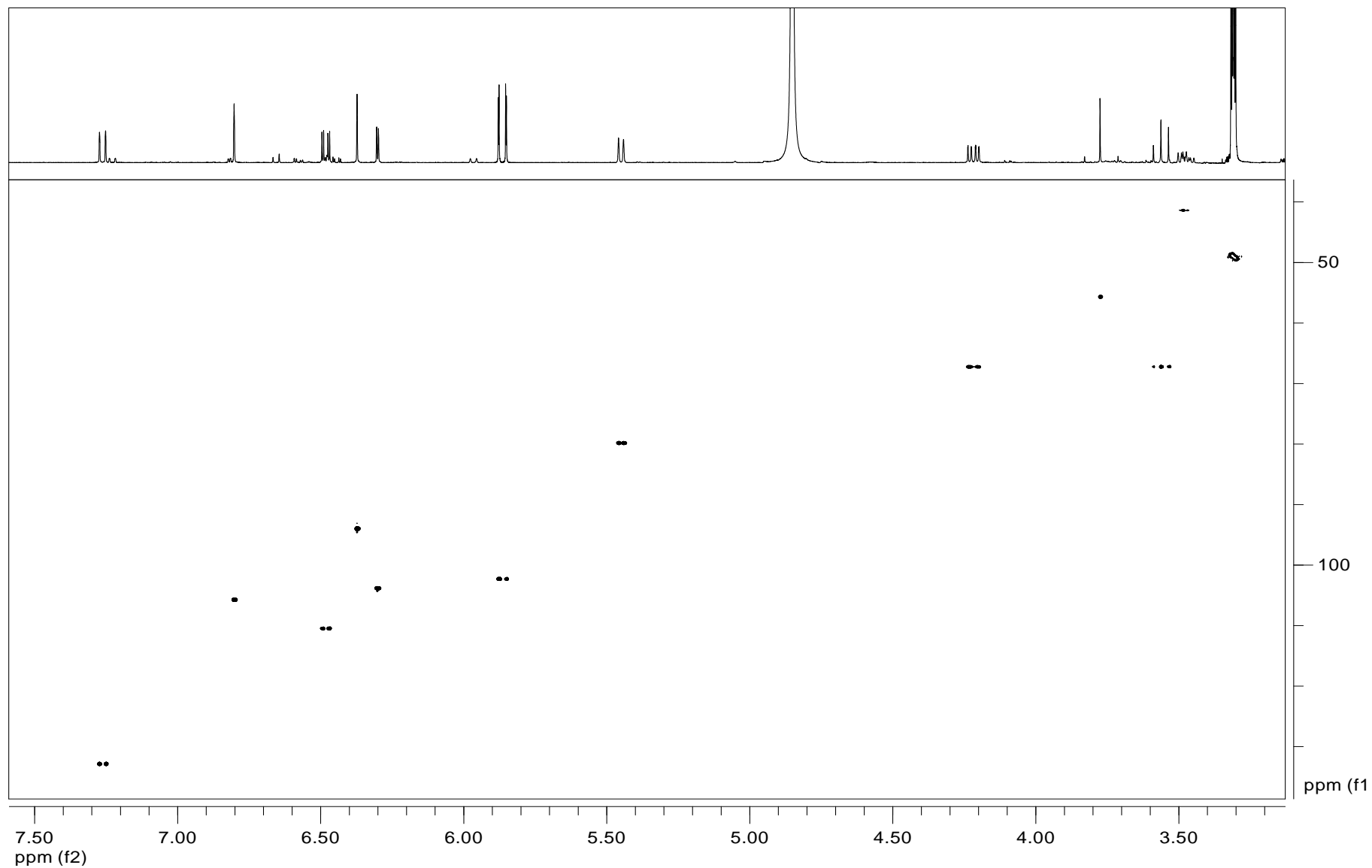
Anexo 8 - Espectro de HMBC da sativana (3) em CD₃OD



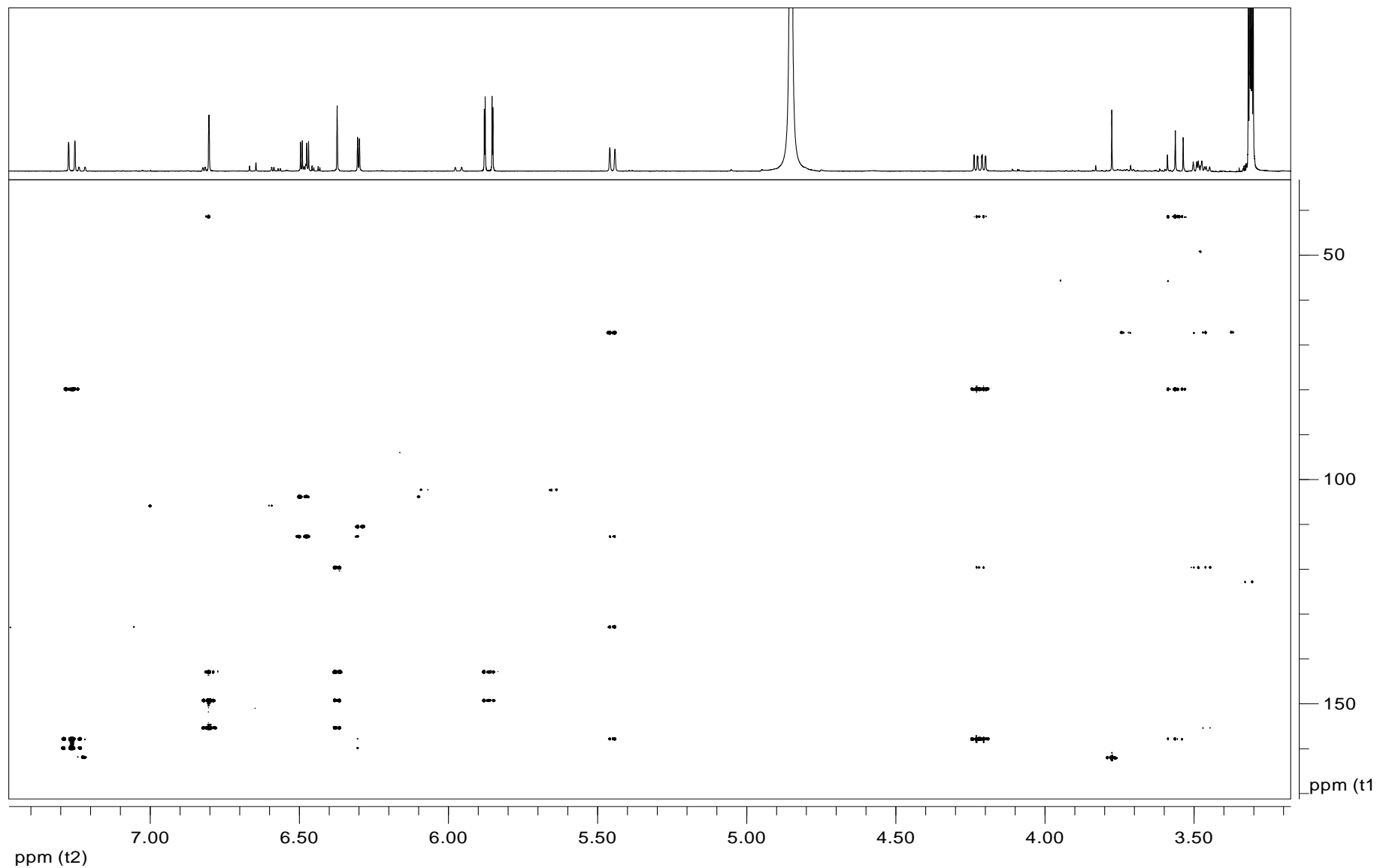
Anexo 9 - Espectro de RMN ¹H da maackiaína (4)



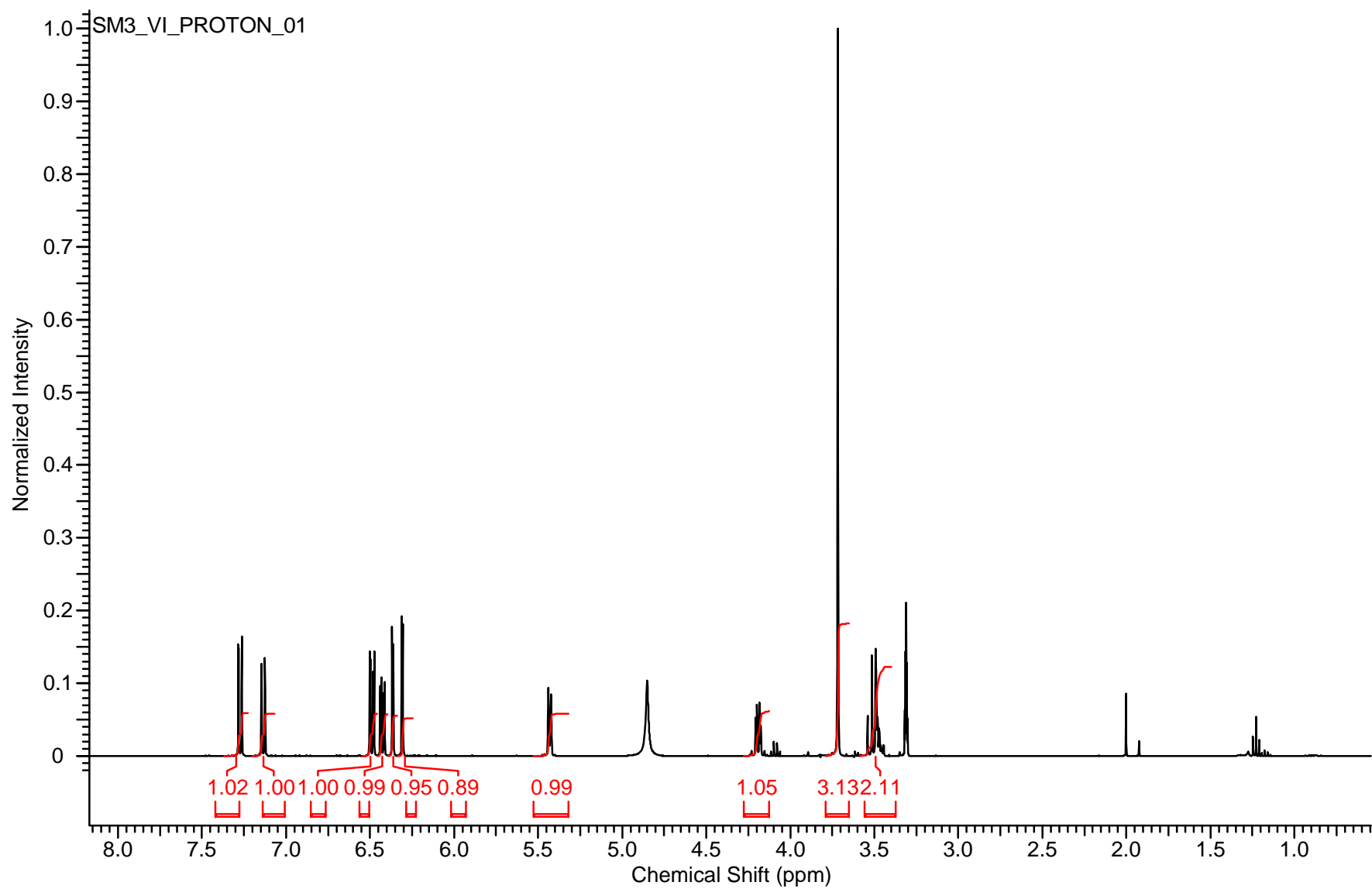
Anexo 10 – Espectro de HSQC e HMBC da maackiaína (4)



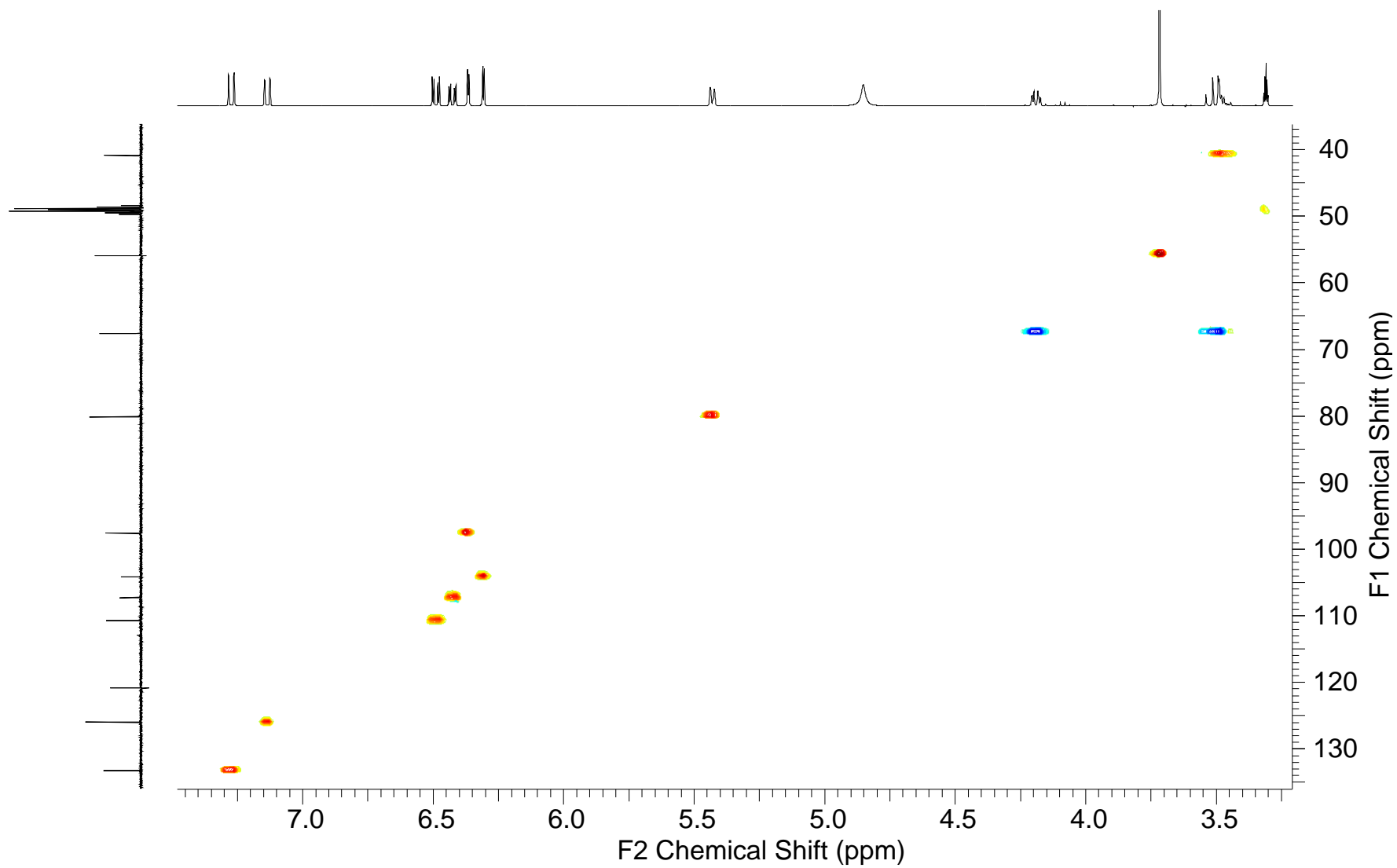
Anexo 11 - Espectro de HMBC da maackiaína (4)



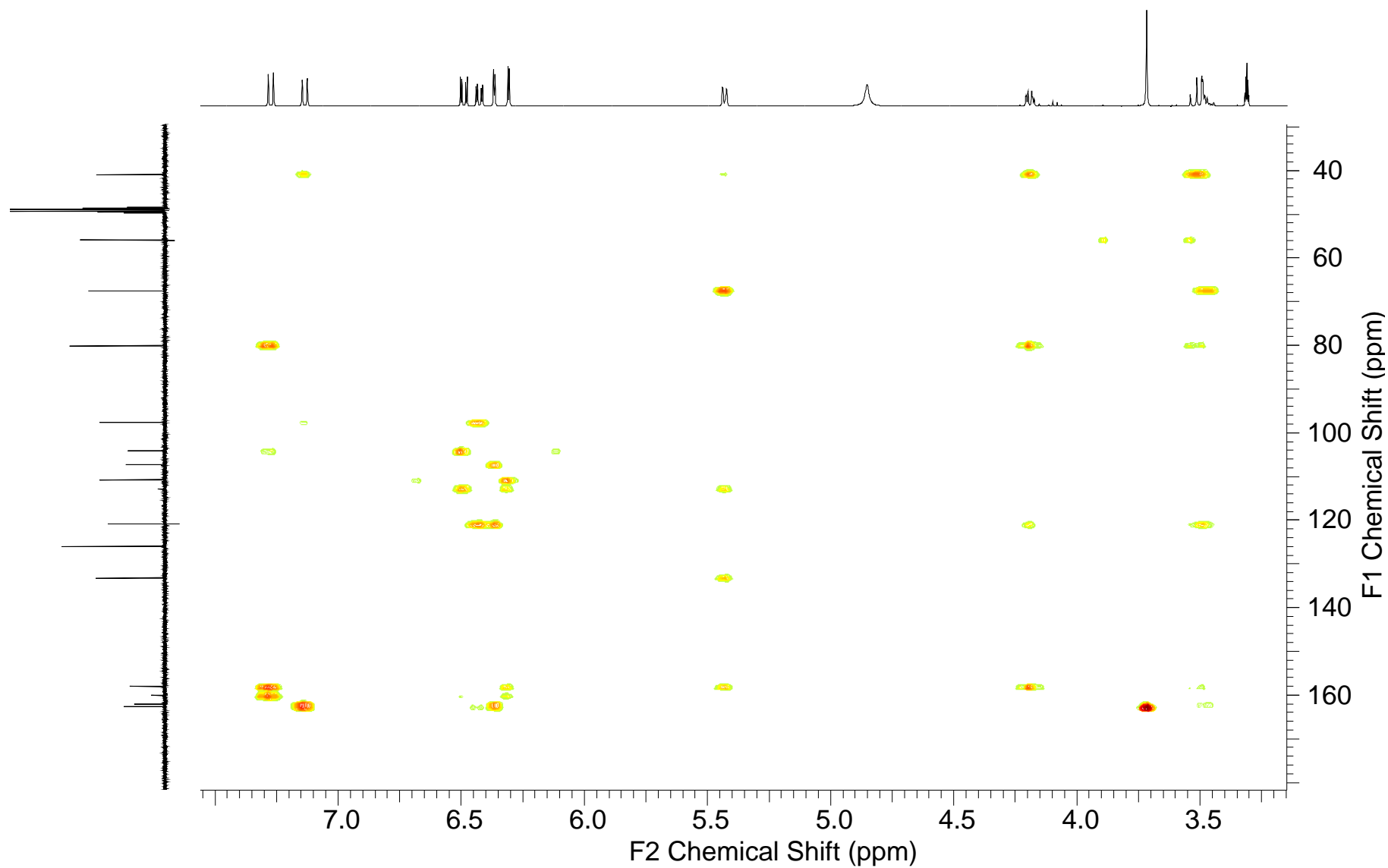
Anexo12 - Espectro de RMN ¹H da medicarpina (5) em CD₃OD



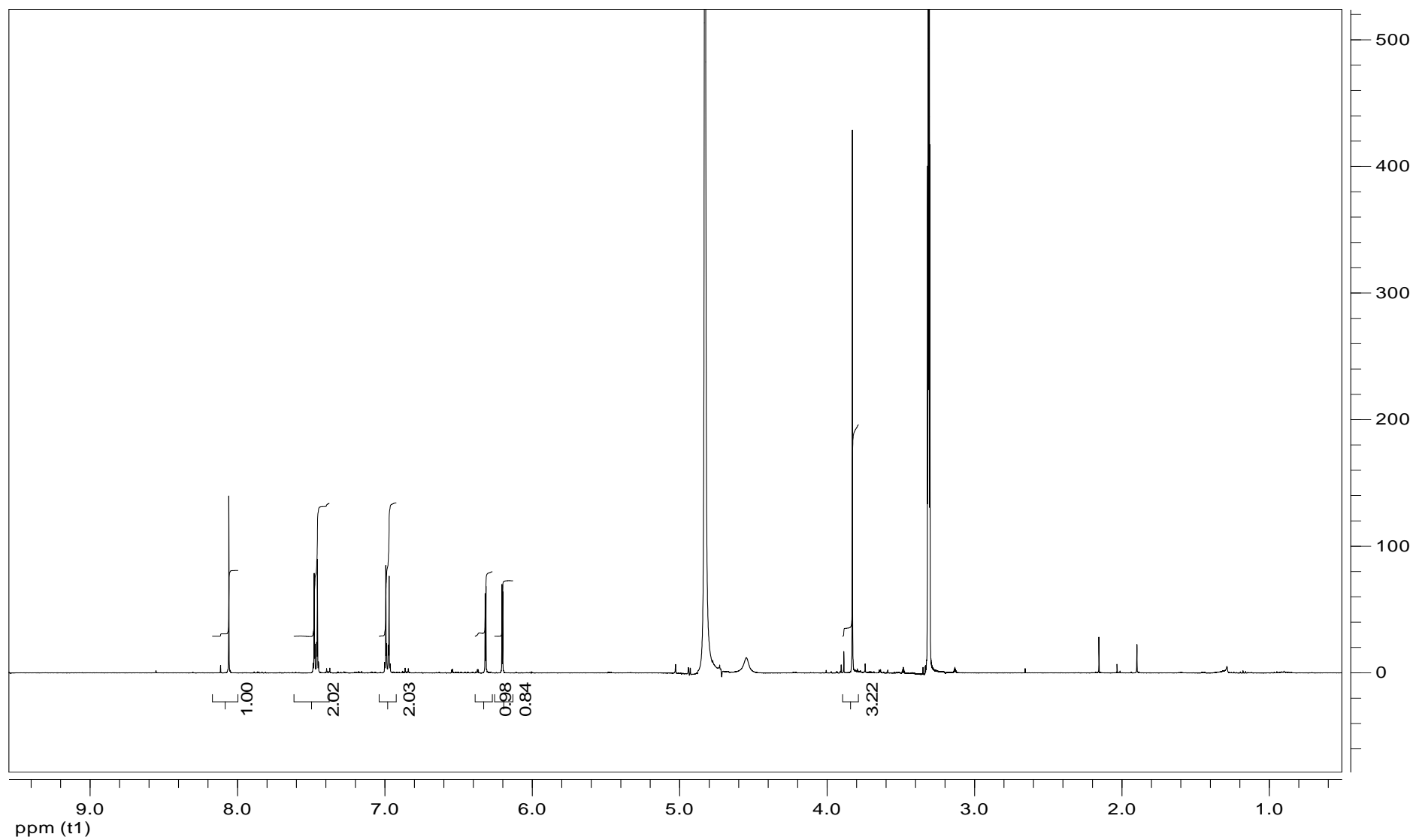
Anexo 13 – Espectro HSQC da medicarpina (5) em CD3OD



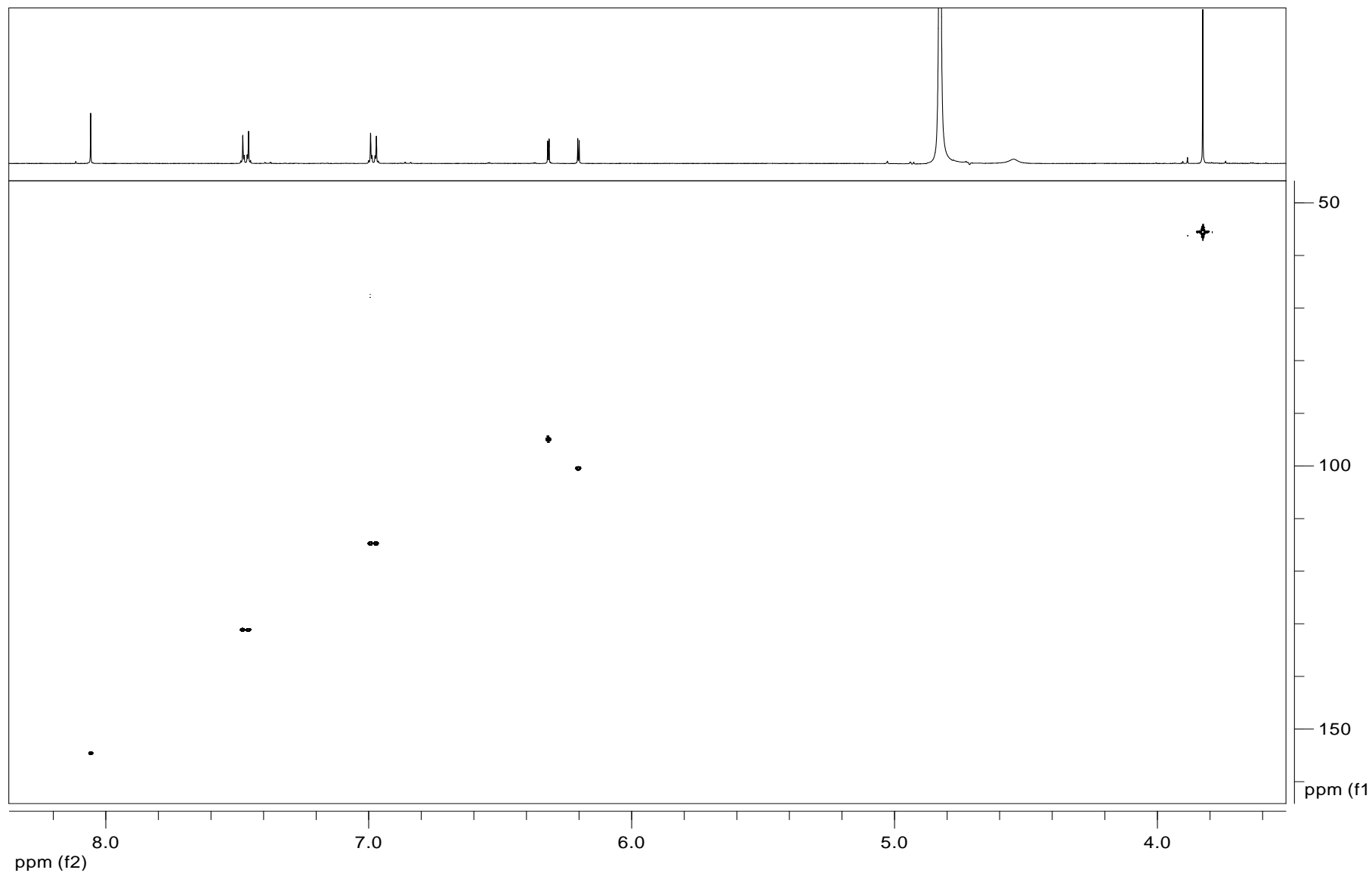
Anexo 14 - Espectro HMBC da medicarpina (5) em CD3OD



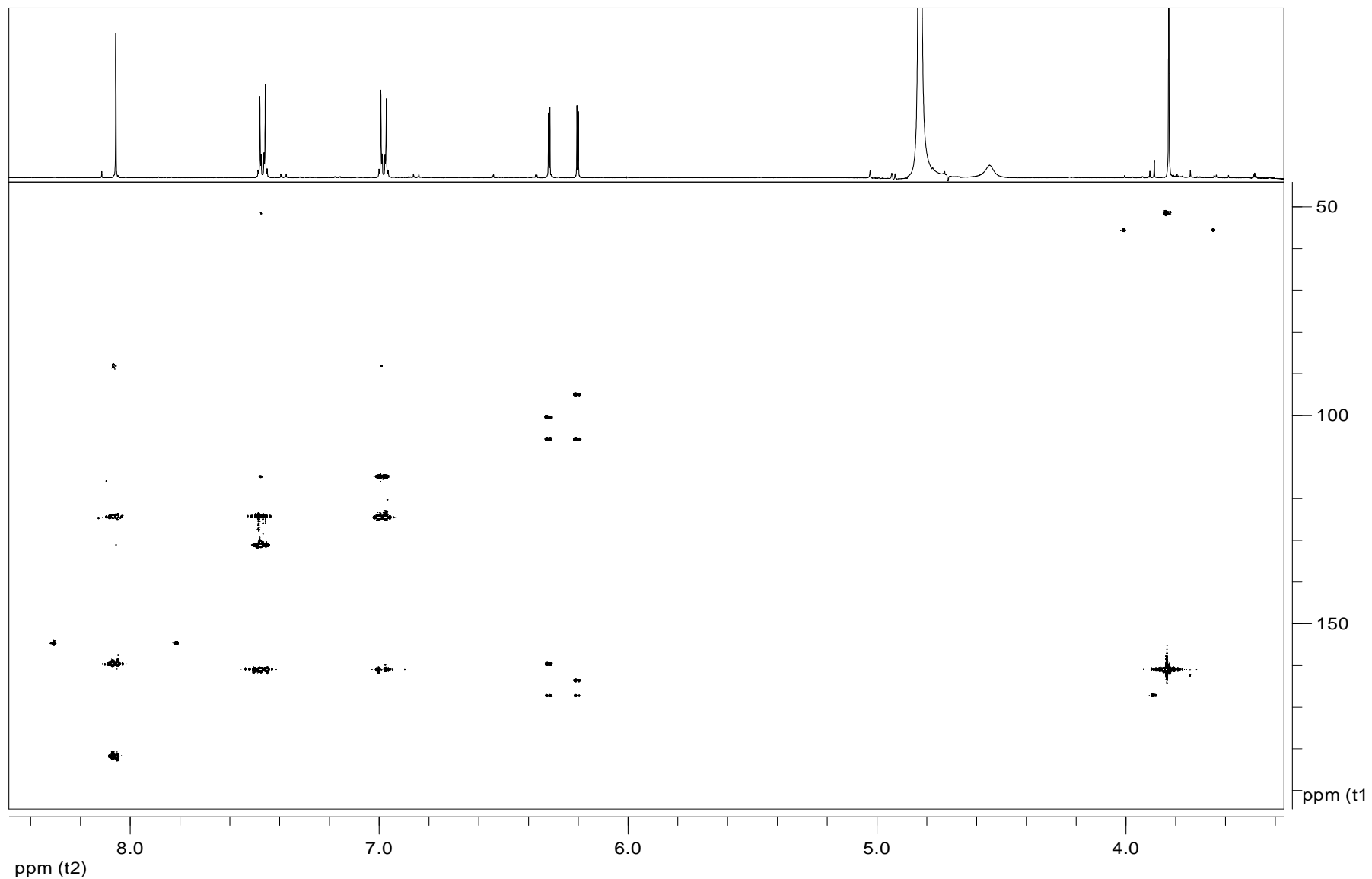
Anexo 15 - Espectro de RMN ^1H da biochanina A (6) em CD_3OD



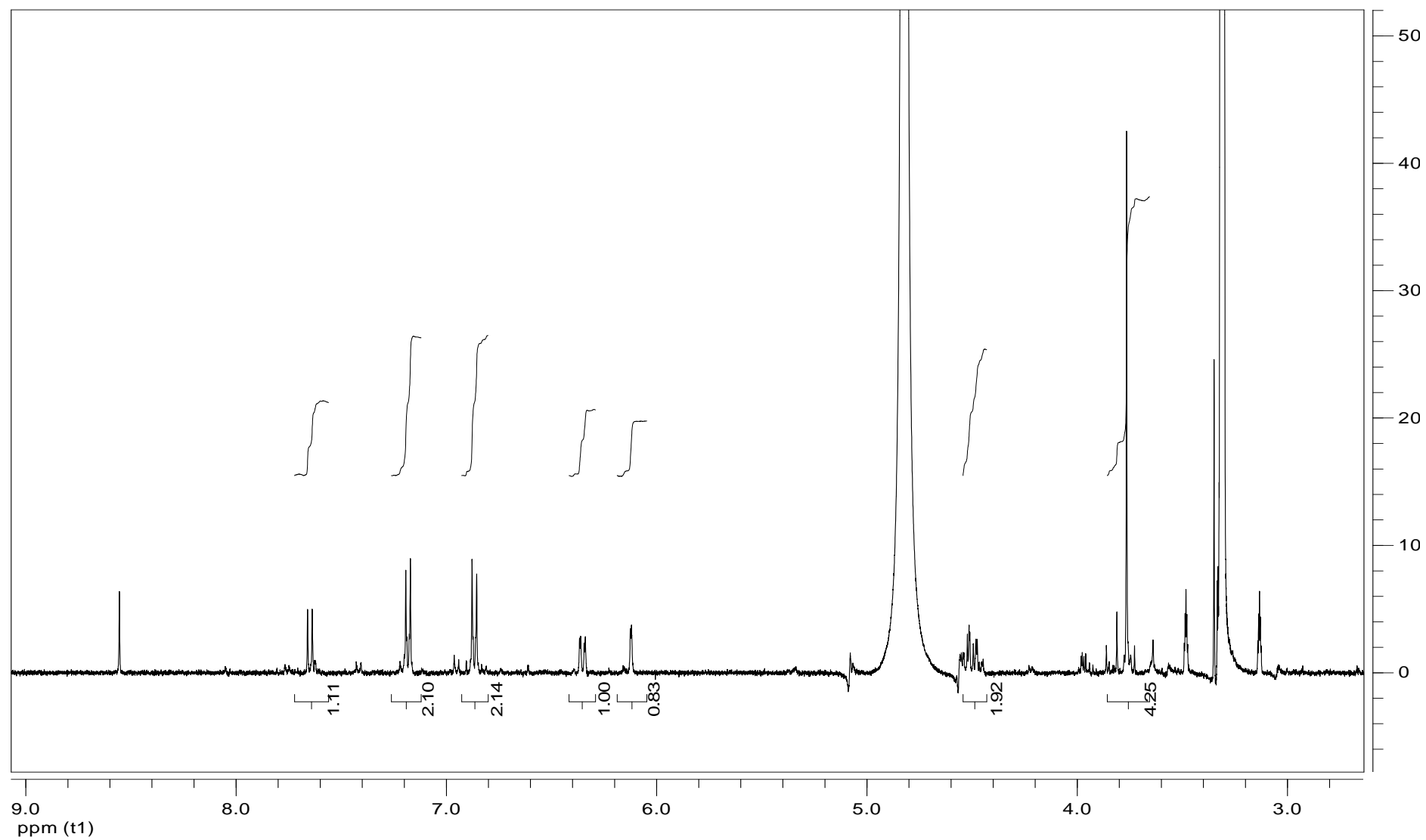
Anexo 16 - Espectro HSQC da biochanina A (6) em CD₃OD



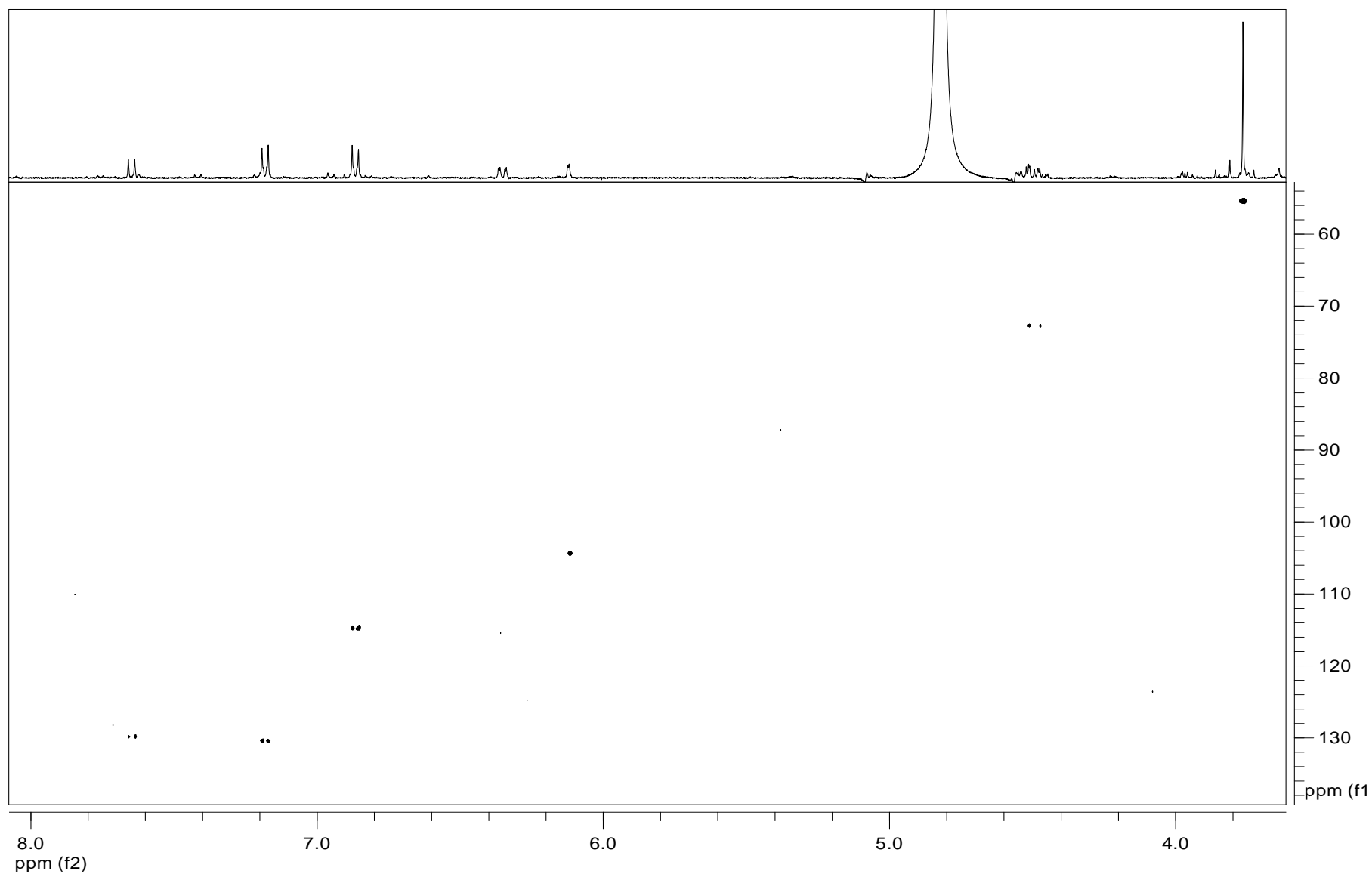
Anexo 17 - Espectro HMBC da biochanina A (6) em CD₃OD



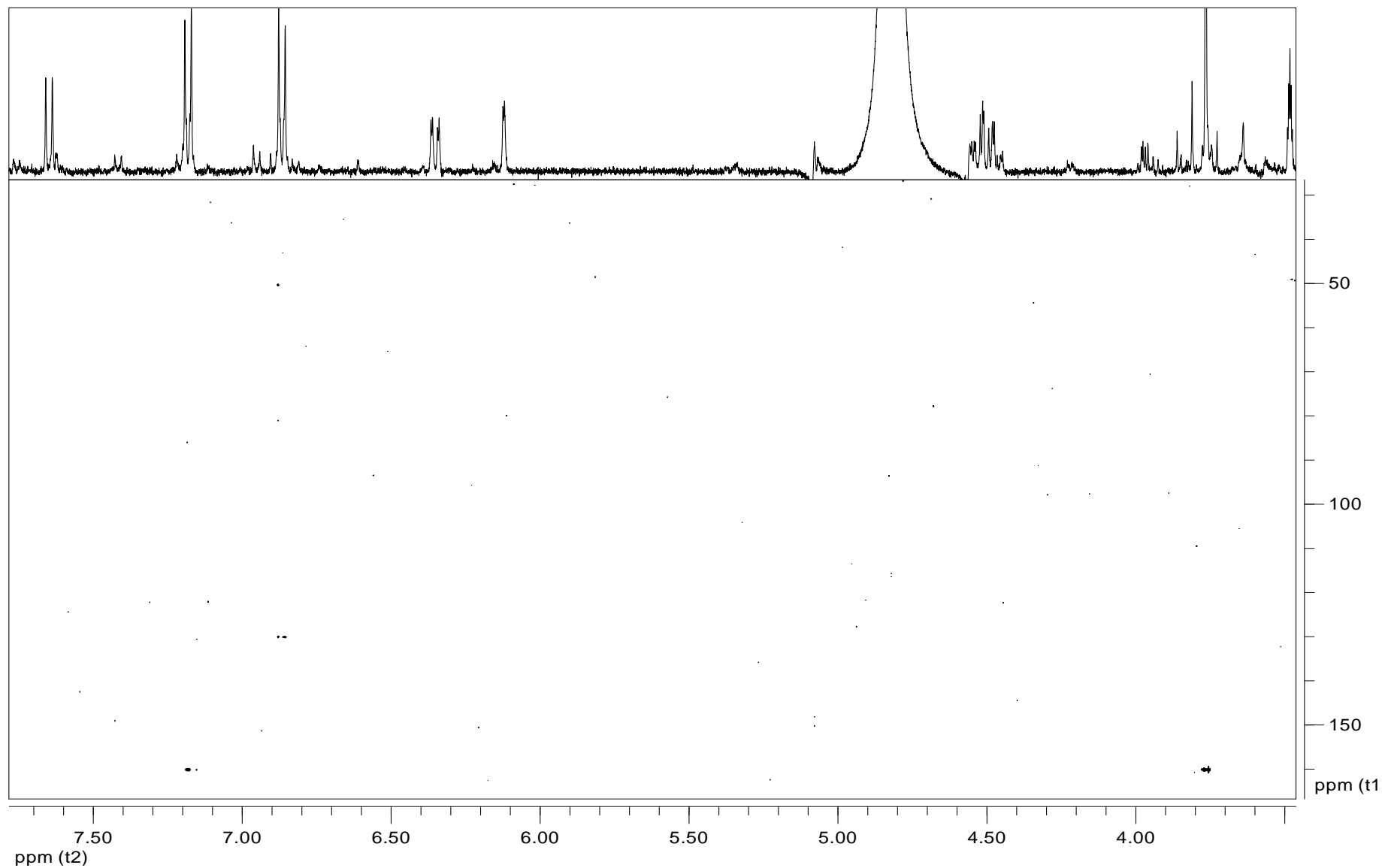
Anexo 18 - Espectrs de RMN ¹H da dihydroformononetina (7) em CD₃OD



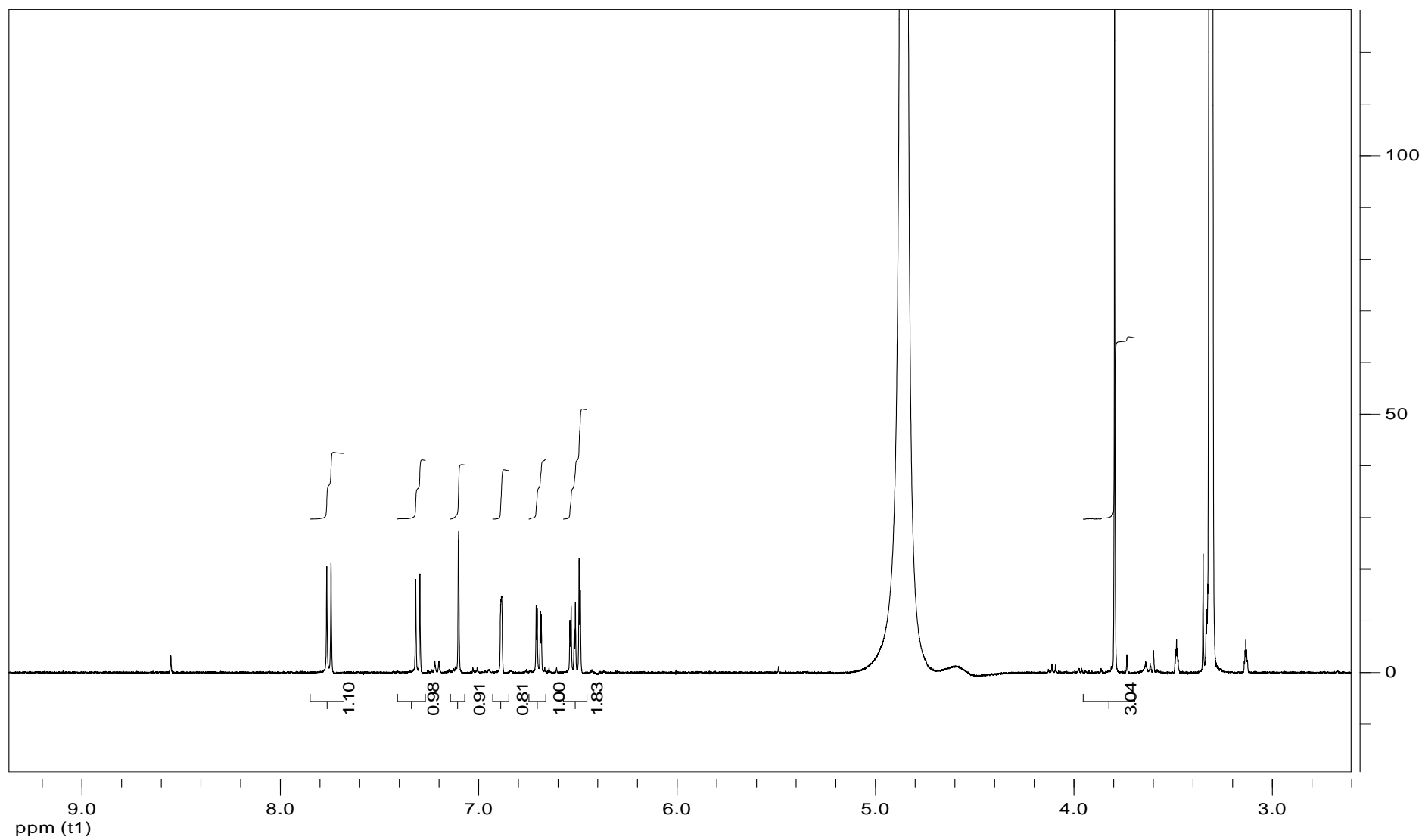
Anexo 19 – Espectro HSQC da dihydroformononetina (7) em CD₃OD



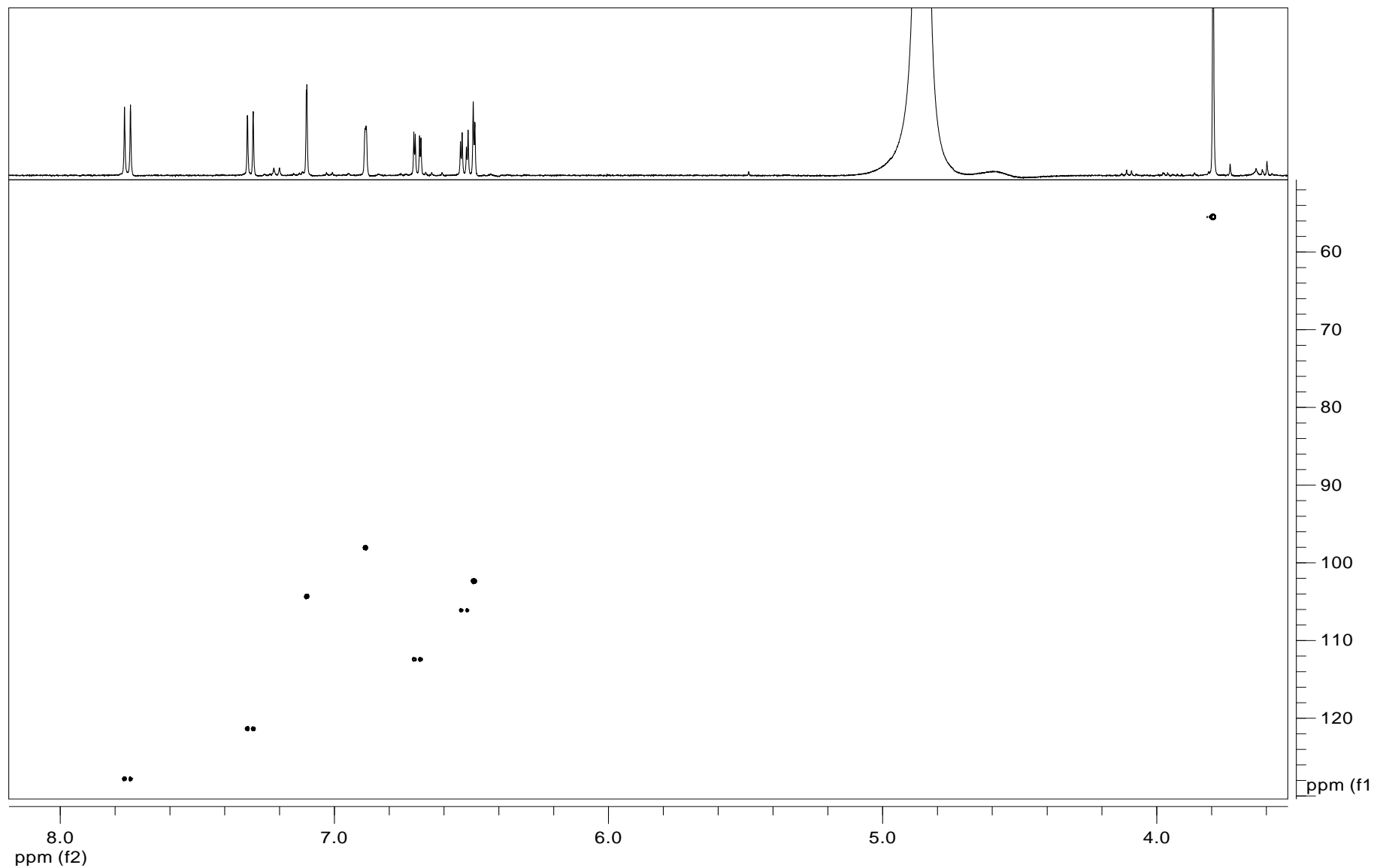
Anexo 20 – Espectro HMBC da dihydroformononetina (7) em CD₃OD



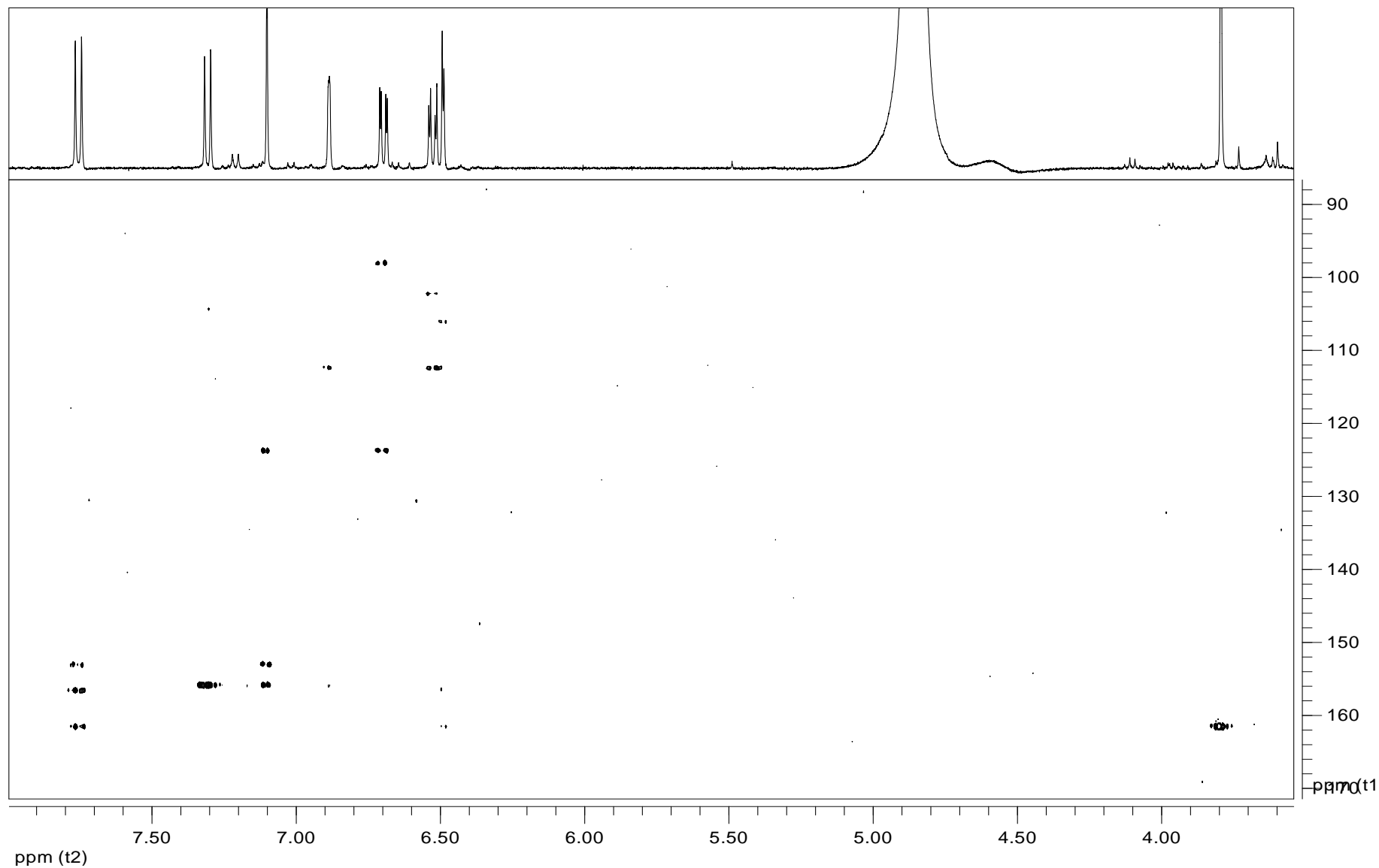
Anexo 21 - Espectro de RMN ¹H da bolusantina IV (8) em CD₃OD



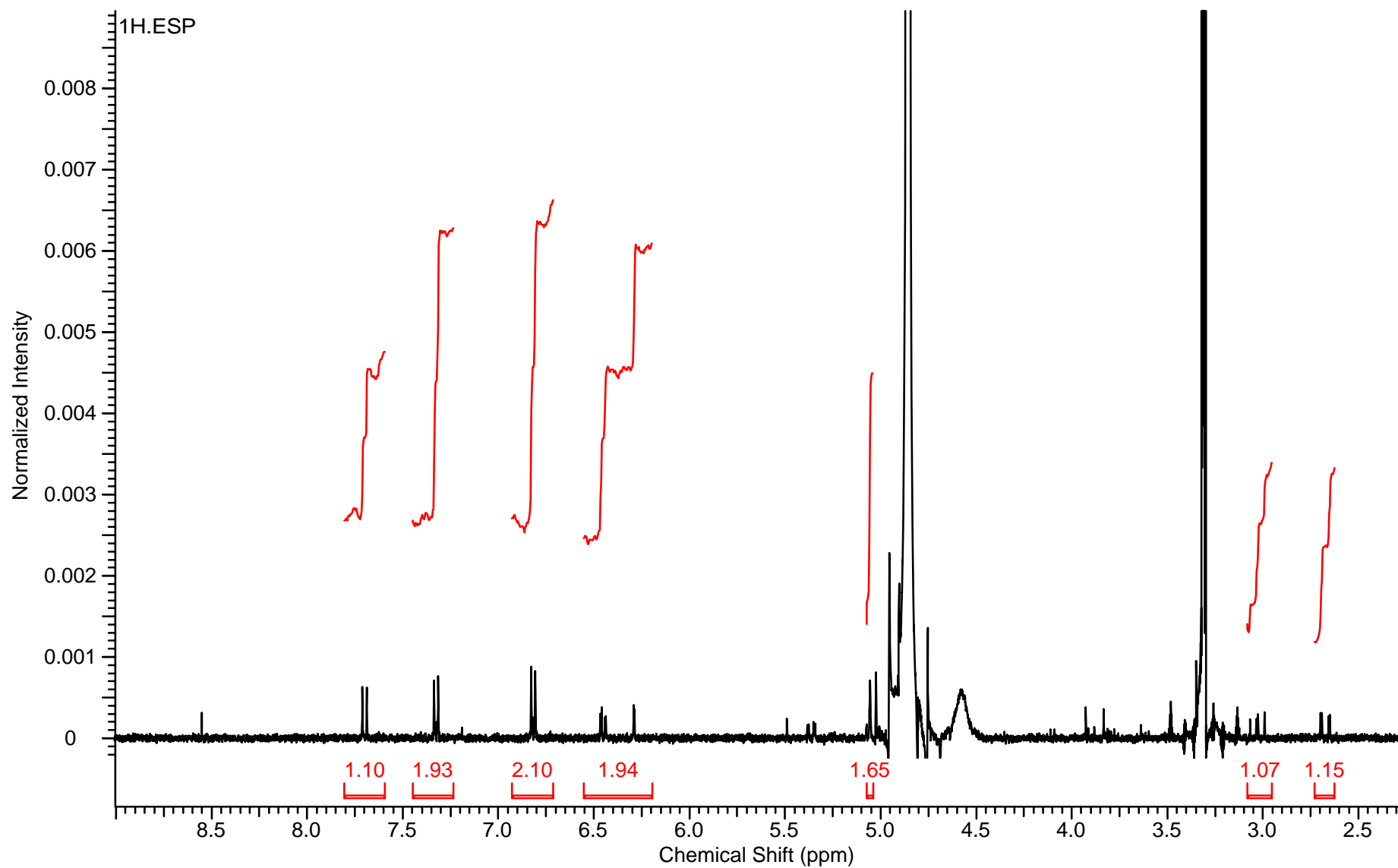
Anexo 22 - Espectro HSQC da bolusantina IV (8) em CD₃OD



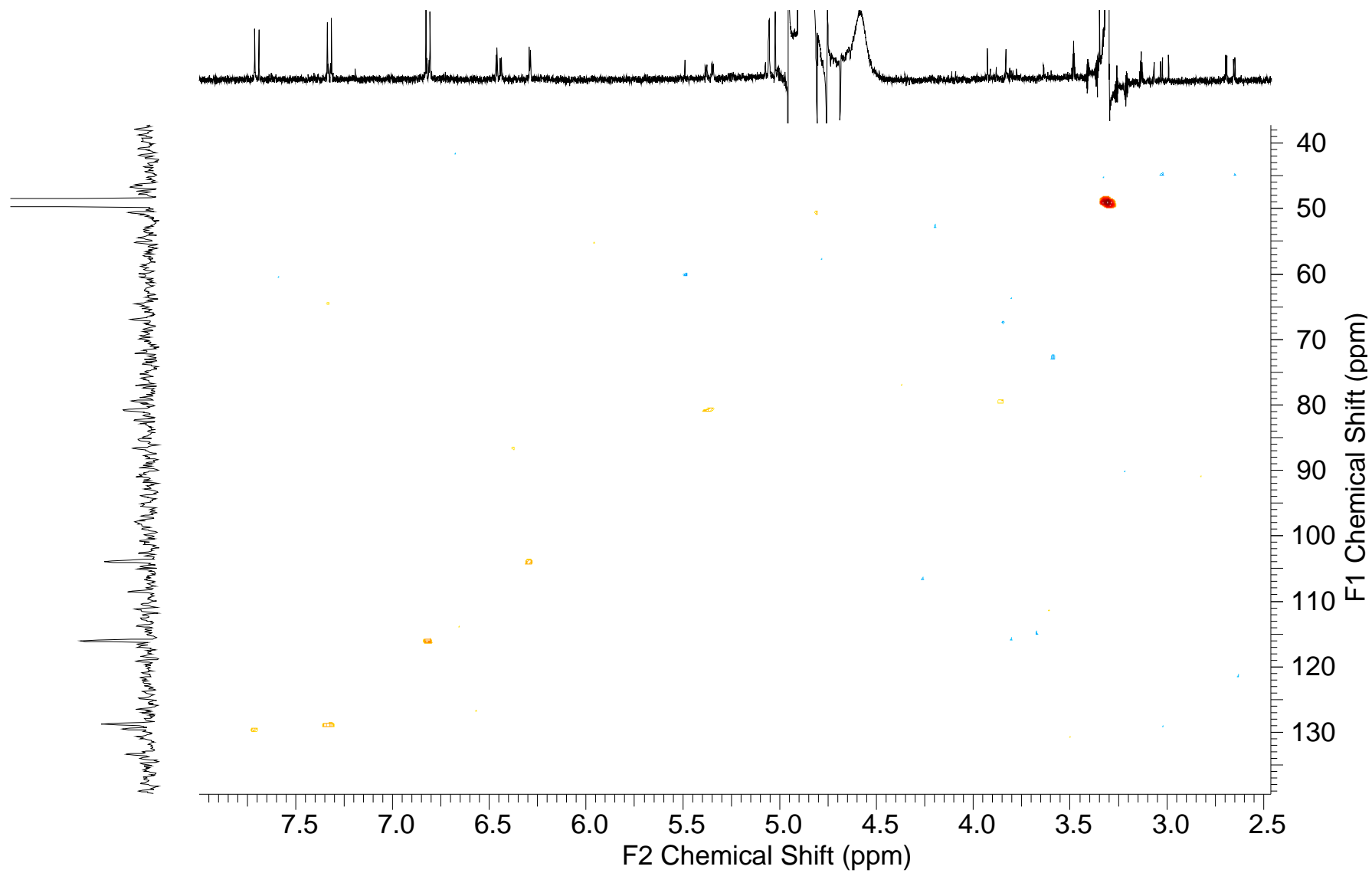
Anexo 23 - Espectro HMBC da bolusantina IV (8) em CD₃OD



Anexo 24 – Espectro de RMN ¹H da liquiritigenina (9) em CD₃OD



Anexo 25 – Espectro HSQC da liquiritigenina (9) em CD₃OD



Anexo 26 – Espectro HMBC da liquiritigenina (9) em CD₃OD

