

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
DEPARTAMENTO DE ANTIBIOTICOS  
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE PRODUTOS BIOATIVOS**

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA, ESTUDO FITOQUÍMICO E  
IDENTIFICAÇÃO DE CONSTITUINTES APOLARES DO ALBURNO DE  
*Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne (jatobá)**

Ana Paula de Torres Valentim

Recife-2006

Ana Paula de Torres Valentim

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA, ESTUDO FITOQUÍMICO E  
IDENTIFICAÇÃO DE CONSTITUINTES APOLARES DO  
ALBURNO DE *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne (jatobá)**

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO PROGRAMA DE  
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE  
PRODUTOS BIOATIVOS PARA OBTENÇÃO DO  
TÍTULO DE MESTRE

Área de concentração: Química de Compostos Bioativos  
Orientadora: Profa. Dra. Márcia Silva do Nascimento  
Co-Orientadora: Profa. Dra Norma Buarque de Gusmão

Recife-2006

**Valentim, Ana Paula de Torres**

**Atividade antimicrobiana, estudo fitoquímico e identificação de constituintes apolares do alburno de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne (jatobá) / Ana Paula de Torres Valentim. – Recife : O Autor, 2006.**

**100 folhas : il., fig., tab.**

**Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Biotecnologia de Produtos Bioativos, 2006.**

**Inclui bibliografia e anexos.**

**1. Química de compostos bioativos – Plantas medicinais. 2. Madeiras de lei – Resistência e durabilidade. 3. *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne (jatobá) – Análise fitoquímica do alburno – Atividade antimicrobiana – Identificação de constituintes – Espectrometria de massas. I. Título.**

<b>615.33</b>	<b>CDU (2.ed.)</b>	<b>UFPE</b>
<b>615.32</b>	<b>CDD (22.ed.)</b>	<b>BC2006 – 498</b>

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA POR ANA PAULA DE  
TORRES VALENTIM AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
BIOTECNOLOGIA DE PRODUTOS BIOATIVOS, COMO PARTE DOS  
REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE  
EM BIOTECNOLOGIA.**

**DEFENDIDA PUBLICAMENTE EM 30 DE AGOSTO DE 2006 DIANTE DA  
BANCA EXAMINADORA:**



**Dr. EDVALDO RODRIGUES DE ALMEIDA**  
Departamento de Antibióticos - UFPE



**Dr. EGÍDIO BEZERRA NETO**  
Departamento de Química - UFRPE



**Dra. MARIA DE LOS ANGELES PEREZ FERNANDEZ PALHA**  
Departamento de Engenharia Química - UFPE

## AGRADECIMENTOS

A **Deus** pela graça de ter concluído o mestrado, pela força, coragem e proteção.

Aos meus pais Severino Valentim Silva e Luisa Maria de Torres Valentim pela enorme paciência em apoiar mais essa jornada, aos meus irmãos pelo apoio, compreensão e incentivo.

À Professora Dra. Márcia Silva do Nascimento pela valiosa orientação e oportunidade de aprendizagem.

À Professora Dra. Norma Buarque Gusmão pela co-orientação, colaboração e atenção.

À querida amiga Patrícia Gomes pela amizade desde a graduação, pelo incentivo e companheirismo, mesmo agora tão longe.

A Tiago Barbosa (Mamu) pela imensurável contribuição, atenção e paciência.

Aos colegas do Laboratório de Química de Produtos Naturais pela colaboração.

Aos queridos amigos mestrandos, especialmente.

A todos do Departamento de Antibióticos da UFPE que, de alguma forma, contribuíram para realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	ii
RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
1 – INTRODUÇÃO	4
2 – OBJETIVOS	7
2.1 – Geral	7
2.2 – Específicos	7
3 – REVISÃO DE LITERATURA	8
3.1 – Considerações sobre madeira	8
3.1.2 – Teor de extrativos	9
3.1.3 – Alburno e cerne	10
3.1.4 – Madeira de lei	11
3.2 – Metabólitos primários	12
3.3 – Metabólitos secundários	12
3.3.1 - Flavonóides	13
3.3.2 – Alcalóides	13
3.3.3 – Glicosídeos cardiotônicos	14
3.3.4 – Cumarinas	15
3.3.5 – Taninos	16
3.3.6 – Triterpenos e/ou esteróides	17
3.3.7 – Derivados antracênicos livres	18
3.4 - Família Leguminosae-Caesalpinioideae	19
3.4.1 – Gênero <i>Hymenaea</i>	19
3.4.2 - Espécie <i>Hymenaea stigonocarpa</i> Mart. ex Hayne	21
3.4.2.1 – Posição taxonômica de <i>Hymenaea stigonocarpa</i> Mart. ex Hayne	22
3.4.2.2 – Descrição botânica	22
3.4.2.3 – Madeira do jatobá do cerrado	24
3.5 – Espécies de <i>Hymenaea</i> estudadas e atividade biológica	25
3.5.1 – <i>Hymenaea parvifolia</i>	28
3.5.2 – <i>Hymenaea palustris</i>	28
3.5.3 – <i>Hymenaea courbaril</i>	30
3.5.4 – <i>Hymenaea stigonocarpa</i>	32
3.6 – Métodos cromatográficos para identificação de substâncias	33
3.6.1 – Cromatografia por adsorção	34
3.6.2 – Cromatografia em camada delgada (CDC)	35
3.6.3 - Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG-MS)	36
3.7 – Agentes antimicrobianos	37
3.7.1 – Resistência aos antimicrobianos	38
3.7.2 – Considerações sobre os microrganismos testados	39
4 – MATERIAIS E MÉTODOS	43
4.1 – Material botânico	43
4.1.2 - Coleta e identificação do material botânico	43

<b>4.2 – Abordagem fitoquímica</b>	<b>43</b>
4.2.1 – Alcalóides	44
4.2.2 – Esteróides e triterpenóides	44
4.2.3 – Flavonóides	45
4.2.4 – Saponinas	45
4.2.5 – Taninos	45
<b>4.3 - Obtenção dos extratos brutos</b>	<b>46</b>
<b>4.4 – Atividade antimicrobiana</b>	<b>48</b>
4.4.1 – Microrganismos testados	48
4.4.2 - Método de difusão em disco de papel	49
4.4.3 - Concentração inibitória mínima (CIM)	50
<b>4.5 - Métodos cromatográficos</b>	<b>51</b>
<b>4.6 – Fracionamento do extrato ciclohexano de <i>Hymenaea stigonocarpa</i></b>	<b>52</b>
<b>4.7 – Métodos espectroscópicos</b>	<b>52</b>
<b>5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>53</b>
5.1 – Abordagem fitoquímica	53
5.2 - Rendimento do processo de obtenção dos extratos brutos de <i>Hymenaea stigonocarpa</i>	54
5.3- Atividade antimicrobiana por difusão em disco de papel	55
5.3.1 - Atividade antimicrobiana frente a isolados clínicos	57
5.4 - Atividade antimicrobiana em meio líquido	58
5.5 - Identificação dos compostos	62
5.5.1 - Identificação dos compostos presentes no extrato bruto ciclohexânico	62
5.5.2 - Identificação dos compostos presentes no fracionamento do extrato ciclohexânico	62
5.5.3 - Identificação do composto AHS <sub>1</sub>	66
5.5.4 - Identificação do composto AHS <sub>2</sub>	72
5.5.5 - Identificação do composto AHS <sub>3</sub>	75
5.5.6 - Identificação do composto AHS <sub>4</sub>	81
5.5.7 - - Identificação do composto AHS <sub>5</sub>	85
<b>6 – CONCLUSÕES</b>	<b>90</b>
<b>7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>92</b>
<b>ANEXO 1 - Composição dos reagentes utilizados na abordagem fitoquímica</b>	<b>99</b>
<b>ANEXO 2 - Perfis de suscetibilidade de microrganismos-teste aos antimicrobianos</b>	<b>100</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1</b> – Estrutura do flavonóide apigenina	<b>13</b>
<b>FIGURA 2</b> – Estrutura do alcalóide emetina	<b>14</b>
<b>FIGURA 3</b> – Estrutura da digigoxina	<b>15</b>
<b>FIGURA 4</b> – Esqueleto fundamental das cumarinas	<b>15</b>
<b>FIGURA 5</b> – Estrutura do tanino hidrolisável $\beta$ -1,2,3,4,6-pentagaloil-D-glucose	<b>16</b>
<b>FIGURA 6</b> – Estrutura da $\alpha$ -amirina	<b>17</b>
<b>FIGURA 7</b> – Estrutura da $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucuronopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)]-3 $\beta$ -hydroxioleano-12-ene-28-oato	<b>18</b>
<b>FIGURA 8</b> – Estrutura do lapachol	<b>18</b>
<b>FIGURA 9</b> – Jatobá do cerrado ( <i>Hymenaea stigonocarpa</i> Mart ex Hayne)	<b>21</b>
<b>FIGURA 10</b> – Casca do tronco de <i>Hymenaea stigonocarpa</i>	<b>23</b>
<b>FIGURA 11</b> – Florescência do jatobá do cerrado ( <i>Hymenaea stigonocarpa</i> Mart. ex Hayne)	<b>23</b>
<b>FIGURA 12</b> – Sementes (1) e frutos (2) do jatobá do cerrado	<b>24</b>
<b>FIGURA 13</b> – Tora do jatobá mostrando o cerne e alburno distintos	<b>25</b>
<b>FIGURA 14</b> – Estrutura de diterpenóides isolados de espécies de <i>Hymenaea</i>	<b>26</b>
<b>FIGURA 15</b> – Estruturas de diterpenos isolados de espécies de <i>Hymenaea</i>	<b>27</b>
<b>FIGURA 16</b> – Estrutura da astilbina	<b>28</b>
<b>FIGURA 17</b> – Estruturas dos flavonóides luteolina , crisoeriol , palstatina	<b>29</b>
<b>FIGURA 18</b> – Estruturas de diterpenos do tipo halimadieno isolados de <i>H. courbaril</i>	<b>30</b>
<b>FIGURA 19</b> – Estruturas de clerodanos isolados de <i>H. coubaril</i>	<b>31</b>
<b>FIGURA 20</b> – Estruturas dos sesquiterpenos isolados das folhas de <i>H. courbaril</i>	<b>31</b>
<b>FIGURA 21</b> – Estruturas dos sesquiterpenos isolados das folhas de <i>H. stigonocarpa</i>	<b>32</b>
<b>FIGURA 22</b> – Coluna cromatográfica, modelo clássico	<b>35</b>
<b>FIGURA 23</b> – Esquema do mecanismo de ação dos antimicrobianos	<b>38</b>
<b>FIGURA 24</b> – Esquema da obtenção dos extratos brutos	<b>47</b>
<b>FIGURA 25</b> – Esquema do teste de atividade antimicrobiana por difusão em disco	<b>50</b>
<b>FIGURA 26</b> – Halos de inibição dos extratos brutos em EtOH e AcOEt (A1= 100 mg/mL / A2= 300 mg/mL) de <i>Hymenaea stigonocarpa</i> frente ao microrganismo <i>Staphylococcus aureus</i> da coleção de cultura (UFPEDA)	<b>56</b>
<b>FIGURA 27</b> –Halos de inibição formado pelos extratos brutos Etanol (E), Acetato de etila (A) e Ciclohexano(C), na concentração de 64mg/mL frente ao microrganismo <i>Staphylococcus aureus</i> (UFPEDA)	<b>56</b>



**FIGURA 28-** Placa mostrando a inibição de *S. aureus* pelo extrato ciclohexânico a uma concentração de 128mg/mL e resistência nas concentrações 64mg/mL, 32mg/mL e 16mg/mL. Teste em triplicata e com controles positivo e negativo **59**

**FIGURA 29-** Placa mostrando a inibição de *S. aureus* pelo extrato de acetato de etila nas concentrações de 128mg/mL, 64mg/mL, e 32mg/mL resistência do microrganismo ao extrato a 16mg/mL. Teste em quadruplicata **60**

**FIGURA 30-** Placa mostrando a inibição de *S. aureus* pelo extrato etanólico nas concentrações de 128mg/mL e 64 mg/mL e resistência do microrganismo ao extrato a 16mg/mL e 32mg/mL. Teste em quadruplicata **60**

**FIGURA 31-** Cromatograma do extrato ciclohexânico **64**

**FIGURA 32-** Espectro de massas e estrutura do composto AHS<sub>1</sub>. **67**

**FIGURA 33-** Principais fragmentos do composto AHS<sub>1</sub> **70**

**FIGURA 34-** Espectro de massas e estrutura do composto AHS<sub>2</sub> **72**

**FIGURA 35-** Fragmentação do composto AHS<sub>2</sub> **74**

**FIGURA 36-** Espectro de massas e estrutura do composto AHS<sub>3</sub> **76**

**FIGURA 37-** Fragmentação do composto AHS<sub>3</sub> **80**

**FIGURA 38-** Espectro de massas e estrutura do composto AHS<sub>4</sub> **82**

**FIGURA 39-** Fragmentação do composto AHS<sub>4</sub> **84**

**FIGURA 40-** Espectro de massas e estrutura do composto AHS<sub>5</sub> **86**

**FIGURA 41-** Fragmentações do composto AHS<sub>5</sub> **83**

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1-</b> Testes que identificam as classes de compostos presentes na planta	<b>43</b>
<b>TABELA 2-</b> Testes para determinação de alcalóides	<b>44</b>
<b>TABELA 3-</b> Microrganismos utilizados na avaliação antimicrobiana dos extratos brutos	<b>48</b>
<b>TABELA 4-</b> Resultado da abordagem fitoquímica do alburno de <i>Hymenaea stigonocarpa</i>	<b>54</b>
<b>TABELA 5-</b> Rendimento dos extratos brutos de <i>Hymenaea stigonocarpa</i>	<b>55</b>
<b>TABELA 6-</b> Resultados da atividade antimicrobiana dos extratos brutos frente aos microrganismos mantidos em Coleção de Cultura (UFPEDA)	<b>56</b>
<b>TABELA 7-</b> Resultado da atividade antimicrobiana dos extratos brutos em AcOEt e EtOH do alburno frente a isolados clínicos (PASM)	<b>57</b>
<b>TABELA 8-</b> Resultado da atividade antimicrobiana dos extratos brutos em EtOH, AcOEt e C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> frente a isolados clínicos, a uma concentração 64mg/mL (HUOC)	<b>58</b>
<b>TABELA 9-</b> Resultados da atividade antimicrobiana em meio líquido	<b>59</b>
<b>TABELA 10-</b> Principais fragmentos presentes no espectro de massas do composto AHS <sub>1</sub>	<b>68</b>
<b>TABELA 11-</b> Principais fragmentos presentes no espectro de massas do composto AHS <sub>2</sub>	<b>73</b>
<b>TABELA 12-</b> Principais fragmentos presentes no espectro de massas do composto AHS <sub>3</sub>	<b>77</b>
<b>TABELA 13-</b> Principais fragmentos presentes no espectro de massas do composto AHS <sub>4</sub>	<b>83</b>
<b>TABELA 14-</b> Principais fragmentos presentes no espectro de massas do composto AHS <sub>5</sub>	<b>87</b>

## RESUMO

A natureza tem fornecido aos pesquisadores um número expressivo de substâncias orgânicas, sendo o reino vegetal um dos seus principais contribuintes. O Brasil apresenta grande diversidade de plantas, dentre elas as “madeiras de lei”. Essas apresentam utilidade não só por sua resistência física, como também, seus constituintes químicos podem funcionar como inseticidas botânicos ou na medicina por apresentarem atividade biológica. Considerada madeira de lei e usada na medicina popular, a espécie *Hymenaea stigonocarpa* Mart ex Hayne, família Leguminosae-Caesalpinioideae, conhecida popularmente como jatobá-do-cerrado, foi o alvo deste estudo a fim de contribuir para o conhecimento fitoquímico do gênero *Hymenaea* e identificação de substâncias químicas biologicamente ativas. Neste trabalho avaliou-se o perfil fitoquímico, a atividade antimicrobiana pelo método de disco de papel e a concentração inibitória mínima (CIM); identificaram-se compostos apolares do alburno da planta, o qual foi submetido à extração com o solvente etanol e particionado entre o ciclohexano e acetato de etila. O extrato ciclohexânico foi submetido a fracionamento cromatográfico; as frações obtidas analisadas por cromatografia em camada delgada (CDC) e em seguida analisadas por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG - MS). O extrato em acetato de etila apresentou CIM de 32mg/mL frente ao microrganismo Gram-positivo *Staphylococcus aureus*. A abordagem fitoquímica revelou a presença de flavonóides, esteróides e triterpenóides. Foram identificados cinco compostos no extrato ciclohexânico: N-N-dietil-decanamida (AHS<sub>1</sub>), Hexadecanoato de metila (AHS<sub>2</sub>), Ácido hexadecanóico (AHS<sub>3</sub>), Ácido 9-octadecenóico (AHS<sub>4</sub>), Ácido octadecanóico (AHS<sub>5</sub>).

## ABSTRACT

The Nature has supplied the researchers an expressive number of organic substances, in which the plant kingdom is one of its main contributors. Brazilian flora has great plant diversity and being part of it are the timbers. They present, not only, utility due to physical resistance, but its chemical constituents can function as botanical insecticide or as medicine, due to its biological activity. In the timbers, *Hymenaea stigonocarpa* Mart ex. Hayne species, Leguminosae-Caesalpinioideae family was chosen in order to contribute to the phytochemical knowledge of the *Hymenaea* sort and biologically active substance identification. In this work the phytochemical profile was evaluated, its antimicrobial activity, MIC (minimal inhibitory concentration) and apolars composite identification of the sapwood of the plant, which were submitted to extraction with solvent ethanol and partitioned between the cyclohexane and ethyl acetate. Then, the cyclohexane extract was submitted to the chromatographic fractionative, where the gotten fractions analyzed by thin layer chromatography (TLC) and after analyzed by connected gaseous chromatography to the spectrometer of masses (CG - MS). The ethyl acetate extracts has presenting MIC of 32mg/mL to Gram – positive microorganism *Staphylococcus aureus*. The phytochemical screening disclosed the presence of flavonoids, steroids and triterpenoids. Five composites had been identified: N-N-diethyl-decanamide (AHS<sub>1</sub>), methyl hexadecanoate (AHS<sub>2</sub>), hexadecanoic acid (AHS<sub>3</sub>), 9-octadecanoic acid (AHS<sub>4</sub>), octadecanoic acid (AHS<sub>5</sub>).

## 1 - INTRODUÇÃO

A química de produtos naturais tem por objetivo imediato o esclarecimento e registro dos constituintes resultantes do metabolismo secundário dos seres vivos, através de seu isolamento e elucidação de suas estruturas moleculares. Embora compreenda, assim, o estudo da composição química de animais e vegetais, é no campo da fitoquímica que se encontra o maior número de trabalhos experimentais publicados. A importância científica das pesquisas desenvolvidas nesta área se traduz tanto pelos resultados obtidos com a consecução de seus objetivos imediatos (são conhecidos hoje milhares de compostos naturais) como pela aplicação imediata ou mediata desses resultados a outras áreas científicas correlatas. O crescente desenvolvimento de técnicas analíticas, tais como a cromatografia, e o constante aperfeiçoamento dos instrumentos de análise espectrométrica, têm na química de produtos naturais, ao lado da bioquímica, sua principal força motora (BARROS *et al.*, 1970).

As plantas desenvolveram sofisticados mecanismos de defesa durante o processo de evolução, entre os quais se incluem diversos tipos de compostos químicos encontrados nos diferentes tecidos vegetais, constitutivos ou cuja síntese é induzida em resposta ao ataque de pragas e/ou patógenos (CARLINI & SÁ, 2002).

Aproximadamente 25% dos medicamentos prescritos mundialmente são derivados de plantas. Das 252 drogas consideradas básicas e essenciais pela Organização Mundial de Saúde (OMS) 11% são exclusivamente originadas de plantas e um número significativo são drogas sintéticas obtidas de precursores naturais (RATES, 2001).

A natureza tem fornecido um número expressivo de substâncias orgânicas, sendo os organismos do reino vegetal um dos principais contribuintes. O fascinante potencial de fornecimento de novas substâncias

deve-se a significativa capacidade desses organismos em sintetizar os mais variados tipos de estruturas moleculares (SALISBURY & ROSS, 1992).

A diversidade e a complexidade das moléculas é algo realmente considerável e, portanto seria um desperdício não se beneficiar da capacidade de síntese das plantas. Embora os vegetais contenham milhares de constituintes químicos as propriedades terapêuticas estão especialmente relacionadas com os chamados metabólitos secundários (SALISBURY & ROSS, 1992).

As plantas produzem os metabólicos secundários com diversas funções específicas, tais como: repelentes e anti-alimentares de insetos, atraentes de polinização e agentes defensores contra herbívoros. Assim, sabendo-se que as plantas podem produzir substâncias que as defendam de microrganismos, elas se tornam fontes alternativas de potenciais agentes antibacterianos e antifúngicos que sejam eficazes contra microrganismos patogênicos ao ser humano e aos demais animais (GILMAN *et al.*, 1996).

Muitas espécies vegetais do Brasil são usadas principalmente como fontes de materiais de construção e carpintaria, para fabricação de carvão e celulose e para extração de componentes químicos com valor comercial para atender a demanda internacional. Assim, permanecemos assistindo a um processo de devastação desordenado e indiscriminado, sem adotar uma posição compatível com a preservação racional (BRAZ-FILHO, 1994).

O extermínio de espécies vegetais prejudica o equilíbrio ambiental e elimina um poderoso laboratório vivo de produtos químicos, muitos deles úteis para a manutenção do sistema ecológico e para auxiliar na cura de doenças (BRAZ-FILHO, 1994).

A ocorrência de substâncias antibióticas desempenhando um papel na resistência oferecida aos agentes antimicrobianos de deterioração pelas “madeiras de lei” do Brasil foi uma hipótese considerada por Gonçalves de Lima em 1956 a partir de resultados obtidos por pesquisadores europeus sobre os antibióticos pinossilvina e tuiaplicina de cernes de madeiras como o

*Pinus silvestris* e *Thuja plicata*, sendo o primeiro ativo contra fungos apodrecedores de lenho, o mesmo ocorrendo em relação a beta-tuiaplicina (LIMA, 1959).

No presente trabalho foi escolhida, dentre as madeiras de lei, a espécie *Hymenaea stigonocarpa* Mart ex Hayne, pertencente à família Leguminosae-Caesalpinioideae, tendo em vista o conhecimento de que o gênero *Hymenaea* é utilizado na medicina popular e de não haver trabalhos publicados sobre os constituintes químicos do alburno desta espécie.

## **2 - OBJETIVOS**

### **2.1 – Geral**

- Contribuir para a química de produtos naturais na busca de constituintes químicos biologicamente ativos de madeiras de lei.

### **2.2 - Específicos**

- Preparar extratos brutos do alburno de *Hymenaea stigonocarpa* com os solventes orgânicos etanol, acetato de etila e ciclohexano.
- Realizar ensaios antimicrobianos com os extratos brutos de *H. stigonocarpa*.
- Avaliar a concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos brutos de *H. stigonocarpa*.
- Identificar por CG/MS constituintes químicos do extrato apolar de *H. stigonocarpa*.



### **3 – REVISÃO DA LITERATURA**

#### **3.1 - Considerações sobre madeira**

A madeira é um material heterogêneo, possuindo diferentes tipos de células, adaptadas a desempenharem funções específicas. As variações nas composições químicas, físicas e anatômicas da madeira são grandes entre espécies, embora dentro da mesma espécie elas também ocorram, em função principalmente da idade, fatores genéticos e ambientais. Dentro de uma mesma espécie ocorrem variações significativas com a altura do tronco e na direção da medula até a casca. Além disso, existem diferenças entre o cerne e o alburno, madeira de início e fim de estação de crescimento e, em escala microscópica, entre células individuais.

As hemiceluloses juntamente com a celulose formam a fração da madeira denominada holocelulose. São os principais polissacarídeos não-celulósicos da madeira estando sempre associados à lignina e a celulose, ocorrem ao longo de toda a parede celular.

A lignina é um polímero de natureza aromática e tridimensional, com alto peso molecular, que tem como base estrutural, unidades de fenil-propano ligados a grupos metoxílicos e hidroxílicos, dependendo do tipo de madeira. Segundo SJÖSTRÖM (1993), as unidades de fenilpropano são mantidas juntas tanto por ligações éter (C-O-C) como ligações carbono-carbono (C-C). A ligação éter é dominante, apresentando aproximadamente 2/3 ou mais das ligações da lignina, e o restante é do tipo carbono-carbono. Encontra-se intimamente associada aos carboidratos da madeira, não só através de entrelaçamento físico, mas também, através de ligações químicas (BARRICHELO & BRITO, 1985).

A lignina se apresenta como o componente mais hidrofóbico da madeira, atuando como material cimentante ou adesivo entre as fibras (PETTERSEN, 1984) além de conferir dureza e rigidez à parede celular.

Uma das principais propriedades das madeiras é a sua maior ou menor suscetibilidade em ser atacada por organismos xilófagos, dentre esses, destacam-se os fungos apodrecedores. Madeiras que apresentam elevada durabilidade natural a esses organismos podem ser destacadas por um alto grau de nobreza, conferindo-lhes um amplo espectro de utilização e, conseqüentemente, tornando-as mais valorizadas no mercado. Sabe-se que o grau de resistência aos agentes biológicos é muito variável entre as madeiras, sendo um grande número destas caracterizadas por apresentarem elevada resistência ao ataque de insetos e de fungos apodrecedores (OLIVEIRA *et al*, 2005).

A durabilidade natural das madeiras é conferida pelos seus componentes secundários, que na maioria das vezes se apresentam em pequenas proporções, mas podem, em algumas espécies, atingir valores elevados (OLIVEIRA & LÚCIA, 1994). Esses componentes, denominados extrativos, podem ser retirados da madeira por água e solventes orgânicos, como etanol, acetona, diclorometano, metanol e etanol/tolueno, entre outros, ou mesmo por volatilização. Os extrativos que conferem durabilidade à madeira são normalmente formados durante a transformação do alburno em cerne, sendo de caráter fenólico e polifenólico, que se acumulam nos lumens e paredes das células, resultando, na maioria das vezes, numa coloração escura do cerne.

### **3.1.2 - Teor de extrativos**

Extrativos são compostos químicos acidentais, considerados não essenciais para a estrutura das paredes celulares e lamela média. São solúveis em água ou outros solventes orgânicos neutros. Entre os extrativos, citam-se

os terpenos, as resinas, os óleos voláteis, as graxas, as ceras e os taninos. Para a produção de celulose por meio de processos químicos, os extrativos são compostos indesejáveis, reduzindo o rendimento e prejudicando a qualidade da polpa (PEREIRA *et al.*, 2000).

### **3.1.3 - Alburno e cerne**

O cerne apresenta diferenças marcantes em relação ao alburno, as quais podem ser interessantes ou não de acordo com a utilização da madeira. Algumas das diferenças mais importantes são:

- a) o cerne contém mais compostos fenólicos e ácidos e menos amido que o alburno;
- b) a lignina do cerne apresenta um peso molecular mais elevado e é mais condensada;
- c) o cerne apresenta menor teor de umidade devido à redução da atividade fisiológica;
- d) o cerne é menos permeável, possui tecido mais compacto e, geralmente, menos denso que o alburno.

Contudo as diferenças na composição química, física e morfológica da madeira são variáveis entre e dentro das espécies, o que leva à geração de produtos distintos. Tais diferenças existentes entre cerne e alburno fazem com que estes materiais tenham comportamento diferenciado, tanto do ponto de vista físico, como químico e morfológico. Dessa forma, o cerne e o alburno apresentam comportamento distinto de acordo com a forma de utilização da madeira (SILVA & TRUGILHO, 2003).

### 3.1.4 - Madeira de lei

A flora nacional é rica em espécies que fornecem madeiras de lei (PAULA & ALVES, 1997). Observa-se a predominância de espécies pertencentes à família Leguminosae.

- *Phoebe porosa* (imbuia) - LAUREACEA
- *Bowdichia virgilioides* (sucupira) - LEGUMINOSAE
- *Machaerium scleroxylon* (caviúna) - LEGUMINOSAE
- *Caesalpinia ferrea* (pau-ferro) - LEGUMINOSAE
- *Caesalpinia echinata* (pau-brasil) - LEGUMINOSAE
- *Tabebuia heptaphylla* (pau d'arco) - BIGNONIACEAE
- *Dalbergia nigra* (jacarandá da Bahia) - LEGUMINOSAE
- *Torresea cearensis* (cerejeira) - LEGUMINOSAE
- *Cordia goeldiana* (freijó) - BORAGINACEAE
- *Cedrela fissilis* (cedro) - MELIACEAE
- *Manilkara huberi* (maçaranduba) – SAPOTACEAE
- *Ocotea glomerata* (louro) - LAURACEAE
- *Hymenaea stigonocarpa* (jatobá) - LEGUMINOSAE

### **3.2 - Metabólitos primários**

Uma grande porcentagem dos princípios ativos das plantas, que está compreendida dentro dos chamados Metabólitos Primários, está universalmente distribuída e participa da atividade celular de todo ser vivo e cumpre funções vitais. São exemplos de metabólitos primários: proteínas, aminoácidos, ácidos nucleicos, polissacarídeos e fosfolipídios (GOTTLIEB, 1990).

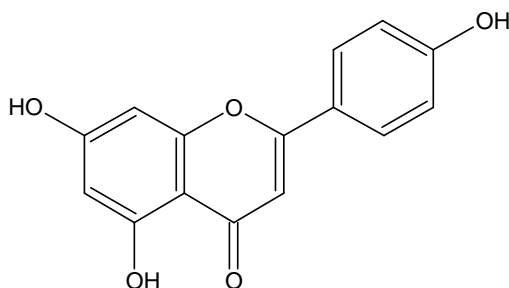
### **3.3 - Metabólitos secundários**

Metabólitos secundários de plantas são compostos micromoleculares evolutivamente selecionados para conferir vantagens adaptativas às plantas. Essas substâncias participam diretamente das interações bioquímicas de convivência e comunicação entre as plantas e os vários organismos vivos no sistema ambiental. Ao longo do processo evolutivo as plantas desenvolveram mecanismos de defesa para sua sobrevivência. Dentre as formas de proteção adquiridas, foram desenvolvidas rotas biossintéticas — hoje conhecidas como metabolismo secundário — para produção de substâncias nocivas e tóxicas aos inúmeros parasitas e predadores (SALISBURY & ROSS, 1992).

Flavonóides, lignanas, terpenos, alcalóides, esteróis, ácidos graxos, taninos, açúcares, suberinas, ácidos resinóicos e carotenóides são algumas das muitas classes de compostos conhecidos como “metabólitos secundários” (HARBORNE *et al.*, 1999).

### 3.3.1 - Flavonóides

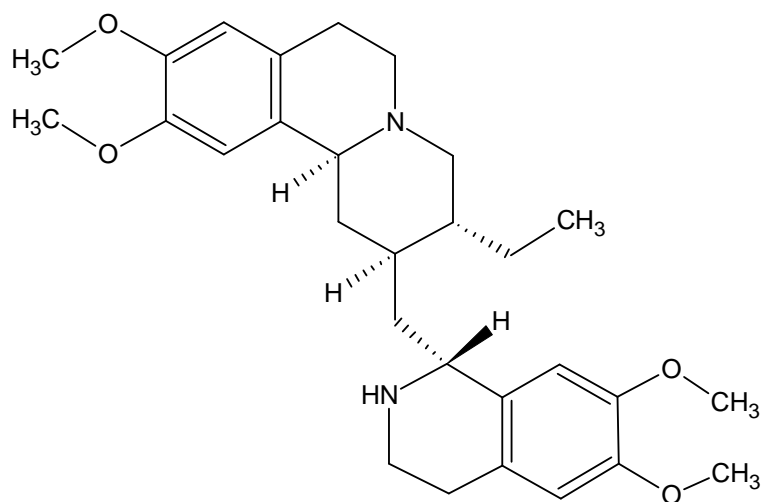
São biossintetizados a partir fenilpropanóides. Possuem 15 C no núcleo fundamental e constituem uma classe importante de polifenóis, abundantes nos metabólitos secundários das plantas. Na Figura 1 encontra-se a estrutura da apigenina um flavonóide anticancerígeno.



**FIGURA 1** – Estrutura do flavonóide apigenina

### 3.3.2 - Alcalóides

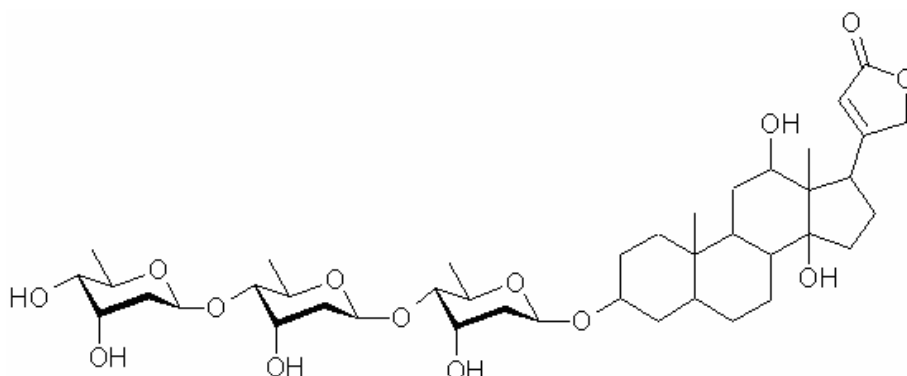
Compostos cíclicos nitrogenados farmacologicamente ativos encontrados nas angiospermas. Um exemplo representativo desta classe é o antihelmíntico emetina (Figura 2).



**FIGURA 2** – Estrutura do alcalóide emetina

### 3.3.3 - Glicosídeos cardiotônicos

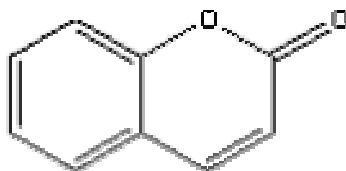
Glicosídeos estereoidais caracterizados pela alta especificidade e poderosa ação que exercem no músculo cardíaco. Um exemplo representativo dessa classe o qual merece destaque pela sua importância é a digoxina (Figura 3).



**FIGURA 3** - Estrutura da digoxina

### 3.3.4 - Cumarinas

Lactonas do ácido o-hidróxi-cinamo. São amplamente distribuídas nos vegetais, mas podem ser encontradas em fungos e bactérias. Suas propriedades farmacológicas e aplicações terapêuticas dependem de seus padrões de substituição. São chamados de cumarinas os compostos que apresentam como núcleo fundamental a estrutura química 2H-1-benzopiran-2-ona denominada cumarina (Figura 4).

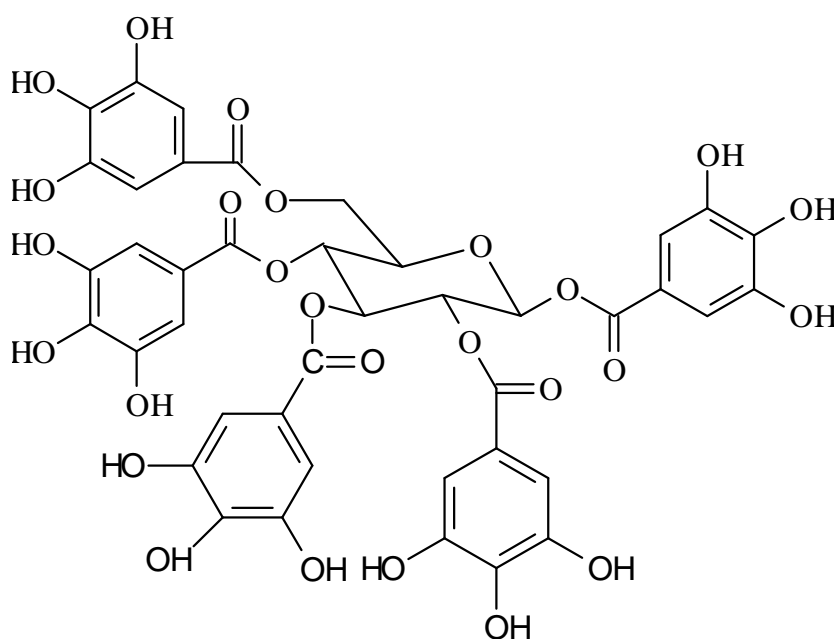


**FIGURA 4** – Esqueleto fundamental das cumarinas



### 3.3.5 - Taninos

Substâncias fenólicas solúveis em água, que formam complexos insolúveis com alcalóides, gelatina e outras proteínas. São responsáveis pela adstringência de frutos e/ou produtos. Taninos agregados a proteínas são a base de propriedades tais como controle de insetos, fungos e bactérias. A estrutura do tanino hidrolisável -  $\beta$ -1,2,3,4,6-pentagaloil-D-glucose está representada na Figura 5.

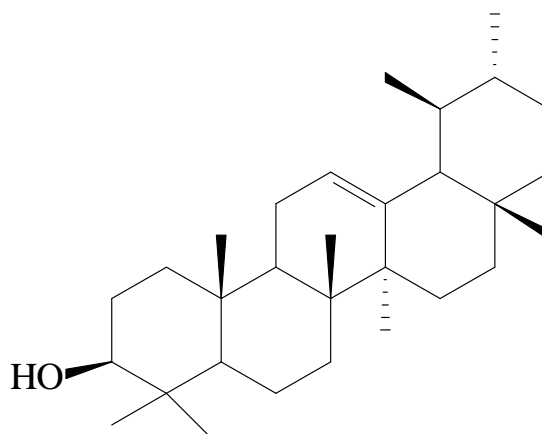


**FIGURA 5** – Estrutura do tanino hidrolisável  $\beta$ -1,2,3,4,6-pentagaloil-D-glucose

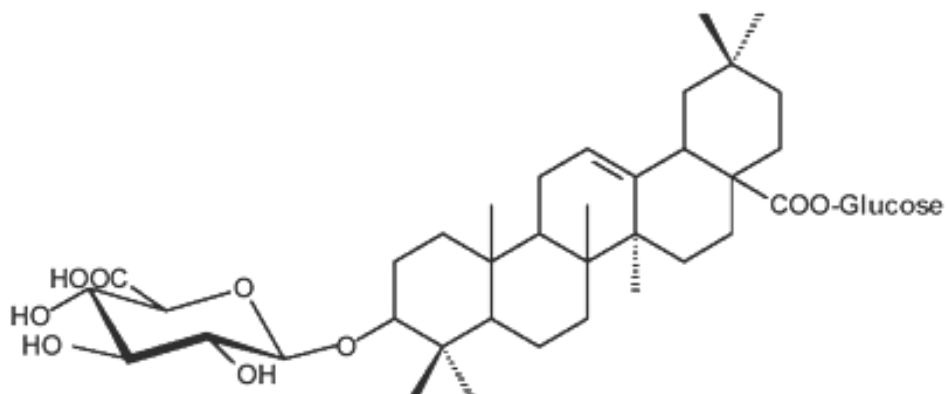
### 3.3.6 - Triterpenos e/ou esteróides

Os triterpenos (C<sub>30</sub>) originam-se da ciclização do esqualeno e podem ser triterpenos comuns, esteróides e saponinas, por exemplo. Os esteróides (C<sub>27</sub>) podem ser metabólitos dos triterpenos. A  $\alpha$ -amirina (Figura 6) é um triterpeno pentacíclico com atividade antiinflamatória.

As saponinas possuem uma parte com característica lipofílica (triterpeno ou esteróide) e outra hidrofílica, que determina a propriedade de redução da tensão superficial da água e sua ação detergente e emulsificante. Na Figura 7 encontra-se a estrutura química de uma saponina a  $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucuronopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)]-3 $\beta$ -hydroxioleano-12-ene-28-oato.



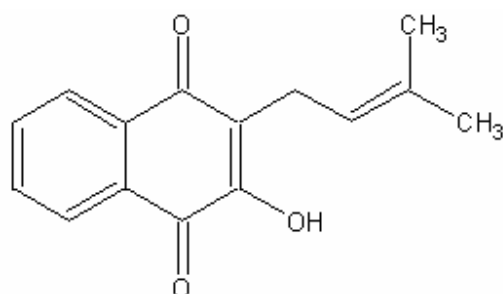
**FIGURA 6** - Estrutura da  $\alpha$ -amirina



**FIGURA 7** - Estrutura da  $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucuronopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)]-3 $\beta$ -hydroxioleano-12-ene-28-oato.

### 3.3.7 – Derivados antracênicos livres

Quinonas são compostos orgânicos que podem ser considerados como produtos da oxidação de fenóis. Um importante exemplo desta classe é o composto antitumoral lapachol que é uma naftoquinona (Figura 8)



**FIGURA 8** - Estrutura do lapachol

### 3.4 - Família Leguminosae-Caesalpinioideae

A família Leguminosae está entre as maiores famílias de Angiospermas sendo dividida em três subfamílias: Faboideae (Papilionoideae), Caesalpinioideae e Mimosoideae composta por aproximadamente 650 a 700 gêneros e mais de 18.000 espécies distribuídas em todo o mundo, especialmente nas regiões tropicais e subtropicais (GOODLAND, 1979).

No entanto, há taxonomistas que não consideram essa subdivisão e as tratam como famílias independentes: Fabaceae, Caesalpinaceae e Mimosaceae, por serem as três muito distintas entre si (BANDEL, 1972 *apud* TELES *et al.*, 1994).

Quanto ao número de gêneros e espécies, a subfamília Faboideae apresenta-se com aproximadamente 482 gêneros e 12.000 espécies, seguida pelas Caesalpinioideae com 152 gêneros e 2.800 espécies e pelas Mimosoideae com 60 gêneros e 3.000 espécies (BARROSO, 1991; BARROSO *et al.*, 2002; JOLY, 1998).

Na medicina popular algumas espécies da família Leguminosae são utilizadas por apresentarem atividade antiinflamatória, antimicrobiana, anti-helmíntica, analgésica, hipoglicemiante, diurética, digestiva, laxativa, no combate à elefantíase, como expectorante e como protetor hepático (FONSECA & NOVA, 2004).

#### 3.4.1 - O gênero *Hymenaea*

O gênero *Hymenaea* pertence à família Leguminosae-Caesalpinioideae é produtor de resina e tem uma distribuição anfi-atlântica (LEE & LANGENHEIM *et. al.*, 1975). A palavra *Hymenaea* deriva do grego "*Hymen*"

e significa "deus das uniões" em alusão às duas folhas (folíolos) unidas, característica das plantas deste gênero. O nome popular jatobá vem da língua tupi, va-atã-yba, que significa “árvore de fruto duro” (BARROSO, 1991).

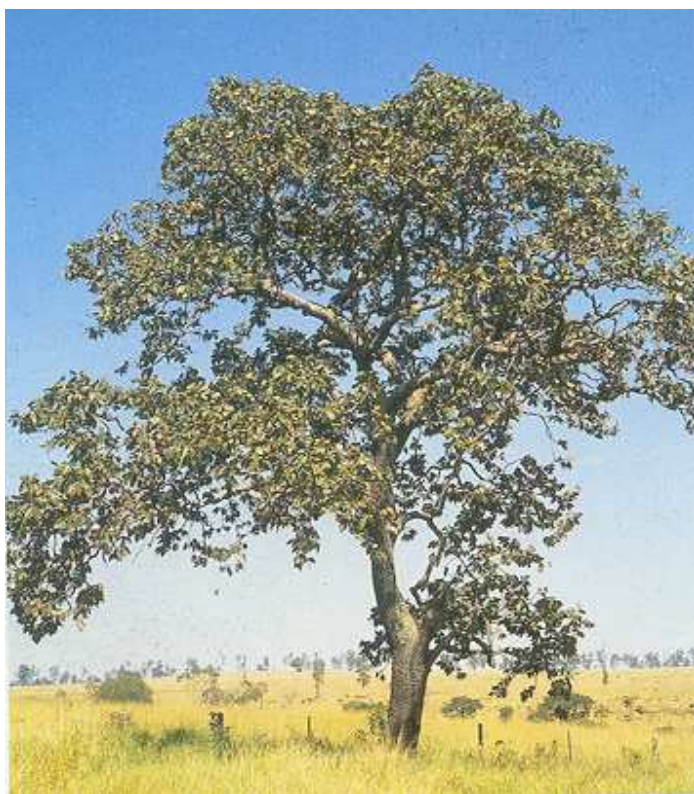
Espécies desse gênero são primariamente encontradas na bacia amazônica, mas ocorrem também na América central e no leste da África (PETIT *et al.*, 2003). Aproximadamente 25 espécies do gênero *Hymenaea* têm sido descritas na literatura como originadas do continente americano. Na maioria das espécies a madeira é de alto valor comercial (MARTIN *et al.*, 1974).

Ocorre em todo o Brasil, tanto em matas pluviais como em matas secas, também no México, América Central, Índias Ocidentais e quase todos os países da América do Sul. No Brasil são conhecidas 13 espécies (CORRÊA, 1984; RIZZINI, 1985):

- *Hymenaea altíssima* Ducke
- *Hymenaea martiana* Hayne
- *Hymenaea splendida* Vog.
- *Hymenaea correana* Barb. Rodr.
- *Hymenaea chapadensis* Barb. Rodr.
- *Hymenaea rubiflora* Ducke
- *Hymenaea velutina* Ducke
- *Hymenaea capanema* Ducke
- *Hymenaea eriogyne* Benth.
- *Hymenaea intermédia* Ducke
- *Hymenaea stilbocarpa* Hayne
- *Hymenaea courbaril* L.
- *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne

### 3.4.2 - Espécie *Hymenaea stigonocarpa*

O jatobá do campo ou jatobá do cerrado, *Hymenaea stigonocarpa* (Figura 9), é uma espécie característica de formações abertas do cerrado e campo-cerrado (ALMEIDA *et al.*, 1998). Trata-se de uma espécie possuidora de fruto adocicado e flor, muito procurada pela fauna, sendo, por isso, uma espécie útil nos plantios em áreas degradadas destinadas à recomposição da vegetação arbórea (LORENZI, 1998).



**FIGURA 9** - Jatobá do cerrado (*Hymenaea stigonocarpa* Mart ex Hayne)  
(Fonte: LORENZI, 1998)

### **3.4.2.1 - Posição taxonômica de *Hymenaea stigonocarpa* Mart ex Hayne, segundo Barroso, 1991**

**REINO** Plantae

**FILO** Magnoliophyta

**CLASSE** Magnoliopsida

**ORDEM** Rosales

**FAMÍLIA** Leguminosae

**SUBFAMÍLIA** Caesalpinioideae

**GÊNERO** *Hymenaea*

**ESPÉCIE** *Hymenaea stigonocarpa* Mart ex Hayne

### **3.4.2.2 - Descrição botânica**

É uma planta perenifólia ou semidecídua, ou seja, que não perde totalmente as folhas durante o ano ou as perde parcialmente. Pouco exigente em fertilidade do solo, é adaptada ao crescimento a pleno sol ou a meia sombra, com nítida preferência por solos bem drenados. Floresce no período de outubro a abril com pico de dezembro a março e fornece frutos de abril a julho (LORENZI, 1998; ALMEIDA *et al.*, 1998).

A árvore é característica dos cerrados brasileiros medindo de 6 a 9 m de altura podendo chegar de 30 a 50 cm de diâmetro no tronco. Sua casca possui de 2 a 3 cm de espessura, profundamente sulcada, com coloração pardo-avermelhada(Figura 10), com cristas planas e duras.



**FIGURA 10** – Casca do tronco de *Hymenaea stigonocarpa*  
(Fonte: LORENZI, 1998)

Apresenta inflorescência (Figura 11) terminal com várias flores de coloração branca.

A polpa das sementes (Figura 12) é rica em cálcio e magnésio e além de fornecer alimento à fauna é ótima para alimentação humana. Seus frutos são altamente alimentícios apresentando polpa seca, farinácea, adocicada, de sabor e cheiro muito característicos (CORRÊA, 1984; ROCHA *et al.*, 1992).

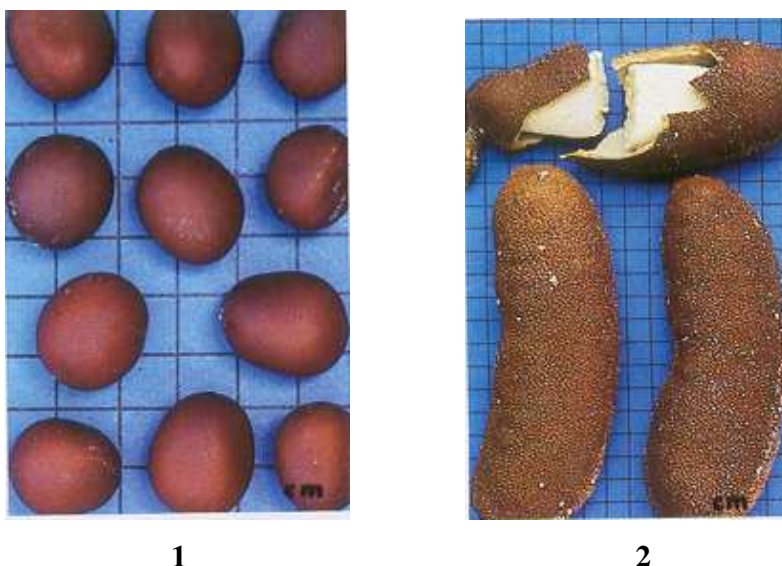


**FIGURA 11** - Florescência do jatobá do cerrado (*Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne)  
(Fonte: [www.serracanastra.com.br/ album/cerradao3.html](http://www.serracanastra.com.br/album/cerradao3.html))



Os frutos (legume) são maiores nesta do que nas demais espécies (Figura 12), oblongos e castanho sendo bem mais robustos com comprimento entre 10 a 20 cm e diâmetro entre 4 a 6 cm, contendo até 13 sementes (RIZZINI, 1985).

A polpa dos frutos é consumida na forma de geléia, licor, farinhas para bolos, pães e mingaus. Existem dezenas de receitas para confecção de bolachas, pães, bolos e mingaus com a farinha de jatobá. (ROCHA *et al.*, 1992; SILVA *et al.*, 1994).



**FIGURA 12** – Sementes (1) e frutos (2) do jatobá do cerrado.

#### **3.4.2.3 - Madeira do jatobá do cerrado**

Seu tronco (Figura 13) fornece madeira dura, pesada (densidade média de 0,90 g/cm<sup>3</sup>), de cor vermelho-pardacenta, muito durável quando fora do chão, utilizada para construção pesada, esteios, vigas, assoalhos, carrocerias, móveis e tonéis (LORENZI, 1998). O lenho possui duas partes distintas denominadas

VALENTIM, A. P. T.; Atividade Antimicrobiana, Estudo Fitoquímico e Identificação de Constituintes Apolares do Alburno de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex. Hayne (jatobá)

de alburno de cor branca-amarelada e o cerne de cor variável podendo ser do castanho-amarelado a castanho-avermelhado.

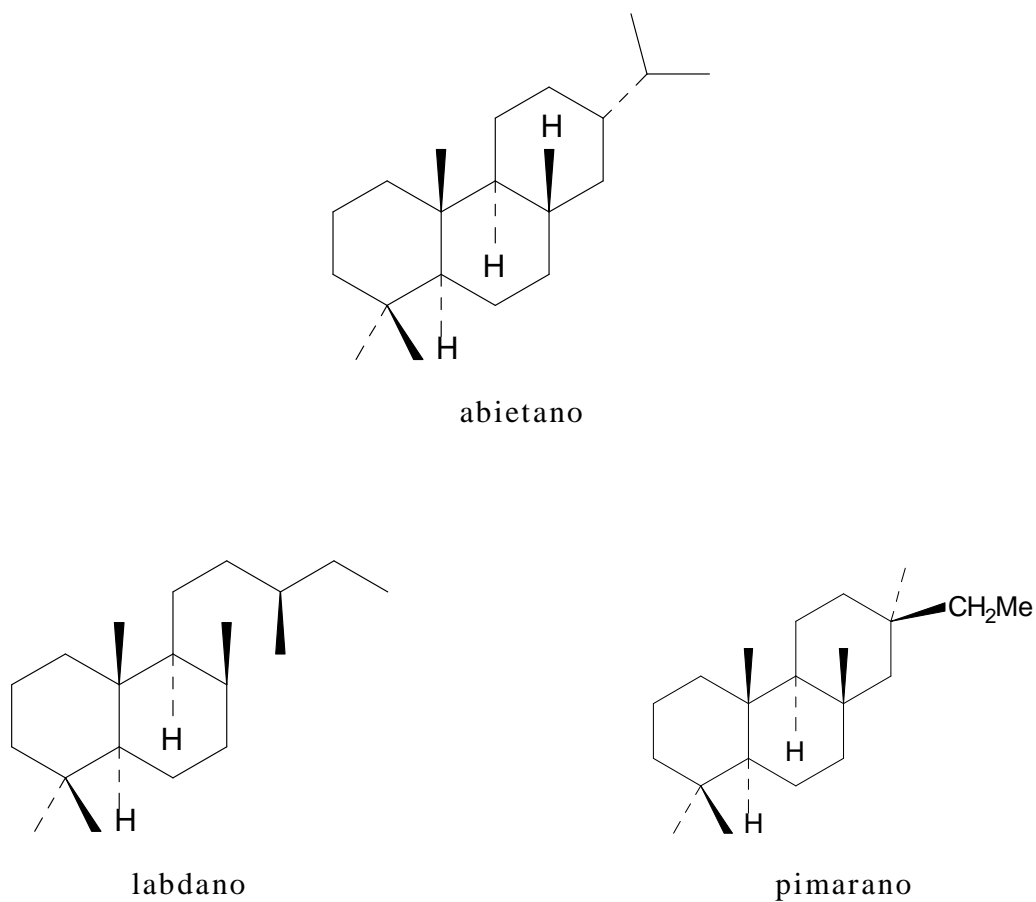


**FIGURA 13** - Tora do jatobá mostrando o cerne e alburno distintos.

O alburno chamado de madeira de início e o cerne conhecido por madeira de fim, apresentam modificações durante cada estação de crescimento. Esta transformação do alburno em cerne é conhecida como processo de cernificação, sendo caracterizado pela morte das células do parênquima radial, consumo de amido, aumento no conteúdo de extrativos e tiloses (em alguns gêneros), consumo de oxigênio e liberação de CO<sub>2</sub> (SILVA & TRUGILHO, 2003).

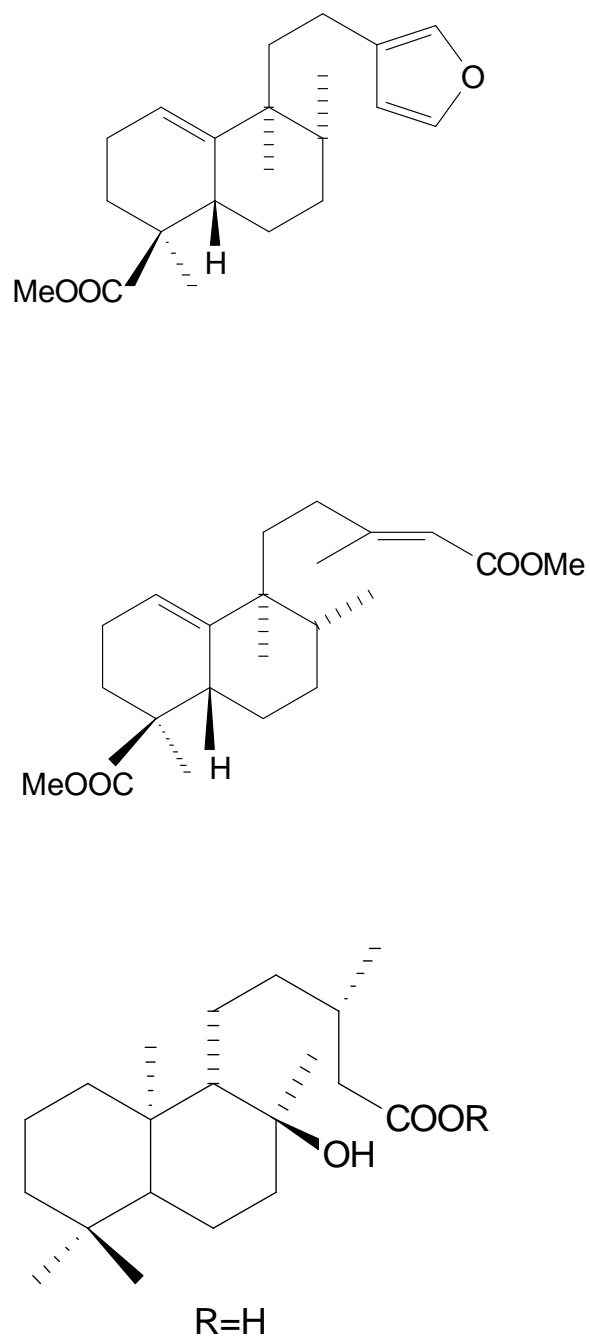
### **3.5 - Espécies de *Hymenaea* estudadas e atividade biológica**

Diterpenóides baseados nos esqueletos do labdano, abietano e pimarano (Figura 14) são predominantes em espécies de *Hymenaea* (FARIA *et al*, 2004).



**FIGURA 14-** Estrutura de diterpenóides isolados de espécies de *Hymenaea*.

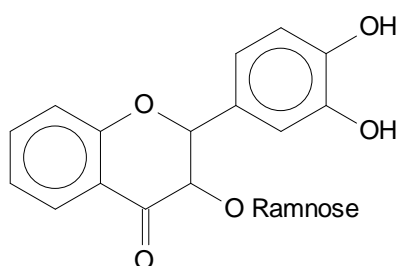
Diterpenos bicíclicos foram isolados de espécies de *Hymenaea* como *H. verrucosa*, *H. oblongifolia* e *H. parvifolia*. Os compostos apresentados na Figura 15 são exemplos desses diterpenos.



**FIGURA 15** – Estruturas de diterpenos isolados de espécies de *Hymenaea*

### 3.5.1 - *Hymenaea parvifolia*

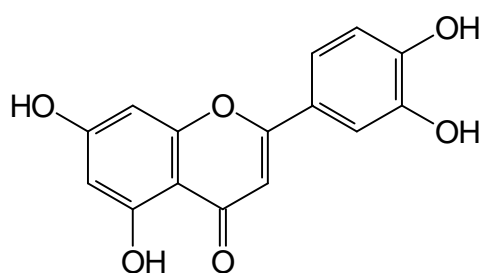
Foi estudada em 1999 por Ishibashi e colaboradores os quais isolaram, da resina do tronco, o flavonóide glicosilado astilbina (Figura 16) protótipo para um analgésico muito mais potente do que várias drogas tradicionalmente usadas na clínica.



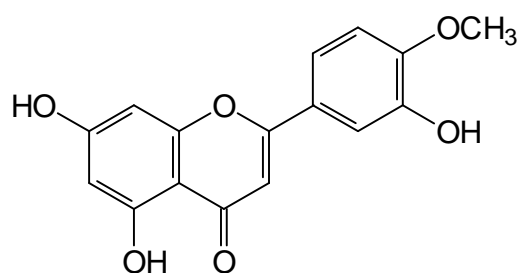
**FIGURA 16** – Estrutura da astilbina

### 3.5.2 - *Hymenaea palustris*

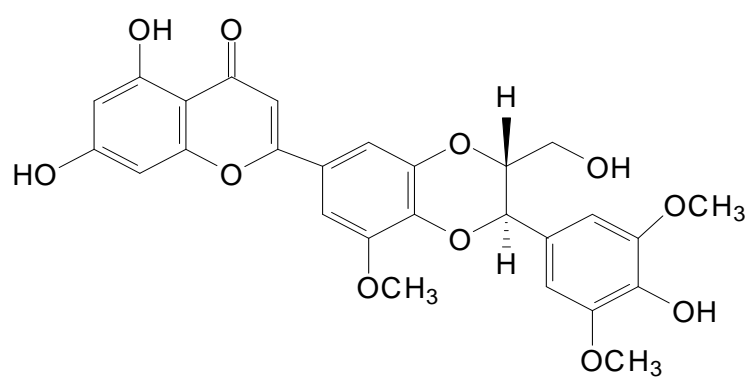
Pettit *et al.*, 2003 isolaram os flavonóides luteolina, crisoeriol, palstatina (Figura 17). das folhas de *H. palustris* Esses compostos apresentaram potente atividade inibitória frente a patógenos Gram-negativos como a *Neisseria gonorrhoeae*. A palstatina um dos flavonóides isolados atua como inibidor do crescimento de células leucêmicas linfóticas tipo P388.



luteolina



crisoeriol



palstatina

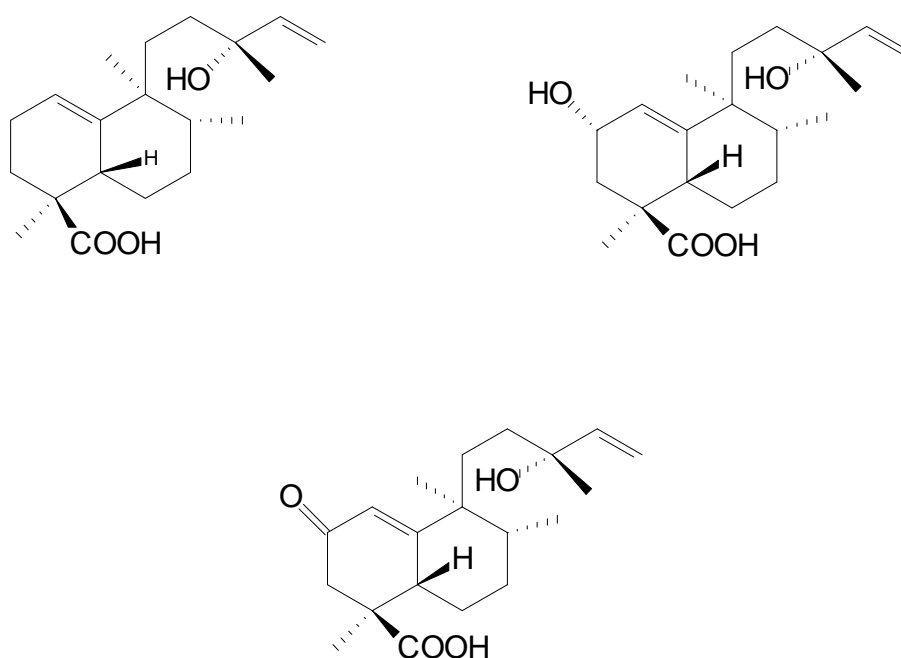
**FIGURA 17** – Estruturas dos flavonóides luteolina , crisoeriol , palstatina.

### 3.5.3 - *Hymenaea courbaril*

A espécie *Hymenaea courbaril* é a espécie mais estudada até o momento. A maioria dos trabalhos publicados relata a presença e ação de oligossacarídeos e polissacarídeos.

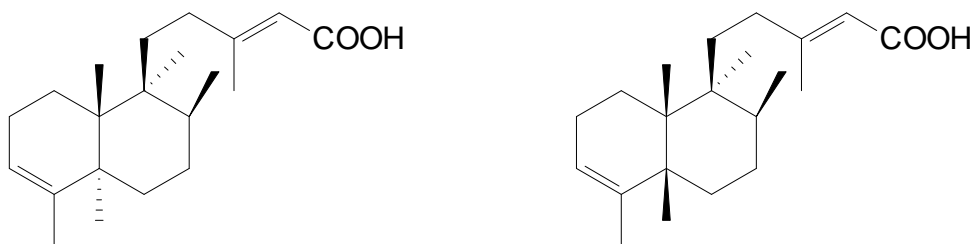
Oligossacarídeos foram isolados das sementes de *H. courbaril* (LIMA *et al.*, 1995), e das folhas foram isolados polissacarídeos (BUSATO *et al.*, 2001; REICHER *et al.*, 2001).

Diterpenos do tipo halimadieno (CUNNINGH. A; MARTIN S.S; LANGENHEIM, 1974) foram isolados das folhas, galhos e do tronco (Figura 18). Estes diterpenos apresentaram atividade citotóxica frente a células tumorais humanas de ovário, linhagem A2780 (ABDEL-KADER *et al.*, 2002)



**FIGURA 18** – Estruturas de diterpenos do tipo halimadieno isolados de *H. courbaril*

Em 2001, Imamura *et al.* isolaram das sementes diterpenos e entre eles dois novos clerodanos (Figura 19).



**FIGURA 19** – Estruturas de clerodanos isolados de *H. coubaril*

Em 1972 Martin e colaboradores isolaram das folhas de *H. coubaril* os sesquiterpenos  $\alpha$ -copaeno e  $\alpha$ -cubebeno (Figura 20).



**FIGURA 20** – Estruturas dos sesquiterpenos isolados das folhas de *H. courbaril*



### 3.5.4 - *Hymenaea stigonocarpa*

A resina produzida pela espécie *H. stigonocarpa* é conhecida como "jutaicica" ou "copal", é utilizada na indústria de vernizes e como medicamento no tratamento de cistite e problemas respiratórios (ALMEIDA *et al.*, 1998).

Sesquiterpenos foram isolados das folhas desta espécie o  $\beta$ -cariofileno e  $\gamma$ -muroleno (Figura 21) (LANGENHEIM *et al.*, 1986).



**FIGURA 21** - Estruturas dos sesquiterpenos isolados das folhas de *H. stigonocarpa*

Wiemer *et al.*, 1983 pesquisaram o efeito repelente a formigas de algumas espécies de plantas, como por exemplo o jatobá. Após alguns ensaios, os autores verificaram que o epóxido do cariofileno era o composto responsável pela resistência nessa espécie de planta contra o ataque de formigas.

### **3.6 - Métodos cromatográficos para identificações de substâncias**

Os termos “cromatografia”, “cromatograma” e “método cromatográfico” são atribuídos ao botânico Mikhael Semenovitch Tswett, que em 1906, utilizou-os em dois trabalhos descrevendo suas experiências na separação dos componentes de extratos de folhas e gema de ovo, onde usou colunas de vidro recheadas com vários sólidos, finalmente divididos, e arrastou os componentes com éter de petróleo (NETO *et al.*, 2003).

O nome deriva-se das palavras gregas “chrom” (cor) e “ graphe ” (escrever), embora o processo não dependa da cor, exceto para facilitar a visualização dos componentes separados. Entre os métodos modernos de análise, a cromatografia ocupa um lugar de destaque devido a sua facilidade em efetuar a separação, identificação e quantificação das espécies químicas, por si mesma ou em conjunto com outras técnicas instrumentais de análise, como, por exemplo, a espectrofotometria ou a espectrometria de massas (CAZES, 2001).

A cromatografia é um método físico-químico de separação de componentes de uma mistura, realizada através da distribuição destes componentes entre duas fases, que estão em contato íntimo. Uma das fases permanece estacionária enquanto a outra se move através dela. Durante a passagem da fase móvel sobre a fase estacionária, os componentes da mistura são distribuídos entre as duas fases, de tal forma que cada um dos componentes é seletivamente retido pela fase estacionária, resultando em migrações diferenciais destes componentes (COLLINS, BRAGA, BONATO, 1990).

Entretanto, considera-se que a classificação mais importante em cromatografia baseia-se no mecanismo de separação, que pode ser por processos físicos, químicos ou mecânicos. Os processos físicos são de sorção-adsorção (partição) e são baseados principalmente em atrações eletrostáticas ou dipolares (forças de Van der Waals), incluindo a formação de pontes de hidrogênio. Quando se trata de um sólido, como sílica ou alumina, como fase estacionária, a adsorção do soluto ocorre na interfase

entre o sólido e a fase móvel, devido à presença de grupos ativos nas suas superfícies.

A desorção do soluto implica na volta deste à fase móvel. Este é o mecanismo mais comumente encontrado em cromatografia em camada delgada (CDC), em cromatografia gás-sólido (CGS), cromatografia líquido-sólido (CLS) e cromatografia supercrítica com fase estacionária sólida (CSS).

### **3.6.1 - Cromatografia por adsorção**

Considera-se a cromatografia quando se usa uma coluna recheada com um sólido (fase estacionária) e uma fase móvel líquida, onde a sorção isotérmica (adsorção) refere-se a um aumento da concentração do material (que está em excesso na fase móvel) entre as superfícies das fases móvel e estacionária. Esta cromatografia em coluna (adsorção) pode ser primeiramente escolhida porque é tecnicamente mais simples não exigindo instrumentação esmerada.

Dependendo do tamanho da coluna usada, é facilmente aplicada para fins preparativos, devendo ser monitorada, principalmente, por cromatografia em camada delgada. A fase móvel, quando está passando através do adsorvente na coluna, arrasta consigo os componentes da amostra que está sendo cromatografada (Figura 22). A velocidade de movimento descendente de um componente depende de sua adsorção pela fase estacionária, isto é, quanto mais fracamente o componente for adsorvido mais rápido é sua passagem pela coluna, e vice versa.

Então, quanto maior a diferença entre os coeficientes de adsorção, mais completa será a separação do composto (terá maior grau de pureza). Esta separação dos componentes de uma mistura é devido às diferenças nas forças de adsorção (forças eletrostáticas de Van der Waals) entre eles e o adsorvente (COLLINS, BRAGA, BONATO, 1990).



**FIGURA 22** – Coluna cromatográfica, modelo clássico

### **3.6.2 - Cromatografia em Camada Delgada (CDC)**

Cromatografia em camada delgada (CDC) consiste na separação dos componentes de uma mistura através da migração diferencial sobre uma camada delgada de adsorvente retido sobre uma superfície plana. Esta técnica teve início com os trabalhos de Izmailov e Shraiber em 1938, sendo que somente a partir da década de 60 passou a ser largamente utilizada, de tal forma que hoje é praticamente indispensável em qualquer laboratório que envolva análise de substâncias orgânicas e organometálicas.

O grande desenvolvimento desta técnica é consequência natural das múltiplas vantagens que ela oferece, tais como: fácil compreensão e execução, separações em breve espaço de tempo, versatilidade, grande reprodutibilidade e baixo custo. Pode ser de aplicação analítica ou preparativa, cuja escala está na dependência da espessura da camada de adsorvente e da amostra em análise (CAZES, 2001).

### **3.6.3 - Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas**

Gases ou substâncias volatilizáveis podem ser separados, utilizando a técnica denominada “Cromatografia Gasosa”. A separação baseia-se na diferente distribuição da amostra entre uma fase estacionária (sólida ou líquida) e uma fase móvel (gasosa).

A cromatografia gasosa é uma técnica com um poder de resolução excelente, tornando possível, muitas vezes, análise de dezenas de substâncias presentes em uma mesma amostra. Um dos principais motivos que tornam a cromatografia gasosa de uso bastante acentuado é a sua sensibilidade, a qual faz com que haja necessidade de apenas pequenas quantidades de amostra, o que em certos casos, é um fator crítico e limita a utilização de outras técnicas. É importante salientar ainda, que a cromatografia gasosa é excelente como técnica quantitativa, sendo possível a obtenção de resultados quantitativos em concentrações que variam de picogramas a miligramas.

A espectrometria de massas (EM) utiliza o movimento de íons em campos elétricos e magnéticos para classificá-los de acordo com sua relação massa-carga. Desta maneira, a espectrometria de massas é uma técnica analítica por meio da qual as substâncias químicas são identificadas, através da separação de íons gasosos de acordo com o campo elétrico e magnético. O instrumento que realiza essa operação é conhecido como espectrômetro de massas.

A EM oferece informação qualitativa e quantitativa sobre a composição atômica e molecular de materiais inorgânicos e orgânicos (COLLINS, BRAGA, BONATO, 1990). A cromatografia gasosa associada à espectrometria de massas (CG/MS) tem sido considerada uma técnica analítica adequada para a análise de misturas complexas. Tem, no entanto, a grande limitação de ser aplicável apenas a moléculas relativamente voláteis e termicamente estáveis.

### 3.7 - Agentes antimicrobianos

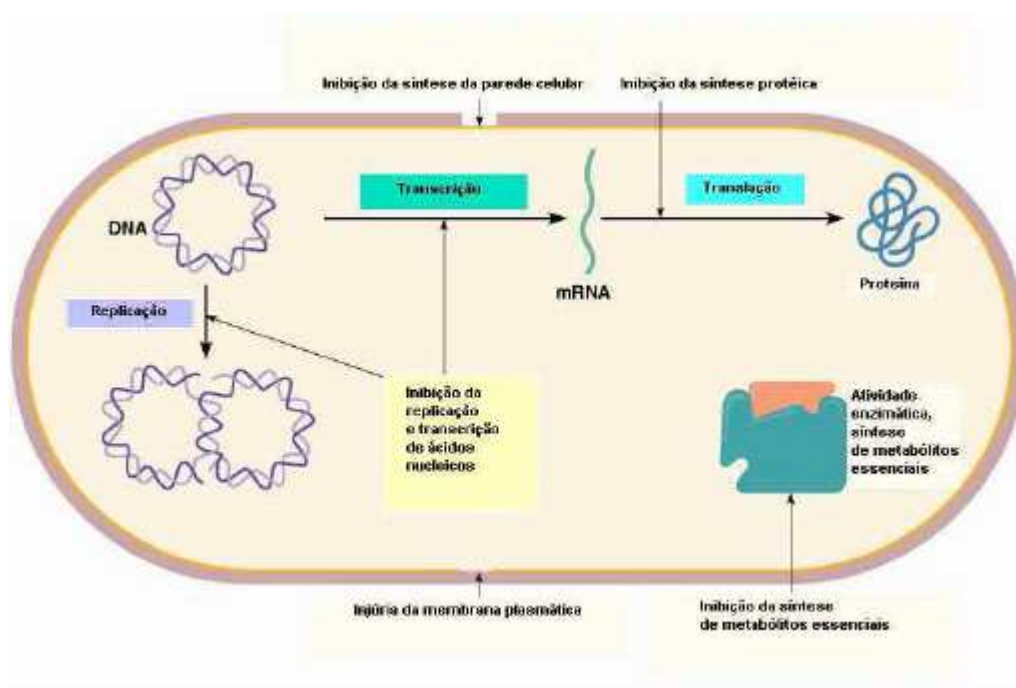
Os fármacos usados no tratamento de doenças infecciosas são denominados agentes antimicrobianos. Este termo passou a ser utilizado a partir da descoberta da penicilina por Fleming em 1929, primeiro antibiótico a ser produzido em escala industrial (ANDREAZZA, 2000; FRANCO, 2003; SOUZA *et al.*, 2003).

O termo antibiótico pode ser definido amplamente como substância biossintetizada por um ser vivo com capacidade de inibir microorganismos e/ou bloquear o crescimento e replicação celulares, em concentrações relativamente pequenas. Do mesmo modo, a denominação quimioterápico caracteriza o tratamento de doenças por meio de substâncias químicas obtidas sinteticamente. Portanto, o que diferencia os dois termos acima citados, utilizados muitas vezes como sinônimos, é a origem dos mesmos (SILVA, 1998).

Algumas classificações são propostas para os antibióticos, de acordo com diferentes critérios. SILVA (1998) classifica-os de acordo com sua estrutura química, origem, farmacocinética e farmacodinâmica. Entretanto SOUZA *et al.* (2003) dividi-os como específicos e inespecíficos, atuando contra o organismo invasor sem afetar o hospedeiro, ou capazes de matar ou inibir o crescimento microbiano *in vitro*, sendo considerados como desinfetantes, antisépticos, germicidas, biocidas, esterilizantes e desinfetantes. Estes não são chamados de quimioterápicos e são de uso exclusivamente tópico.

Outra classificação baseia-se nos testes *in vitro* da atividade dos agentes antimicrobianos. Nesta, são classificados como agentes bactericidas, matando os microorganismos durante a fase de crescimento logarítmico, onde há aumento da susceptibilidade devido ao aumento da atividade metabólica; ou bacteriostáticos, que atuam apenas prevenindo o crescimento microbiano (SILVA, 1998; SOUZA *et al.*, 2003).

Os mecanismos de ação dos agentes antimicrobianos incluem os principais pontos: inibição da síntese do peptidoglicano da parede celular bacteriana; lesão da membrana citoplasmática, interferindo nas funções desta; interferência na síntese de ácido nucléico e proteínas quer seja na interferência da síntese e replicação de DNA, ou na inibição da RNA-polimerase dependente de DNA; e inibição competitiva da síntese de metabólitos essenciais (TORTORA *et al.*, 2001). A Figura 23 ilustra alguns mecanismos de ação antimicrobiana.



**FIGURA 23** – Esquema do mecanismo de ação dos antimicrobianos  
(FONTE: CUMMINGS, 2004)

### 3.7.1 - Resistência aos antimicrobianos

Alguns microorganismos desenvolvem resistência aos antimicrobianos utilizados. Os principais mecanismos desta resistência são realizados através de inativação enzimática, como penicilinases, cefalosporinases,

enzimas modificadoras de aminoglicosídeos de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas; receptores alterados, expressas por alterações ribossômicas, alterações de DNA girase, enzimas bacterianas alteradas; e transporte alterado do antibiótico, por alterações nas proteínas da membrana externa, força protônica reduzida e transporte ativo a partir da célula bacteriana (KONEMAN *et al.*, 1997).

Nas últimas três décadas, apesar de as indústrias farmacêuticas produzirem um expressivo número de novos antibióticos, a resistência microbiana a essas drogas também aumentou. Em geral, as bactérias têm habilidade genética de adquirir e de transmitir resistência às drogas utilizadas como agentes terapêuticos. O problema da resistência microbiana é crescente e a perspectiva futura do uso de drogas antimicrobianas, incerta.

Torna-se urgente adotar, portanto, medidas para enfrentar o problema, entre elas o controle do uso de antibióticos, o desenvolvimento de pesquisas para uma melhor compreensão dos mecanismos genéticos da resistência microbiana e a continuação dos estudos acerca de novas drogas sintéticas e naturais (NASCIMENTO *et al.*, 2000)

### **3.7.2 – Considerações sobre os microrganismos testados**

#### **■ *Staphylococcus aureus***

São cocos Gram-positivos aeróbios ou anaeróbios facultativos, crescendo melhor em anaerobiose, coagulase-positiva e que ocorrem tipicamente em agrupamento como cachos de uvas nos esfregaços corados. É o patógeno humano mais importante entre os estafilococos, sendo amplamente distribuídos na natureza e podem ser isolados de ambientes ou como habitantes comensais da pele, mucosas e outros sítios corpóreos dos seres humanos. Embora faça parte da microbiota humana normal, pode



produzir infecções oportunistas importantes em condições apropriadas. São responsáveis por impetigo, furúnculo, abscesso, osteomielite, artrite infecciosa e intoxicação alimentar (KONEMAN *et al.*, 2001).

### ■ *Bacillus subtilis*

São bacilos Gram-positivos, aeróbios ou anaeróbios facultativos que produzem endosporos. A maioria das espécies *Bacillus* isolada em laboratório clínico é contaminante saprófita ou integrante da microbiota humana normal. São encontrados habitando o solo, o ar e a água. Entretanto, nem todos os isolados são contaminantes ou saprófitas inofensivos. Uma variedade de espécies do gênero *Bacillus* causa infecções oportunistas graves, associadas à morbidade e mortalidade. Uma das espécies que ocasionalmente pode ter importância clínica e deve ser considerado patógeno oportunista é o *B. subtilis*. As infecções causadas abrangem septicemia, endocardite similar à gangrena gasosa por clostrídios, fasciite necrosante, broncopneumonia, pneumonia necrosante, meningite, peritonite, endoftalmite (KONEMAN *et al.*, 2001).

### ■ *Escherichia coli*

São bacilos Gram-negativos, aeróbios e anaeróbios facultativos pertencentes à família Enterobacteriaceae. É a espécie bacteriana mais comumente isolada em laboratórios clínicos. Encontram-se habitando o trato intestinal de seres humanos e outros animais. Estão envolvidos em septicemias por Gram-negativos, gastroenterites e em choque induzido por endotoxinas. As infecções do trato urinário e de feridas, a pneumonia em pacientes imunocomprometidos e as meningites em neonatos são outras formas comuns de infecção causadas por *E. coli* (KONEMAN *et al.*, 2001; RAVEL, 1997).

### ■ ***Klebsiella pneumoniae***

São bacilos Gram-negativos, aeróbios e anaeróbios facultativos pertencentes à família Enterobacteriaceae. Estão amplamente distribuídas na natureza e no trato gastrointestinal de seres humanos e outros animais. A espécie *K. pneumoniae* é responsável pela denominada pneumonia de Friedlander, uma pneumonia necrosante resistente que quase sempre forma cavidades e é tipicamente observada em alcoólatras e pacientes debilitados. Constitui também uma importante causa de infecções adquiridas em hospitais (KONEMAN *et al.*, 2001).

### ■ ***Enterobacter sp.***

São bacilos Gram-negativos, aeróbios e anaeróbios facultativos pertencentes à família Enterobacteriaceae. Encontram-se amplamente distribuídas nas águas, esgotos, solos e vegetais. Estão associadas a uma variedade de infecções oportunistas que afetam as vias urinárias e o trato respiratório, causam também septicemia e meningite (KONEMAN *et al.*, 2001).

### ■ ***Pseudomonas aeruginosa***

São bacilos Gram-negativos não fermentadores, estritamente aeróbios. São encontrados habitando o solo, a água não poluída e o intestino de animais. Entre as espécies de *Pseudomonas* a que está mais envolvida em doenças humanas é a *P. aeruginosa*. A infecção é especialmente prevalente em pacientes hospitalizados, em especial àqueles com graves doenças de

base, como o câncer, queimaduras, fibrose cística, leucemia aguda e transplante de órgãos; a alta mortalidade causada por estas infecções oportunistas, deve-se a uma combinação de fatores como as defesas enfraquecidas do hospedeiro, resistência bacteriana à maioria dos antibióticos e à produção de enzimas extracelulares e toxinas (HENRY, 1999; KONEMAN *et al.*, 2001).

### ■ *Salmonella sp*

São bacilos Gram-negativos, aeróbios e anaeróbios facultativos pertencentes à família Enterobacteriaceae. Não são hospedeiros normais do trato gastrointestinal e indicam sempre uma fonte de infecção do ambiente. As infecções humanas produzidas por este gênero em geral ocorrem por ingestão de alimentos, água ou leite contaminado por fezes humanas ou de animais (KONEMAN *et al.*, 2001; RAVEL, 1997).

### ■ *Mycobacterium smegmatis*

As micobactérias são bacilos aeróbios ligeiramente curvos ou retos, não móveis, álcool-ácido-resistentes. A superfície bacteriana das bactérias do gênero *Mycobacterium* é rica em ácidos micólicos (lipídios complexos, ramificados, com cadeias longas). Estes lipídios tornam a membrana das micobactérias pouco permeável aos corantes usuais e, além disso, conferem a propriedade de álcool-ácido-resistência. No entanto, o emprego do calor e de uma solução corante fenolada (fucsina de Ziehl), permite corar o protoplasma das referidas bactérias. As micobactérias apresentam-se como finos bacilos vermelhos, ligeiramente encurvados, que se destacam nitidamente do fundo azul da lâmina. O *M. smegmatis* é uma micobactéria saprófita e raramente patogênica associadas a infecções como doença pulmonar (HENRY, 1999; RAVEL, 1997).

## 4 - MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1- Material botânico

Alburno de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne, ou seja, parte lenhosa entre a casca e o cerne.

#### 4.1.2 - Coleta e identificação do material botânico

*Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne foi coletada na localidade de Cupins no município de Caxias, Maranhão e identificada pelo botânico Professor Gonçalo Mendes da Conceição da Universidade Estadual do Piauí (UESPI). Um exemplar (tora) foi gentilmente cedido para estudos ao Laboratório de Química de Produtos Naturais da UFPE.

### 4.2 - Abordagem fitoquímica

Com o alburno seco e pulverizado foram analisadas as principais classes de compostos presentes através da metodologia descrita por COSTA em 1982. Na Tabela 1 encontram-se os nomes dos testes que identificam algumas classes de compostos presentes na planta.

**TABELA 2** Testes que identificam as classes de compostos presentes na planta

Classes	Testes
Alcalóides	Dragendorff, Mayer
Esteróides e terpenos	Liebermann-Burchard
Taninos	Cloreto férrico
Saponinas	Espuma
Flavonóides	Shinoda

#### 4.2.1 - Alcalóides

A investigação da possível presença de alcalóides na planta foi feita por ensaios confirmativos específicos, que consistem em dissolver cerca de 1g grama da planta seca em 10mL de HCl ou H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 1%, em seguida aquecer a mistura em banho-maria a 100°C por 2 minutos, filtrando a solução, utilizando-se alíquotas do filtrado para determinação da presença de alcalóides conforme os testes descritos na Tabela 2:

**TABELA 2-** Testes para determinação de alcalóides.

Testes/reagentes	Confirmação
<b>Dragendorff</b>	Aparecimento de precipitado vermelho alaranjado
<b>Mayer</b>	Aparecimento de precipitado esbranquiçado

#### 4.2.2 - Esteróides e triterpenóides

Os esteróides e triterpenóides tiveram sua presença determinada pelo teste de Liebermann-Burchard, que consiste em tomar cerca de 1g da planta seca em tubo de ensaio e dissolver em 3mL de clorofórmio (CHCl<sub>3</sub>), filtra-se a solução, junta-se ao filtrado 2mL de anidrido acético e agita-se vagarosamente. Adicionar à solução obtida 5 gotas de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado (pela parede do tubo).

O aparecimento sucessivo de cores do róseo ao azul e verde caracterizará a presença de esteróides e triterpenóides.

#### **4.2.3 - Flavonóides.**

A presença de flavonóides foi determinada pelo teste de Shinoda. Mistura-se 1g de material triturado em 5mL de metanol (MeOH) permanecendo durante 5 min em repouso, após este período a mistura é filtrada e ao filtrado adicionado 1 mL de ácido clorídrico (HCl) concentrado. A solução é colocada em contato com uma fita de magnésio.

O aparecimento de coloração rosa caracteriza a presença de flavonóides.

#### **4.2.4 - Saponinas**

As saponinas foram avaliadas pelo teste de espuma, que consiste no tratamento de cerca de 1g da planta seca e triturada em 5mL de água destilada colocados em tubo de ensaio. Após agitação vigorosa por cerca de 5 minutos.

A formação de espuma persistente por 30 minutos evidencia a presença de saponinas.

#### **4.2.5 - Taninos**

Os taninos tiveram sua presença avaliada pelo método do cloreto férrico, onde, trata-se cerca 1g da planta com 10mL de água. Filtra-se, sendo o filtrado testado com solução de cloreto férrico a 1%.

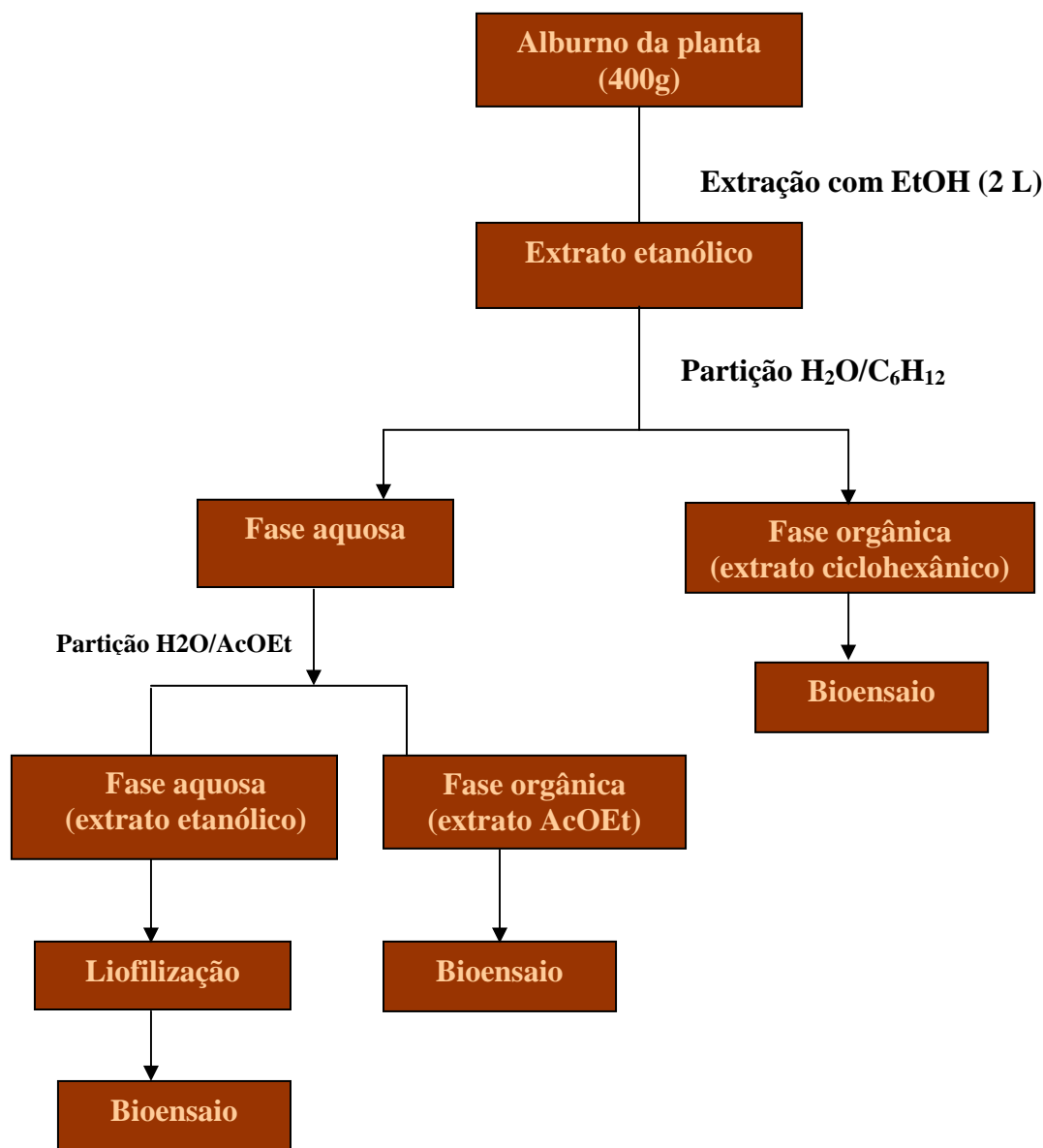
O surgimento de uma coloração ou precipitado verde ou azul indicará reação positiva para taninos.

### 4.3 - Obtenção dos extratos brutos

A preparação dos extratos brutos para posterior realização dos ensaios antimicrobianos e cromatográficos partiu da maceração de 400g do alburno de *Hymenaea stigonocarpa* seco e triturado em moinho.

Foi utilizado o solvente etanol (EtOH) por um período de total de dez dias, tendo sido realizadas três extrações neste período, cada uma delas com dois litros do solvente. Houve agitação manual a cada 24h. Após o período de maceração ocorreu a filtragem e redução do solvente em evaporador rotativo à pressão reduzida.

Ao extrato etanólico obtido foi adicionada água destilada e logo após ciclohexano ( $C_6H_{12}$ ) para realizar a partição, utilizando-se funil de separação, após a separação da porção ciclohexânica, foi realizada uma dissolução em acetato de etila (AcOEt). Os extratos foram concentrados em rota evaporador. O esquema para obtenção dos extratos brutos encontra-se na Figura 24.



**FIGURA 24** – Esquema da obtenção dos extratos brutos



## 4.4 - Atividade antimicrobiana

### 4.4.1 – Microrganismos testados

Os microrganismos (Tabela 3) usados para o teste de atividade antimicrobiana foram cedidos pelo Laboratório de Coleção de Culturas do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPEDA), pelo Setor de Bacteriologia do Laboratório Pronto Atendimento do Hospital São Marcus (PASM), Recife-PE e pelo Hospital Oswaldo Cruz da Universidade de Pernambuco (HUOC).

**TABELA 3** - Microrganismos utilizados na avaliação antimicrobiana dos extratos brutos.

<b>Microrganismos / Bactérias</b>	<b>Registros</b>
<b>Gram-positivas</b>	
<i>Staphylococcus aureus</i>	UFPEDA 02 / PASM 18260 / SA18 / SA60 / SA69 / SA28
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	HUOC 804
<i>Streptococcus <math>\beta</math>-hemolítico C</i>	HUOC 802
<i>Bacillus subtilis</i>	UFPEDA 16
<b>Gram-negativas</b>	
<i>Escherichia coli</i>	UFPEDA 224/ HUOC 873 / HUOC 778
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	PASM 18252/
<i>Enterobacter cloacae</i>	ATCC 15012
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PASM 18224 / ATCC 27853 / HUOC 820 / ST931 / LP941
<i>Salmonella enteritidis</i>	UFPEDA 414
<b>Álcool-ácido- resistentes</b>	
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	UFPEDA 71

Os meios de cultura utilizados para manutenção dos microrganismos foram: ágar nutriente (AN) para as bactérias Gram-positivas e Gram-

negativas e ágar glicose/extrato de levedura (GL) para a bactéria álcool-ácido-resistente todos foram conservados a temperatura de 4°C.

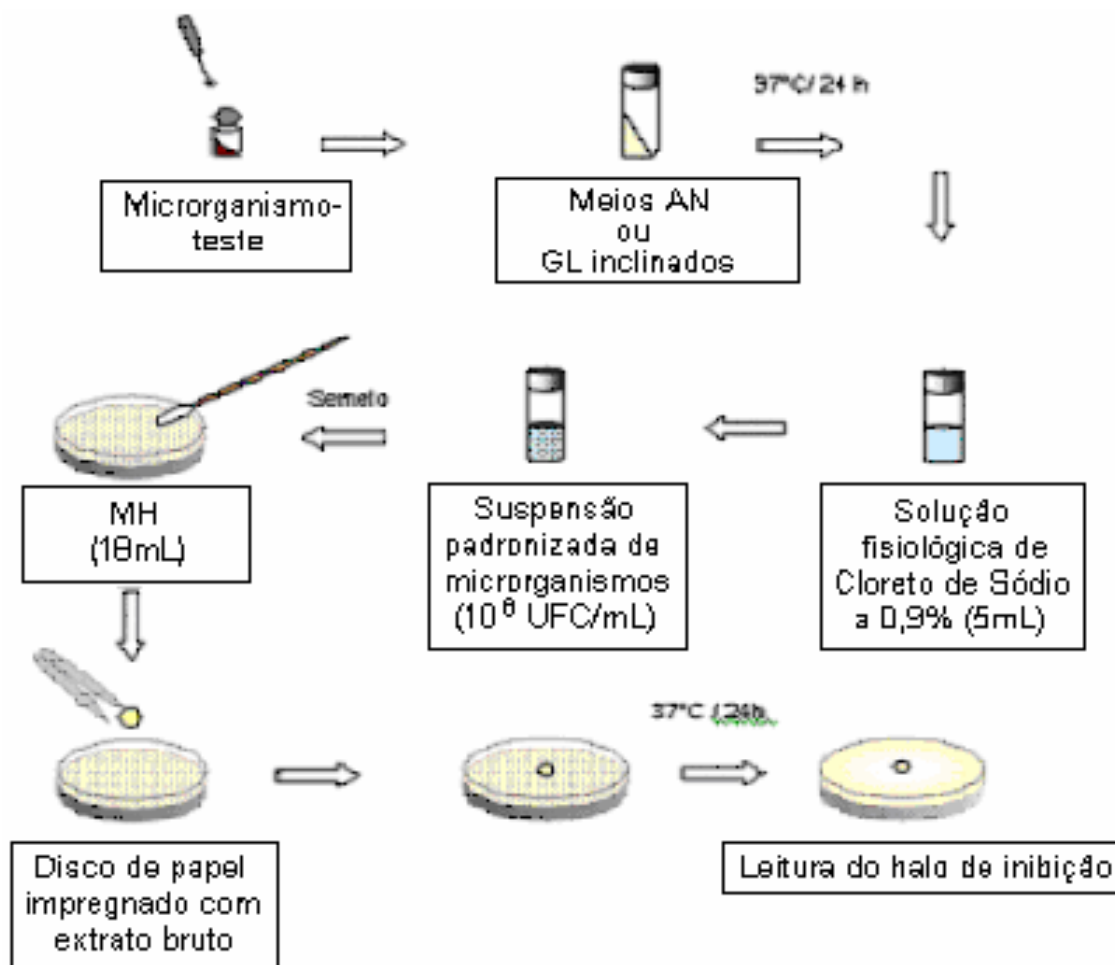
#### **4.4.2 - Método de difusão em disco de papel**

No método de difusão em disco de papel (BAUER *et al.*, 1966) as amostras de cada extrato bruto foram solubilizadas em dimetilsulfóxido (DMSO) para obtenção de soluções com concentrações de 64mg/mL, 100mg/mL, 200mg/mL e 300mg/mL.

De cada microrganismo-teste foi obtido um inóculo com 24 horas de crescimento nos meios ágar nutritivo (AN) para as bactérias Gram-positivas e negativas e ágar glicose/extrato de levedura (GL) para a bactéria álcool-ácido-resistente. Após este período, foi preparada uma suspensão de células, de cada microrganismo, em cloreto de sódio (NaCl 0,9%) ou água destilada esterilizada e transferido material suficiente para atingir uma turbidez equivalente ao tubo 0,5 da escala de McFarland (aproximadamente  $10^8$  UFC/mL) (KONEMAN, 1997). E transferidas para placas de Petri (90 mm) contendo o meio ágar Müller-Hinton (MH) e depositados os discos de papel (6 mm), estéreis, impregnados com 20 µL das soluções dos extratos brutos por disco de papel, em seguida incubadas a 37°C durante 24h (GROVE & RANDAL, 1955; BAUER *et al.*, 1966)

Os experimentos foram realizados em duplicata e o resultado final corresponde à média aritmética dos halos de inibição, expressa em milímetros.

Para o controle negativo (branco) foram utilizados discos de papel embebidos com dimetilsulfóxido (DMSO). A Figura 25 apresenta o desenho esquemático do teste de atividade antimicrobiana pelo método de difusão em disco de papel.



**FIGURA 25** - Esquema do teste de atividade antimicrobiana por difusão em disco

#### 4.4.3 - Concentração inibitória mínima (CIM)

A menor concentração de um agente antimicrobiano que impede crescimento visível de um microorganismo no teste de sensibilidade por diluição em ágar ou caldo

A determinação da CIM foi realizada baseada nas normas NCCLS/CLSI (2000) com algumas modificações

A partir de uma solução-mãe da substância, de concentração igual a 1280 mg/mL, foram realizadas diluições sucessivas de 128mg/mL, 64mg/mL, 32 mg/mL e 16 mg/mL em caldo Mueller-Hinton. Em seguida, foi adicionada 25µL da suspensão do microrganismo. O experimento foi realizado em microplacas (96 poços) contendo 200 µL de volume final.

Para o controle positivo foi utilizado um testemunho (T), contendo apenas o meio de cultura e a suspensão do microrganismo, para comparação do crescimento microbiano. Para o controle negativo do solvente, foi inserido ao meio de cultura, o solvente DMSO e a suspensão do microrganismo.

As microplacas foram incubadas a uma temperatura de 37°C e os resultados foram avaliados após 24 horas. E após este período dos poços onde não apresentaram crescimento visível a olho nu, foram transferidos 25µl da suspensão para placas de Petri contendo meio de cultura ágar Müller Hinton e incubados a temperatura de 37°C. Os resultados foram avaliados após 24 horas.

#### **4.5 - Métodos cromatográficos**

O fracionamento do extrato ciclohexano foi realizado por cromatografia em coluna clássica. Foram utilizadas colunas de vidro com comprimentos e diâmetros variados, tendo-se como suporte sílica gel 60 Merck® (partículas 0,063 - 0,200 mm).

As frações obtidas na cromatografia em coluna foram submetidas à cromatografia em camada delgada (CDC) para verificação da pureza. Utilizaram-se placas prontas de polietileno POLYGRAM SIL G/UV<sub>254</sub>. As placas de CDC foram reveladas sob radiação ultravioleta com comprimento de onda de 254 nm e com vapores de iodo (I<sub>2</sub>).

#### **4.6 - Fracionamento do extrato ciclohexano de *Hymenaea stigonocarpa***

O fracionamento cromatográfico do extrato ciclohexano (700 mg) em coluna de sílica gel 60 foi realizado usando-se tolueno e acetato de etila no seguinte gradiente de polaridade:

- Tolueno 100%
- Tolueno / acetato de etila (95: 5)
- Tolueno / acetato de etila (90:10)
- Tolueno / acetato de etila (80:20)
- Tolueno / acetato de etila (50:50)
- Acetato de etila 100%

#### **4.7 - Métodos espectroscópicos**

O extrato bruto em ciclohexano e as frações foram analisados por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (GC - MS). Através de um sistema de injeção, foram introduzidos em uma coluna contendo a fase estacionária.

O equipamento utilizado foi um modelo SHIMADZU QP5050, empregou-se uma coluna DB-5 de 30 m de comprimento com 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura do filme. Utilizou-se o gás hélio, a temperatura da coluna foi entre 60°C e 280°C e o solvente empregado foi diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

## 5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1- Abordagem fitoquímica

A abordagem fitoquímica do alburno de *Hymenaea stigonocarpa* revelou a presença de flavonóides, esteróides e terpenóides. Não foi detectada a presença de saponinas, alcalóides ou taninos no alburno desta planta (Tabela 4).

**TABELA 4:** Resultado da abordagem fitoquímica do alburno de *Hymenaea stigonocarpa*

Classes de compostos	Testes	Resultados
Alcalóides	Dragendorff, Mayer	Negativo
Esteróides e terpenóides	Liebermann-Burchard	<b>Positivo</b>
Taninos	Cloreto férrico	Negativo
Saponinas	Espuma	Negativo
Flavonóides	Shinoda	<b>Positivo</b>

Estes resultados corroboraram com os obtidos em outras espécies de *Hymenaea* estudadas e citadas na literatura, pois, nestes estudos, verifica-se que predominam entre as classes de compostos isoladas os terpenóides e flavonóides. Imamura e colaboradores em 2001 isolaram das sementes de *Hymenaea courbaril* terpenos e Abdel-Kader *et al.* em 2002 isolaram das folhas, galhos e tronco dessa mesma espécie terpenos. Pettit *et al.* em 2002 isolaram flavonóides das folhas de *Hymenaea palustris*. E das folhas de *Hymenaea stigonocarpa* também foram isolados terpenos (LANGENHEIM *et al.*, 1986).

Os terpenóides constituem uma das mais diversificadas classes de compostos químicos caracterizadas em todas as plantas e são responsáveis

por uma grande diversidade de estruturas proporcionando um enorme potencial para as interações fisiológicas e ecológicas das plantas (SIQUEIRA *et al.*, 2003).

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

Partindo-se de 400g do alburno da planta obtiveram-se os seguintes rendimentos expressos em percentagem (Tabela 5):

**TABELA 5:** Rendimento dos extratos brutos de *Hymenaea stigonocarpa*

Extrato bruto	Peso	Rendimento
Ciclohexano	1,1g	0,275%
Acetato de etila	6,8g	1,7%
Etanol	7,4g	1,85%

### 5.3 - Atividade antimicrobiana por difusão em disco de papel

Os ensaios antimicrobianos foram realizados utilizando-se bactérias mantidas em Coleção de culturas (Tabela 6) e bactérias provenientes de isolados clínicos (Tabelas 7 e 8), as quais tendem a apresentar resistência aos antimicrobianos comumente empregados em clínica.

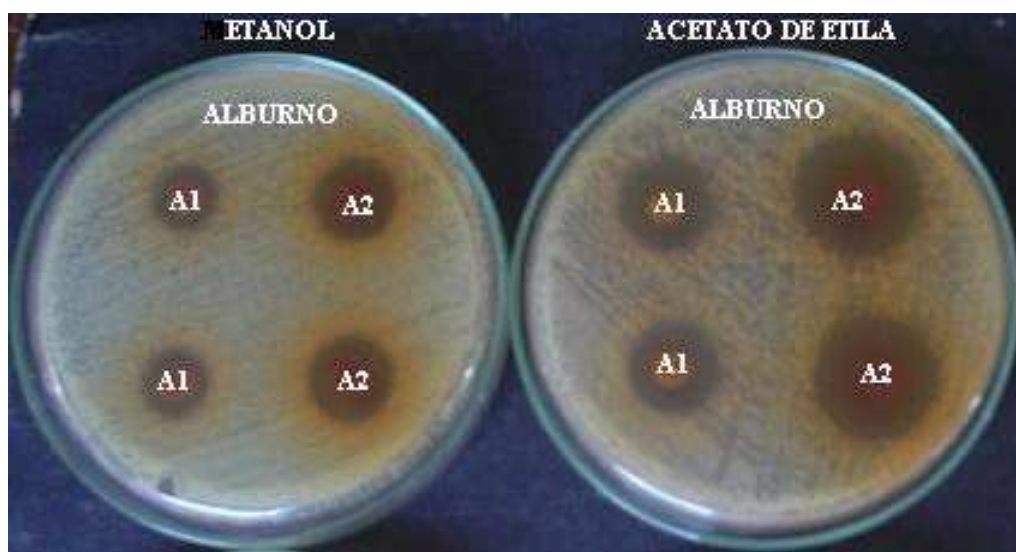
**TABELA 6** - Resultados da atividade antimicrobiana dos extratos brutos de *Hymenaea stigonocarpa* frente aos microrganismos mantidos em Coleção de Cultura (UFPEA).

Bactérias	Concentrações (mg/mL)						
	64			100		300	
	E	A	C	E	A	E	A
<i>Staphylococcus aureus</i>	10	14	10	13	20	16	27
<i>Bacillus subtilis</i>	-	10	-	16	16	20	22
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	10	12	17
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8	-	9	NT	NT	NT	NT
<i>Salmonella enteritidis</i>	-	11	9	NT	NT	NT	NT
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	12	9	NT	NT	NT	NT

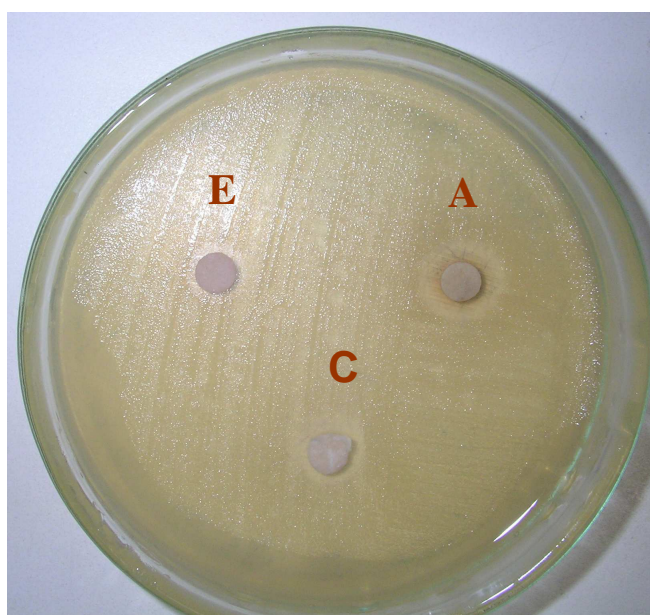
\*E=extrato em Etanol; A= extrato em Acetato de etila; C=extrato em Ciclohexano, NT= não testado, (-)= ausência de inibição; resultado obtido pela média dos halos inibição em mm.

Dentre as bactérias testadas, a Gram-positiva *Staphylococcus aureus* foi a mais sensível, apresentando o maior halo de inibição, 27mm na concentração de 300mg/mL (Figura 26) e 14mm na concentração de 64mg/mL (Figura 27), do extrato em acetato de etila. A bactéria Gram-negativa *Klebsiella pneumoniae* foi resistente aos extratos em todas as concentrações testadas. Na concentração de 64mg/mL houve inibição do crescimento das bactérias Gram-negativas *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, pelos extratos ciclohexano e acetato de etila, apresentando modestos halos (9mm a 11mm).





**FIGURA 26** - Halos de inibição dos extratos brutos em EtOH e AcOEt ( $A_1$ = 100 mg/mL /  $A_2$ = 300 mg/mL) de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne frente ao microrganismo *Staphylococcus aureus* da coleção de cultura (UFPEDA).



**FIGURA 27**—Halos de inibição formado pelos extratos brutos Etanol (E), Acetato de etila (A) e Ciclohexano(C), na concentração de 64mg/mL frente ao microrganismo *Staphylococcus aureus* (UFPEDA).

### 5.3.1 Atividade antimicrobiana frente a isolados clínicos

Ensaio antimicrobianos preliminares foram realizados com os extratos AcOEt e EtOH, em concentrações de 200 e 300mg/mL, frente a microrganismos patogênicos isolados do Laboratório Pronto Atendimento São Marcos (PASM), e os resultados estão expressos na Tabela 7.

Das bactérias Gram-negativas testadas, a *Pseudomonas aeruginosa* foi sensível apresentando halo de inibição variando de 13 a 16 mm nos extratos brutos. Essa inibição é importante devido a várias cepas de *P. aeruginosa* mostrarem-se resistentes a muitos antibióticos e frequentemente provocarem infecções hospitalares (SILVA, 1999).

**TABELA 7**-Resultado da atividade antimicrobiana dos extratos brutos em AcOEt e EtOH do alburno frente a isolados clínicos (PASM).

Microrganismos	AcOEt		EtOH	
	200mg/mL	300 mg/mL	200mg/mL	300mg/mL
<i>Staphylococcus aureus</i>	13	14	11	13
<i>Escherichia coli</i>	9	12	9	9
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13	13	13	16

Novos ensaios foram realizados com intuito de diminuir a concentração dos extratos, bem como de avaliar a conservação dos mesmos.

Várias linhagens de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas isoladas de pacientes, provenientes de diferentes *loci*, do Hospital Universitário Oswaldo Cruz foram cedidas para a nova avaliação. A Tabela 8 exibe os resultados encontrados, dados pela média entre as diferentes cepas testadas. No Anexo 2 encontra-se uma listagem com os perfis de suscetibilidade de microrganismos aos antibióticos.

**TABELA 8** - Resultado da atividade antimicrobiana dos extratos brutos em EtOH, AcOEt e C<sub>6</sub>H<sub>12</sub> do alburno frente a isolados clínicos, a uma concentração 64mg/mL (HUOC).

Cepas*	EtOH	AcOEt	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub>
<i>Escherichia coli</i>	9	9	9
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9	9	-
<i>Streptococcus β-hemolítico</i> tipo C	-	15	9
<i>Staphylococcus aureus</i>	12	14	9
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	12	-

\*Isolados clínicos provenientes de vários *loci*.

#### 5.4 - Atividade antimicrobiana em meio líquido

O microrganismo testado na avaliação da atividade antimicrobiana em meio líquido foi a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus*.

Os resultados da concentração inibitória mínima (CMI) dos extratos C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>, AcOEt e EtOH, respectivamente, estão descritos na Tabela 9 e a sua comprovação pode ser observada nas Figuras 28, 29 e 30, onde há nas placas de Petri, contendo meio de cultura MH, mostrando a reprodução do crescimento bacteriano onde os extratos testados não foram ativos.

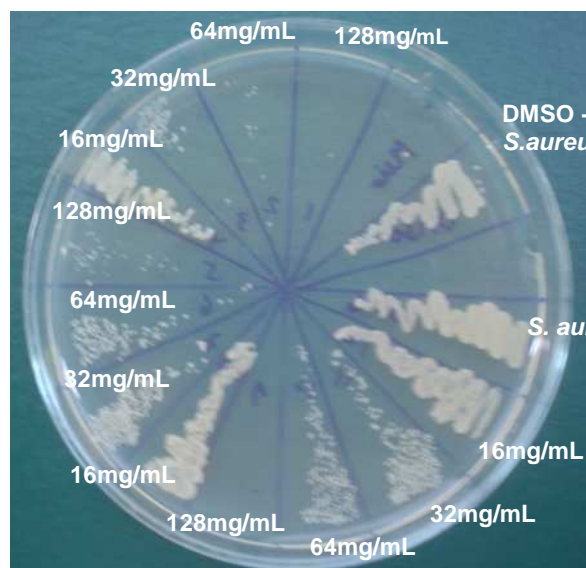
Os extratos brutos do alburno *Hymenaea stigonocarpa* testados foram ativos em meio líquido, sendo o extrato em acetato de etila o que apresentou a menor concentração capaz de inibir o crescimento bacteriano, apresentando-se ativo a uma concentração de 32mg/mL frente ao *Staphylococcus aureus*(UFPEA).

O extrato etanólico apresentou-se ativo na concentração de 64mg/mL enquanto o extrato em ciclohexano em concentração de 128mg/mL.

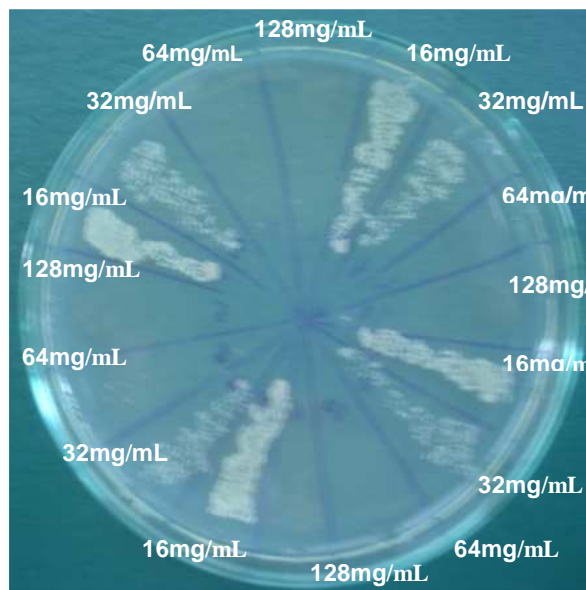
**TABELA 9** – Resultados da atividade antimicrobiana em meio líquido.

Extratos	Concentrações em mg/mL			
	128	64	32	16
<b>EtOH</b>	S	S	R	R
<b>AcOEt</b>	S	S	S	R
<b>C<sub>6</sub>H<sub>12</sub></b>	S	R	R	R

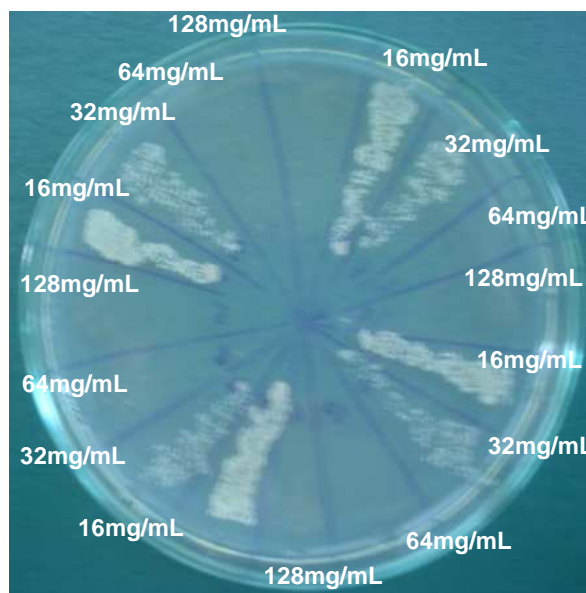
R= resistente; S= sensível.



**FIGURA 28** - Placa mostrando a inibição de *S. aureus* pelo extrato ciclohexânico a uma concentração de 128mg/mL e resistência nas concentrações 64mg/mL, 32mg/mL e 16mg/mL. Teste em triplicata e com controles positivo e negativo.



**FIGURA 29** - Placa mostrando a inibição de *S. aureus* pelo extrato de acetato de etila nas concentrações de 128mg/mL, 64mg/mL, e 32mg/mL resistência do microrganismo ao extrato a 16mg/mL. Teste em quadruplicata.



**FIGURA 30** - Placa mostrando a inibição de *S. aureus* pelo extrato etanólico nas concentrações de 128mg/mL e 64 mg/mL e resistência do microrganismo ao extrato a 16mg/mL e 32mg/mL. Teste em quadruplicata.

Esses resultados demonstram uma maior eficácia do teste de microdiluição dos extratos etanólico, ciclohexano e acetato de etila de *Hymenaea stigonocarpa*, onde a concentração necessária para a inibição do crescimento bacteriano foi significativamente menor em meio líquido do que no teste de difusão em meio sólido.

Os ensaios biológicos foram repetidos num intervalo de tempo de mais de um ano. Constatou-se assim que os resultados iniciais não diferiram dos encontrados após esse intervalo, demonstrando que mesmo sem nenhuma condição especial de armazenamento, os extratos não foram degradados.

Poucos exemplos de atividade biológica dos extratos de *Hymenaea* têm sido descritos (NOVAIS *et al.*, 2003).

Em 2000, Alves *et al.* estudaram plantas da família Leguminosae – Caesalpinoideae, onde os extratos de *Bauhinia curvula* Benth e *Hymenaea courbaril* L. demonstraram atividade inibidora sobre espécies de *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*, bem como extratos de *Copaifera langsdorffii* Desf. sobre espécies de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

## 5.5 Identificação dos compostos

### 5.5.1 - Identificação dos compostos presentes no extrato bruto ciclohexânico

Foram identificados, por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG-MS), 5 compostos provenientes do extrato ciclohexânico. O cromatograma desse extrato (Figura 31) apresentou 14 picos relevantes. A Tabela 10 contém os seus respectivos tempos de retenção e intensidade relativa.

Os compostos identificados foram nomeados com a sigla AHS; e numerados em ordem crescente de acordo com o tempo de retenção. Foram eles:

- **AHS<sub>1</sub>** (N-N-dietil-decanamida)
- **AHS<sub>2</sub>** (Hexadecanoato de metila)
- **AHS<sub>3</sub>** (Ácido hexadecanóico)
- **AHS<sub>4</sub>** (Ácido 9-octadecenóico)
- **AHS<sub>5</sub>** (Ácido octadenóico)

### 5.5.2 - Identificação dos compostos presentes no fracionamento do extrato ciclohexânico

A partir do fracionamento cromatográfico em coluna clássica foram obtidas 40 frações que foram analisadas por CDC e reunidas de acordo com seus Rf's.

As 5 frações principais, chamadas de F1, F2, F3, F4, F5, revelaram a presença de: uma série de olefinas (1-Tetradeceno, 1-Hexadecene, 1-nonadecece )e um álcool (1-Icosanol)em F1; amidas alifáticas (N-N- dietil-decanamida e amida) em F2; (mistura de amidas alifáticas e palmitato de metila) em F3, (mistura de ácidos palmítico e oléico) em F4 e uma série de compostos com picos característicos de triterpenos pentacíclicos com pico base em m/z 218 em F5.



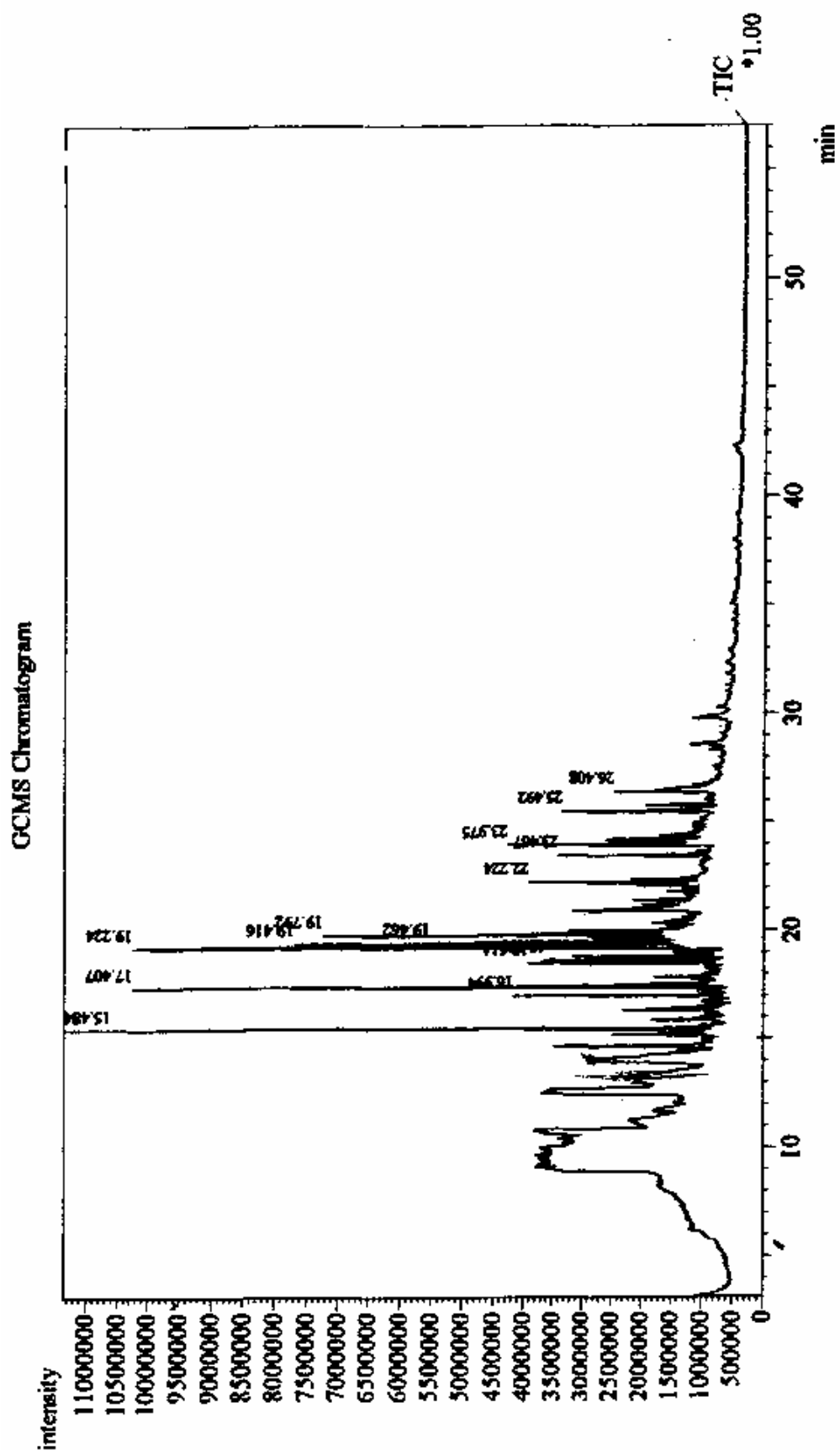


FIGURA 31 - Cromatograma do extrato ciclohexânico.

**TABELA 10**– Características dos principais picos presentes no cromatograma .

<b>Picos</b>	<b>Tempo de retenção (min)</b>	<b>% Total na amostra</b>
<b>1</b>	<b>15,484</b>	<b>15,14</b>
<b>2</b>	<b>16,994</b>	<b>3,28</b>
<b>3</b>	<b>17,407</b>	<b>11,44</b>
4	18,514	5,29
5	18,633	3,09
<b>6</b>	<b>19,224</b>	<b>23,52</b>
<b>7</b>	<b>19,416</b>	<b>7,06</b>
8	19,462	3,86
9	19,792	9,85
10	22,224	2,69
11	23,467	2,30
12	23,975	5,44
13	25,492	4,91
14	26,408	2,13

O primeiro passo para a identificação dos compostos foi a consulta ao banco de dados das bibliotecas WILEY e NIST, as quais revelaram haver uma predominância de ácidos e ésteres de cadeia longa e amidas alifáticas como prováveis compostos presentes nas amostras.

Em seguida houve consulta à literatura sobre as fragmentações características de cada classe química, para a elucidação estrutural dos compostos.

### 5.5.3 – Identificação do composto AHS<sub>1</sub>

O espectro de massas e a estrutura do composto AHS<sub>1</sub> encontram-se na Figura 32. Os fragmentos mais importantes para elucidação estrutural deste composto, além de suas massas e intensidades relativas estão descritos na Tabela 10.

Esses fragmentos e suas respectivas massas correspondem aos valores descritos para a N-N-dietildecanamida que é uma amida alifática de cadeia longa, presente na biblioteca de espectros WILEY 229 cuja fórmula molecular é C<sub>14</sub>H<sub>29</sub>NO.

Os principais fragmentos observados no espectro de massas do composto AHS<sub>1</sub> estão representados na Figura 33.

O pico do íon molecular do composto AHS<sub>1</sub> apresenta-se em  $m/z$  227 e o pico base em  $m/z$  115.

Os picos em  $m/z$  128, 142, 156, 170, 184, 198 formam uma sequência de fragmentação caracterizada por aglomerados de picos afastados uns dos outros por 14 unidades de massa, correspondentes a perdas sucessivas de unidades CH<sub>2</sub> (CREWS, RODRÍGUEZ, JASPARS, 1998).

O pico base em  $m/z$  115 é característico de amidas terciárias e ocorre por rearranjos de íons (GILPIN, 1959).

O pico em  $m/z$  100 é gerado por uma clivagem  $\alpha$  a carbonila com retenção de carga pelo fragmento que contém o oxigênio. O pico em  $m/z$  57 é representado pelo fragmento alquila [C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>]<sup>+</sup>

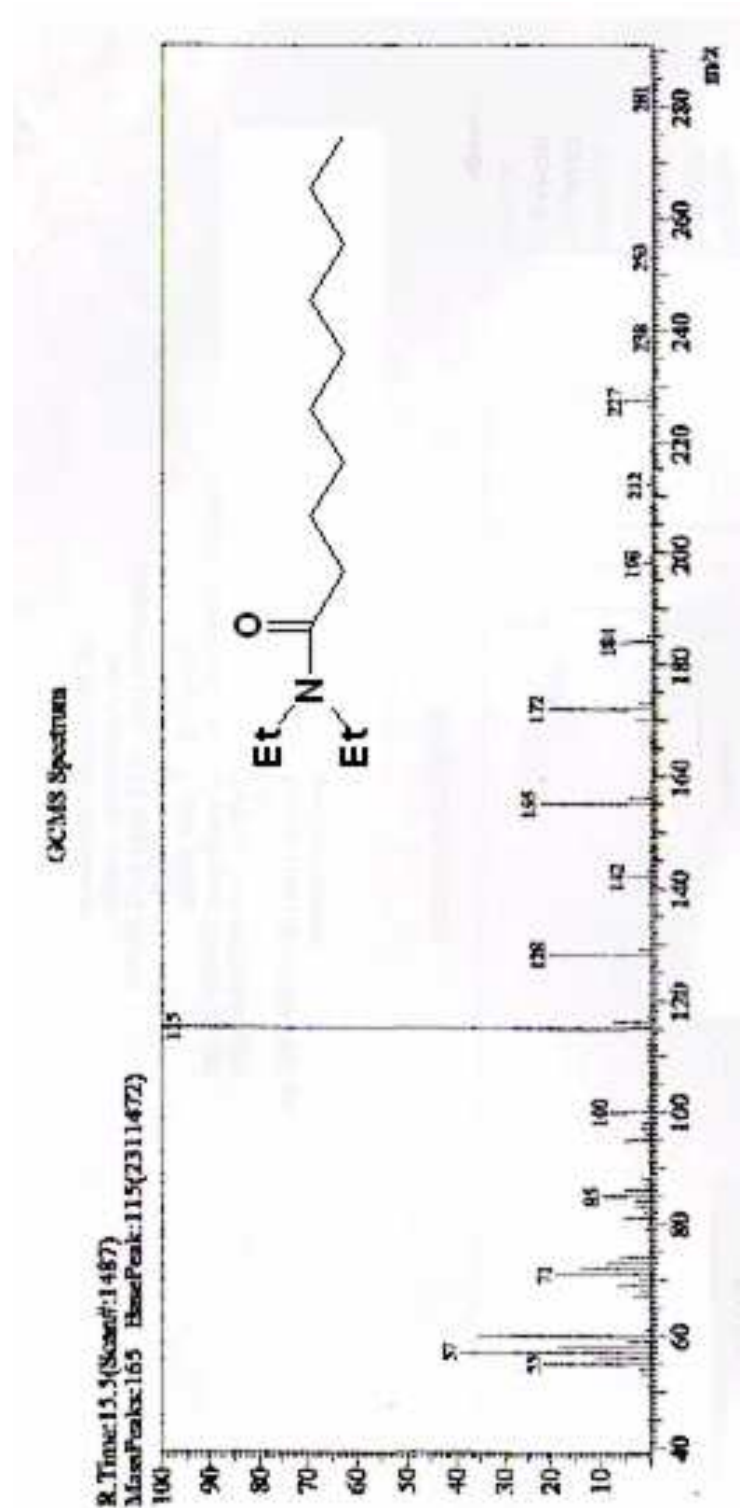
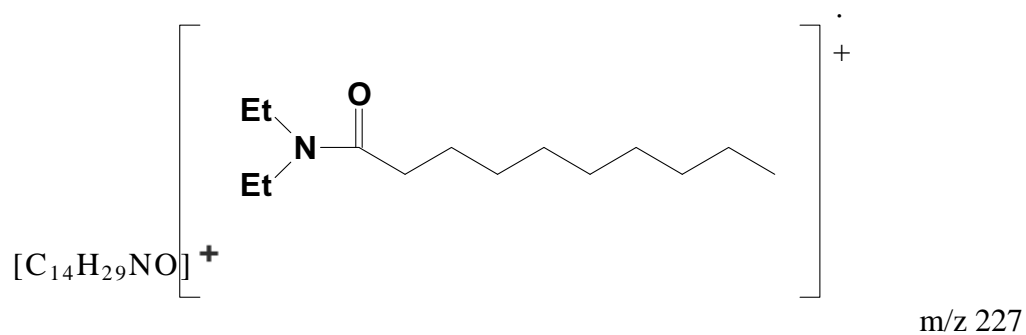


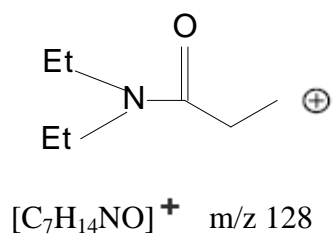
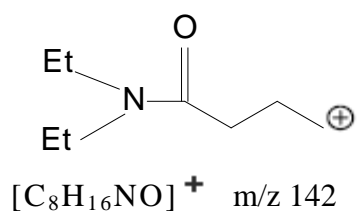
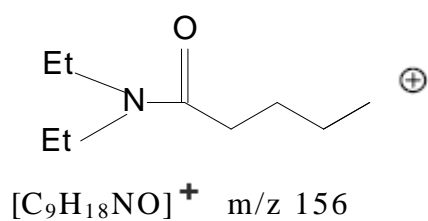
FIGURA 32 – Espectro de massas e estrutura do composto AHS<sub>1</sub>.

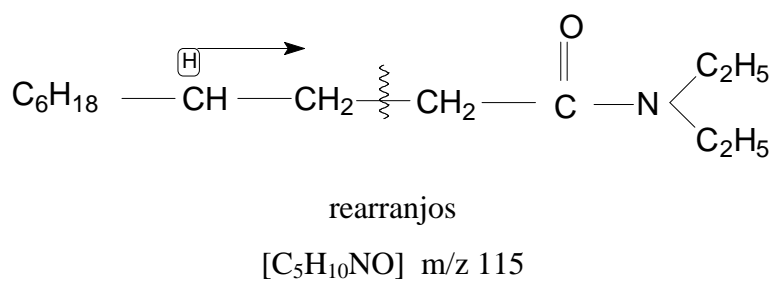
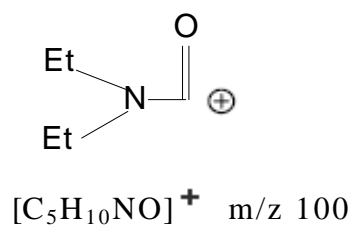
**TABELA 10** - Principais fragmentos presentes no espectro de massas do composto AHS<sub>1</sub>.

<b>m/z</b>	<b>Fragmento</b>	<b>Intensidade relativa(%)</b>
227	$[\text{C}_{14}\text{H}_{29}\text{NO}]^+$	<b>5,04</b>
212	$[\text{C}_{13}\text{H}_{26}\text{NO}]^+$	<b>1,38</b>
198	$[\text{C}_{12}\text{H}_{24}\text{NO}]^+$	<b>1,52</b>
184	$[\text{C}_{11}\text{H}_{22}\text{NO}]^+$	<b>7,50</b>
170	$[\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{NO}]^+$	<b>2,98</b>
156	$[\text{C}_9\text{H}_{18}\text{NO}]^+$	<b>4,63</b>
142	$[\text{C}_8\text{H}_{16}\text{NO}]^+$	<b>4,73</b>
128	$[\text{C}_7\text{H}_{14}\text{NO}]^+$	<b>20,33</b>
115	$[\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}]^+$	<b>100</b>
100	$[\text{C}_5\text{H}_{10}\text{NO}]^+$	<b>8,02</b>
85	$[\text{C}_4\text{H}_7\text{NO}]^+$	<b>9,68</b>
72	$[\text{C}_4\text{H}_{10}\text{N}]^+$	<b>14,96</b>
58	$[\text{C}_3\text{H}_8\text{N}]^+$	<b>22,38</b>
57	$[\text{C}_4\text{H}_9]^+$	<b>40,26</b>



Fragmentação proposta para o composto AHS<sub>1</sub>: N-N—dietil-decanamida





**FIGURA 33** – Principais fragmentos do composto AHS<sub>1</sub>

#### 5.5.4– Identificação do composto AHS<sub>2</sub>

O espectro de massas e a estrutura do composto AHS<sub>2</sub> encontram-se na Figura 34. Os fragmentos mais importantes para elucidação estrutural deste composto, além de suas massas e intensidades relativas estão descritos na Tabela 11.

Estes fragmentos e suas respectivas massas correspondem aos valores descritos para o hexadecanoato de metila (palmitato de metila) cuja fórmula molecular é C<sub>17</sub>H<sub>34</sub>O<sub>2</sub> presente nas bibliotecas de espectros WILEY 229 e NIST.

Os principais fragmentos observados no espectro de massas do composto AHS<sub>2</sub> estão representados na Figura 35.

O pico do íon molecular do composto AHS<sub>2</sub> apresenta-se em  $m/z$  270. O pico mais característico é devido ao rearranjo de McLafferty (Figura 35), com quebra da ligação  $\beta$  em relação à carbonila originando um pico intenso em  $m/z$  74 (pico base). A quebra sucessiva das ligações C-C dá origem a íons alquila ( $m/z$  57, 71 e 85) e a íons contendo oxigênio, C<sub>n</sub>H<sub>2n-1</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup> ( $m/z$  87, 101, 115, 129, 143, 157, 171, 185, 199, 213 e 227). Aparecem, assim, aglomerados hidrocarbônicos em intervalos de 14 unidades de massa (CH<sub>2</sub>).

O pico em  $m/z$  239 resulta da perda do grupo metoxila (OCH<sub>3</sub>) e o pico em  $m/z$  59 é originado de uma clivagem  $\alpha$  à carbonila com a perda da cadeia alquila originando o íon [C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>. Os picos em  $m/z$  55, 69 e 83 originam-se de fragmentações hidrocarbônicas do tipo C<sub>n</sub>H<sub>2n-1</sub> com  $n = 4, 5$  e  $6$  respectivamente.

Verificou-se a veracidade deste resultado confrontando os dados espectrais do composto AHS<sub>2</sub> com os dados da literatura do hexadecanoato de metila.



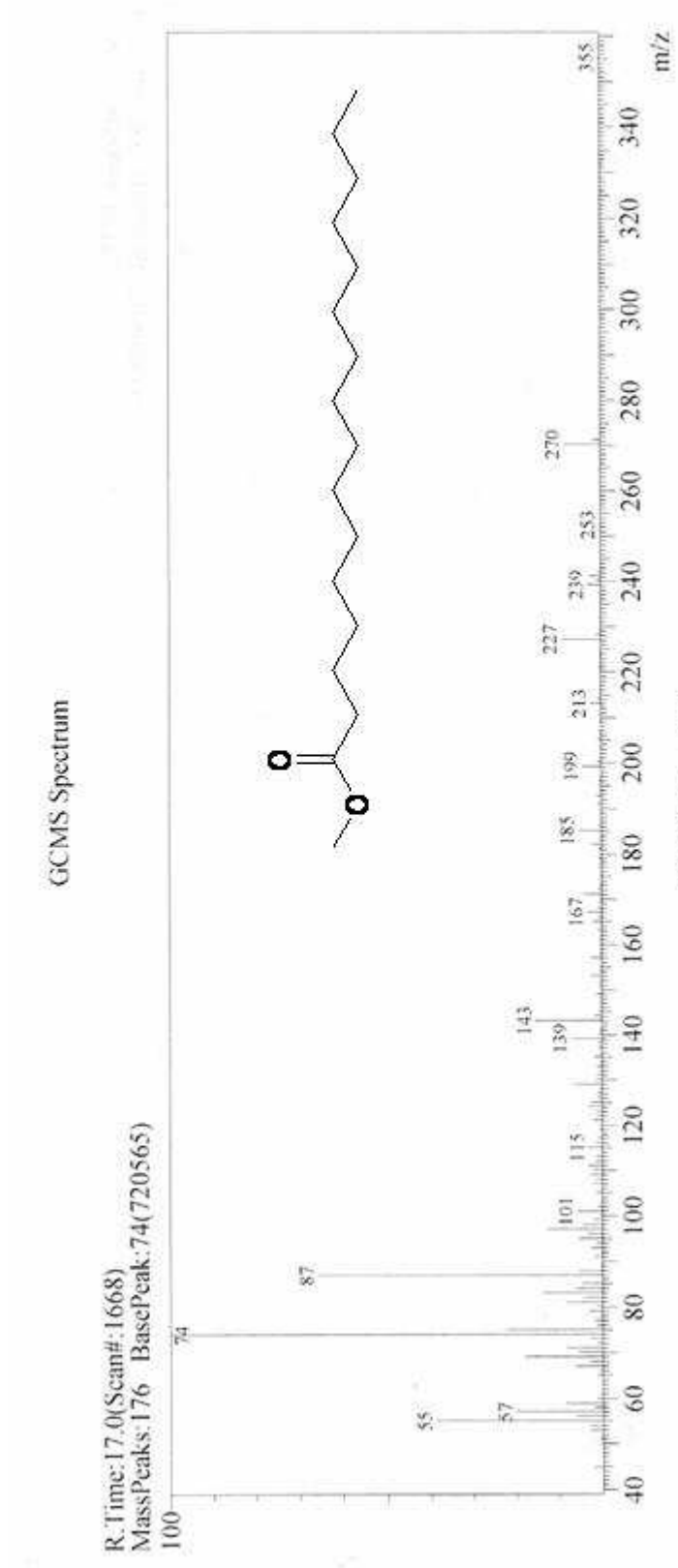
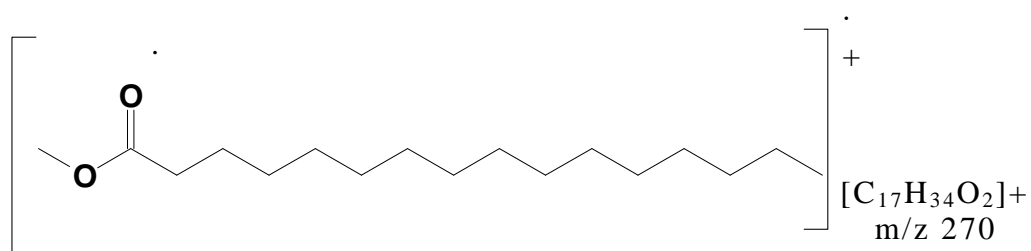


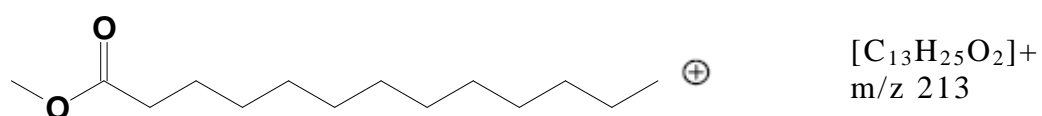
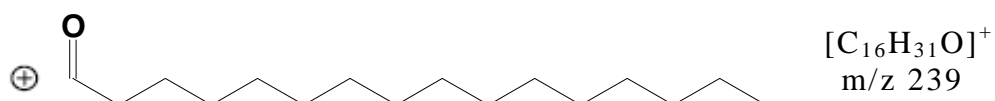
FIGURA 34 – Espectro de massas e estrutura do composto AHS<sub>2</sub>

**TABELA 11** - Principais fragmentos presentes no espectro de massas do composto AHS<sub>2</sub>.

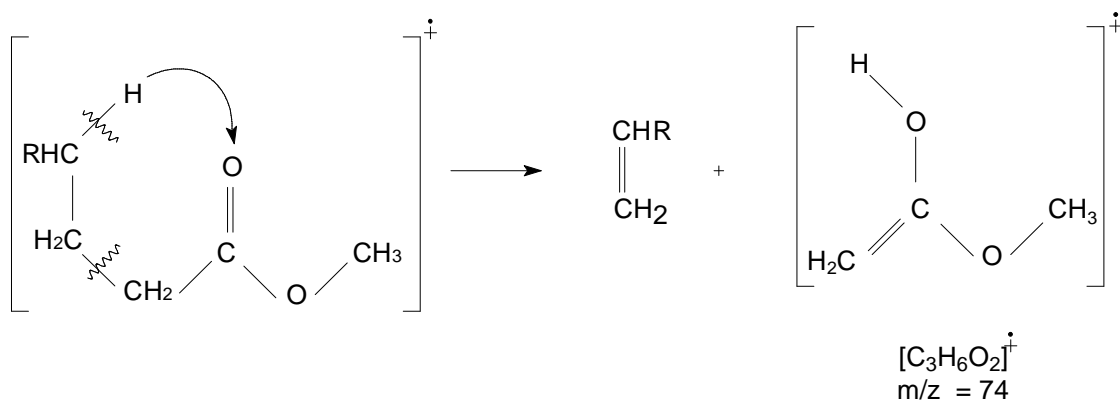
Massa	Fragmento	Intensidade relativa (%)
270	$[\text{C}_{17}\text{H}_{34}\text{O}_2]^+$	8,38
239	$[\text{C}_{16}\text{H}_{31}\text{O}]^+$	3,01
227	$[\text{C}_{14}\text{H}_{27}\text{O}_2]^+$	9,13
213	$[\text{C}_{13}\text{H}_{25}\text{O}_2]^+$	2,31
199	$[\text{C}_{12}\text{H}_{23}\text{O}_2]^+$	4,27
185	$[\text{C}_{11}\text{H}_{21}\text{O}_2]^+$	5,18
143	$[\text{C}_8\text{H}_{15}\text{O}_2]^+$	15,35
129	$[\text{C}_7\text{H}_{13}\text{O}_2]^+$	7,10
115	$[\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_2]^+$	3,12
101	$[\text{C}_5\text{H}_9\text{O}]^+$	5,83
83	$[\text{C}_6\text{H}_{11}]^+$	14,12
87	$[\text{C}_4\text{H}_7\text{O}_2]^+$	65,78
75	$[\text{C}_3\text{H}_7\text{O}_2]^+$	22,63
74	$[\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_2]^+$	<b>100</b>
57	$[\text{C}_4\text{H}_9]^+$	20,10
55	$[\text{C}_4\text{H}_7]^+$	38,8



Fragmentação proposta para o composto AHS<sub>2</sub>- Hexadecanoato de metila



Rearranjo de McLafferty:



**FIGURA 35** – Fragmentação do composto AHS<sub>2</sub>

### 5.5.5 - Identificação do composto AHS<sub>3</sub>

O espectro de massas e a estrutura do composto AHS<sub>3</sub> encontram-se na Figura 36. Os fragmentos mais importantes para elucidação estrutural deste composto, além de suas massas e intensidades relativas estão descritos na Tabela 12.

Esses fragmentos e suas respectivas massas correspondem aos valores descritos para o ácido hexadecanóico ou ácido palmítico, que é um ácido graxo de cadeia longa, presente na biblioteca de espectros WILEY 229 cuja fórmula molecular é C<sub>16</sub>H<sub>32</sub>O<sub>2</sub>.

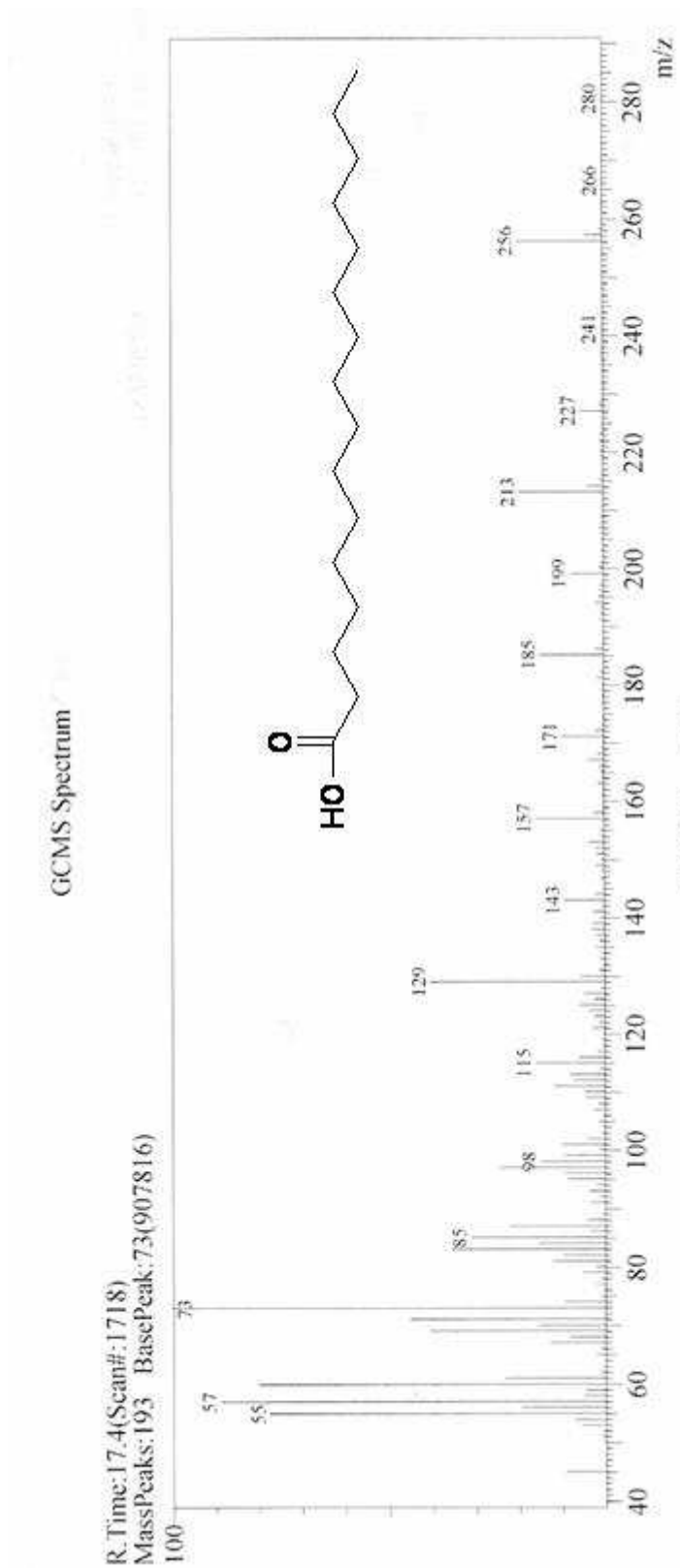
Os principais fragmentos observados no espectro de massas do composto AHS<sub>3</sub> estão representados na Figura 37.

O pico do íon molecular do composto AHS<sub>3</sub> apresenta-se em  $m/z$  256 e o pico base em  $m/z$  73.

Os picos em  $m/z$  87, 101, 115, 129, 143, 157, 171, 185, 199, 213 e 227 formam uma seqüência de fragmentação caracterizada por aglomerados de picos afastados uns dos outros por 14 unidades de massa, correspondentes a perdas sucessivas de unidades CH<sub>2</sub>.

O pico em  $m/z$  239 é de baixa intensidade e representa a perda de uma hidroxila (OH). O pico em  $m/z$  97 é originado da perda de uma molécula de H<sub>2</sub>O do fragmento em  $m/z$  = 115. O pico em  $m/z$  85 representa o fragmento alquila [C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>]<sup>+</sup>, o pico em  $m/z$  60 é devido ao rearranjo de McLafferty descrito na Figura 37. O pico em  $m/z$  57 é representado pelo fragmento alquila [C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>]<sup>+</sup> e os picos em  $m/z$  83, 69 e 55 originam-se de fragmentações hidrocarbônicas do tipo C<sub>n</sub>H<sub>2n-1</sub> com n = 6, 5 e 4 respectivamente. Uma clivagem  $\alpha$  à carbonila elimina a cadeia alquila originando o pico em  $m/z$  45.

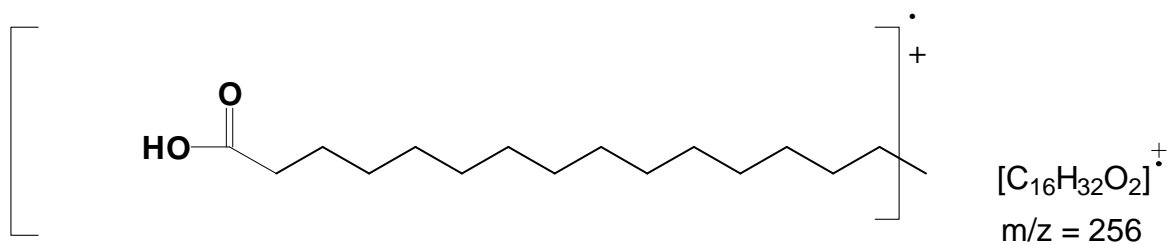
Verificou-se a veracidade deste resultado confrontando os dados espectrais do composto AHS<sub>1</sub> com os dados da literatura apresentados pelo ácido hexadecanóico.



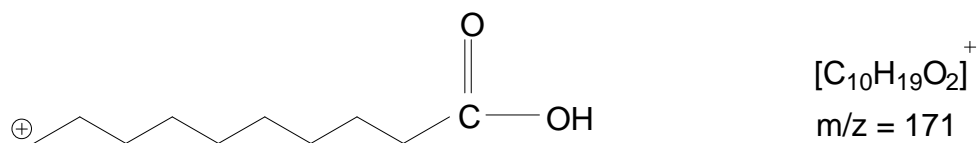
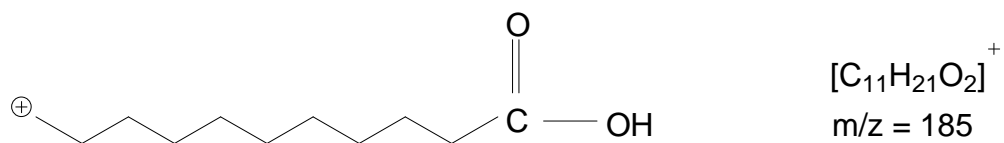
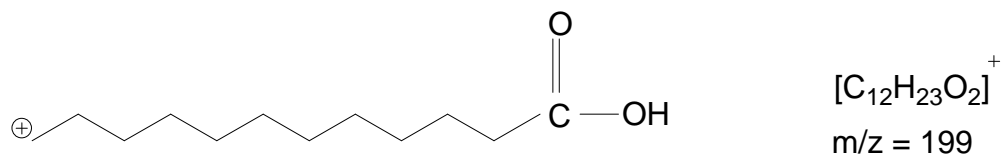
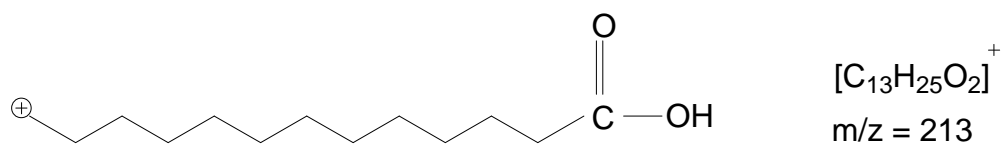
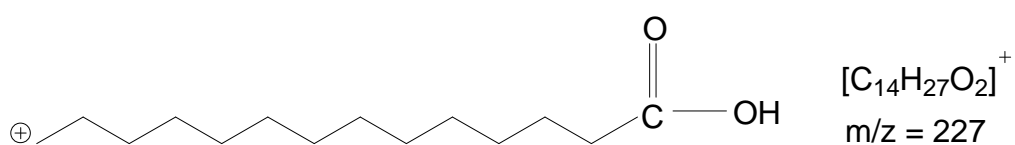
**FIGURA 36** – Espectro de massas e estrutura do composto  $\text{AHS}_3$

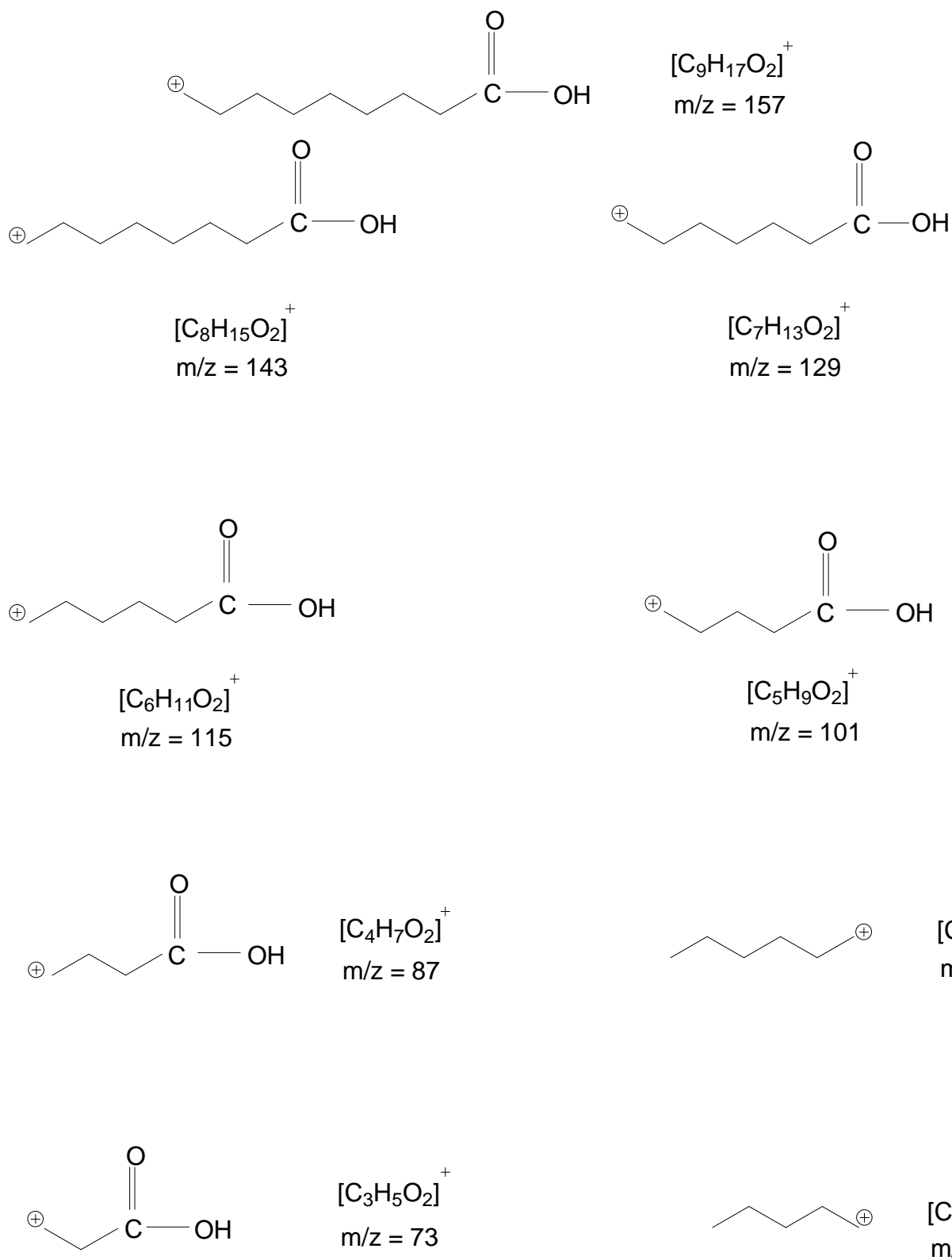
**TABELA 12** - Principais fragmentos presentes no espectro de massas do composto AHS<sub>3</sub>.

Massa	Fragmento	Intensidade relativa (%)
256	$[\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_2]^+$	16,90
227	$[\text{C}_{14}\text{H}_{27}\text{O}_2]^+$	4,87
213	$[\text{C}_{13}\text{H}_{25}\text{O}_2]^+$	19,18
199	$[\text{C}_{12}\text{H}_{23}\text{O}_2]^+$	7,48
185	$[\text{C}_{11}\text{H}_{21}\text{O}_2]^+$	14,73
171	$[\text{C}_{10}\text{H}_{19}\text{O}_2]^+$	9,78
157	$[\text{C}_9\text{H}_{17}\text{O}_2]^+$	15,76
143	$[\text{C}_8\text{H}_{15}\text{O}_2]^+$	9,18
129	$[\text{C}_7\text{H}_{13}\text{O}_2]^+$	40,37
115	$[\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_2]^+$	16,03
98	$[\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}]^+$	15,03
85	$[\text{C}_6\text{H}_{13}]^+$	31,26
73	$[\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_2]^+$	<b>100</b>
57	$[\text{C}_5\text{H}_9]^+$	88,95
55	$[\text{C}_4\text{H}_7]^+$	77,56
45	$[\text{CHO}_2]^+$	9,30



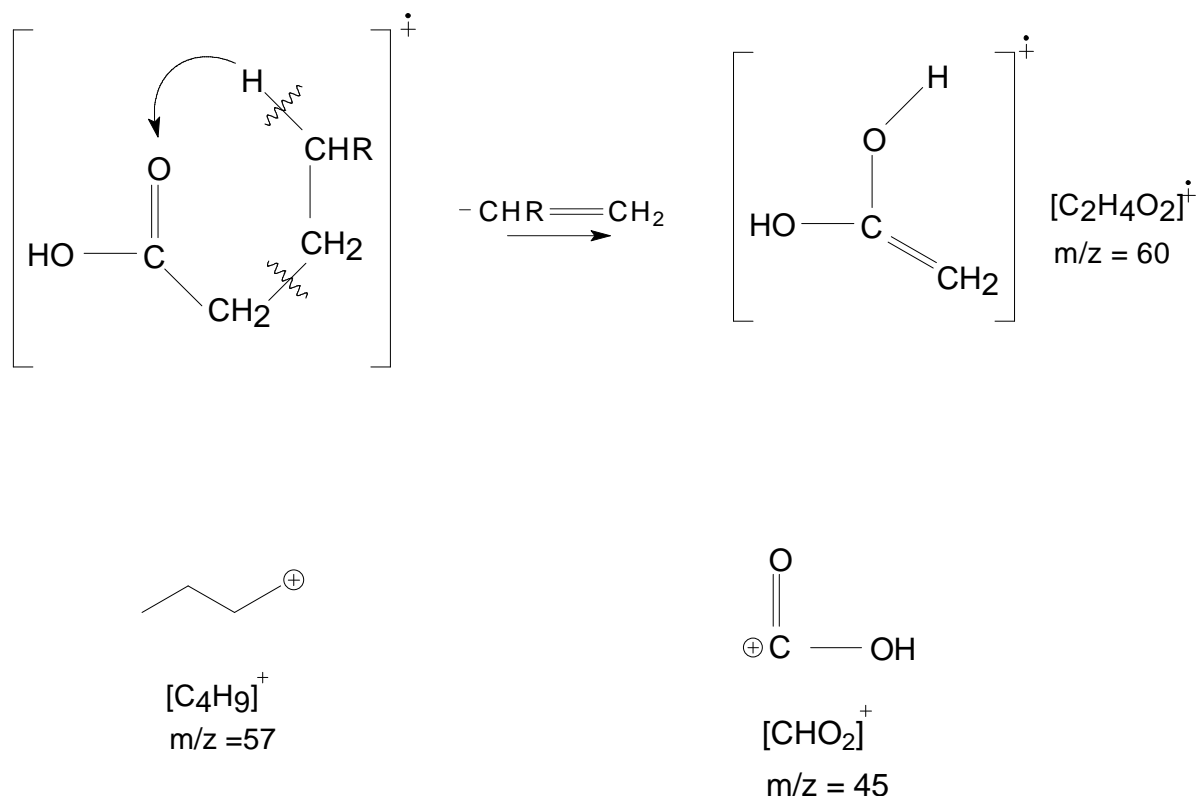
Fragmentação proposta para o composto AHS<sub>3</sub> - Ácido hexadecanóico







### Rearranjo de McLafferty:



**FIGURA 37** – Fragmentação do composto AHS<sub>3</sub>

McGaw e colaboradores (2002) relataram atividade antibacteriana de ácidos graxos presentes em plantas

O ácido palmítico é considerado o principal composto antibacteriano presente nos óleos essenciais das espécies *Diplotaxis harra* e *Erucaria microcarpa*, ambas pertencentes à família Cruciferae (HASHIM & SALEH, 1999). É responsável pela atividade antibacteriana em espécies da família Sterculiaceae (REID *et al.*, 2005). É um dos ácidos graxos saturados mais comuns em lipídeos de folhas e em óleos de sementes (GURR & JAMES, 1971; HARBORNE & BAXTER 1993).

#### 5.5.6 - Identificação do composto AHS<sub>4</sub>

O espectro de massas e a estrutura do composto AHS<sub>4</sub> encontram-se na Figura 38. Os fragmentos mais importantes para elucidação estrutural deste composto, além de suas massas e intensidades relativas estão descritos na Tabela 13.

Esses fragmentos e suas respectivas massas correspondem aos valores descritos para o ácido 9-octadecenóico ou ácido oléico, que é um ácido graxo insaturado de cadeia longa, presente na biblioteca de espectros WILEY 229 cuja fórmula molecular é C<sub>18</sub>H<sub>34</sub>O<sub>2</sub>.

Os principais fragmentos observados no espectro de massas do composto AHS<sub>4</sub> encontram-se representados na Figura 39.

O pico do íon molecular do composto AHS<sub>3</sub> apresenta-se em  $m/z$  282 e o bico base em  $m/z$  55.

O pico em  $m/z$  45 é característico de ácidos carboxílicos. Os picos mais intensos em alquenos ocorrem em  $m/z$  41, 55 ou 69. Ocorre rearranjo de McLafferty e clivagem  $\alpha$  e  $\beta$ .

Ocorrem fragmentos de íons proeminentes na sequência C<sub>n</sub>H<sub>2n-1</sub>.

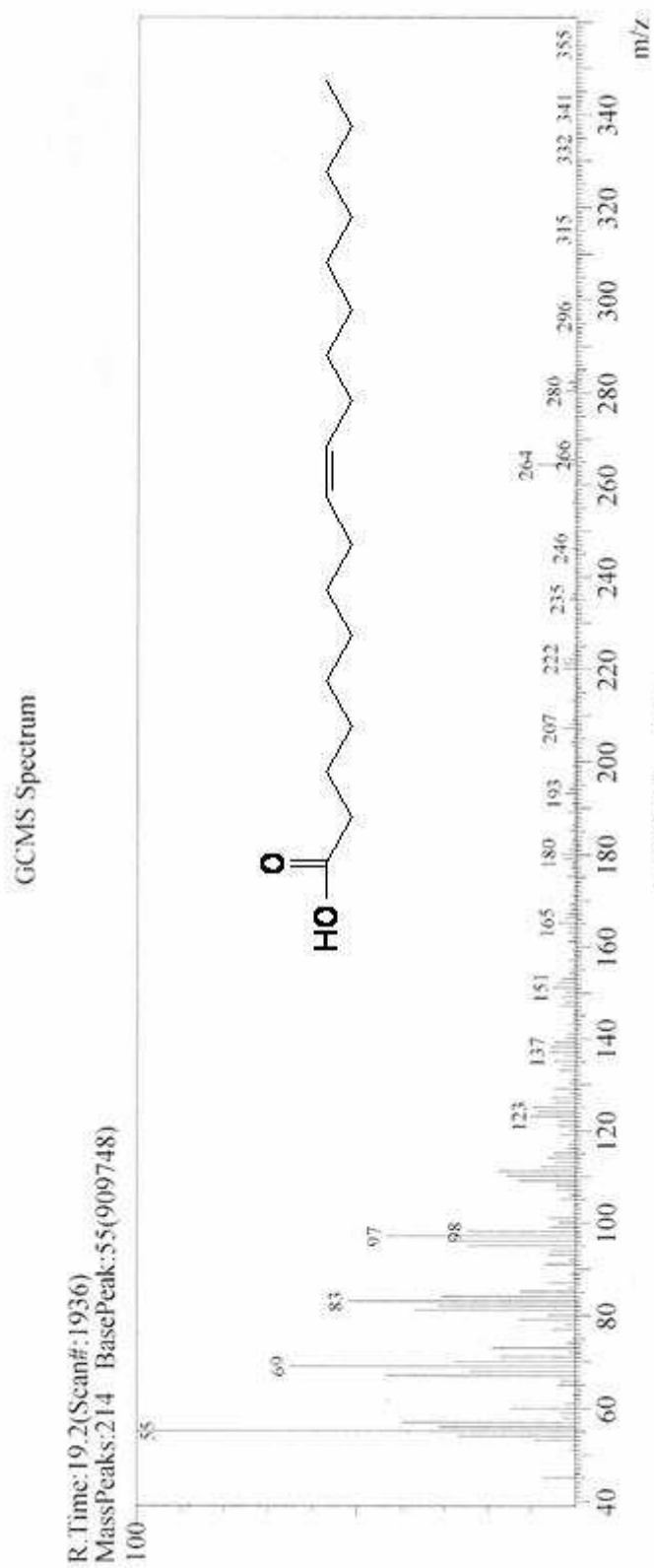
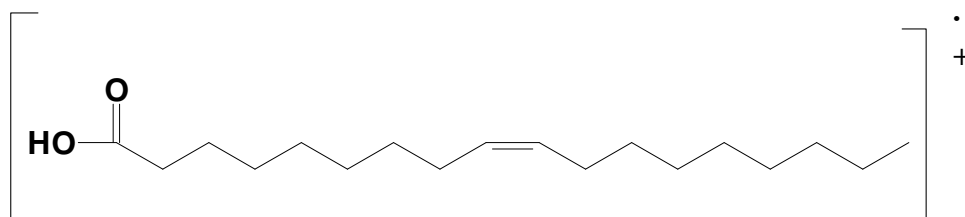


FIGURA 38 – Espectro de massas e estrutura do composto AHS<sub>4</sub>

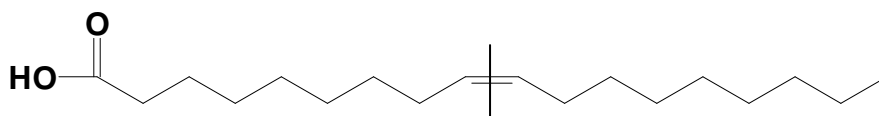
**TABELA 13** - Principais fragmentos presentes no espectro de massas do composto AHS4.

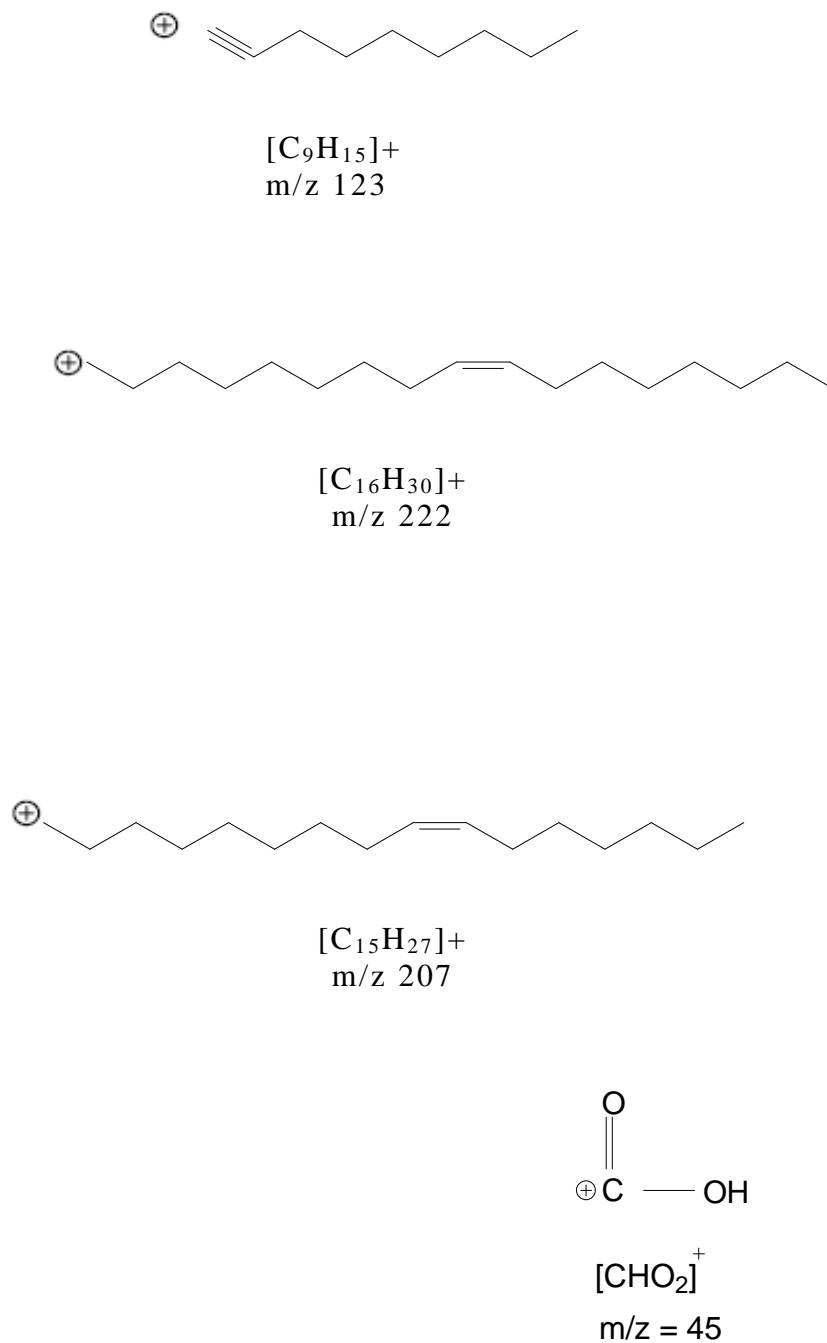
Massa	Fragmento	Intensidade relativa(%)
282	$[C_{18}H_{34}O_2]^+$	3,33
264	$[C_{18}H_{32}O]^+$	8,89
222	$[C_{16}H_{30}]^+$	4,44
207	$[C_{15}H_{27}]^+$	3,21
193	$[C_{13}H_{21}O]^+$	2,26
180	$[C_{11}H_{16}O_2]^+$	3,44
165	$[C_{11}H_{17}O]^+$	3,86
151	$[C_1H_{15}O]^+$	5,17
137	$[C_{10}H_{17}]^+$	6,02
123	$[C_9H_{15}]^+$	10,16
98	$[C_7H_{14}]^+$	24,93
97	$[C_7H_{13}]^+$	43,33
83	$[C_4H_3O_2]^+$	52,02
69	$[C_4H_5O]^+$	65,04
55	$[C_4H_7]^+$	100



Ácido 9-octadecenóico

$[C_{18}H_{34}O_2]^+$  m/z 282





**FIGURA 39** – Fragmentação do composto AHS<sub>4</sub>

### 5.5.7 - Identificação do composto AHS<sub>5</sub>

O espectro de massas e a estrutura do composto AHS<sub>5</sub> encontram-se na Figura 40. Os fragmentos mais importantes para elucidação estrutural deste composto, além de suas massas e intensidades relativas estão descritos na Tabela 14.

Estes fragmentos e suas respectivas massas correspondem aos valores descritos para o ácido octadecanóico ou ácido esteárico, que é um ácido de cadeia longa, presente na biblioteca de espectros WILEY 229 cuja fórmula molecular é C<sub>18</sub>H<sub>36</sub>O<sub>2</sub>.

Os principais fragmentos observados no espectro de massas do composto AHS<sub>5</sub> estão representados na Figura 41.

O pico do íon molecular do composto AHS<sub>5</sub> apresenta-se em m/z 284 e o pico base em m/z 55. A perda de uma hidroxila (OH) representa o pico de baixa intensidade em m/z 267, os picos em m/z 115, 129, 143, 157, 171, 185, 199, 213, 227 e 241 formam uma seqüência de fragmentação caracterizada por perdas sucessivas de CH<sub>2</sub> (14 unidades de massa).

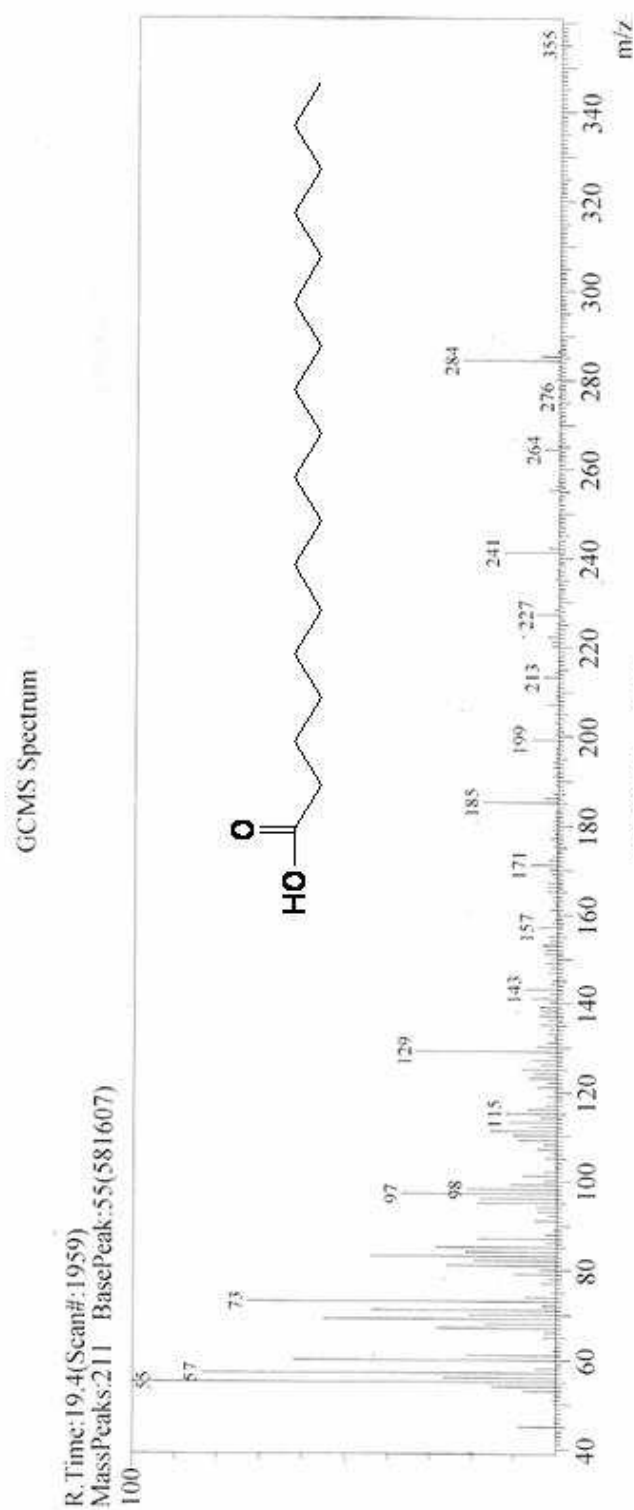
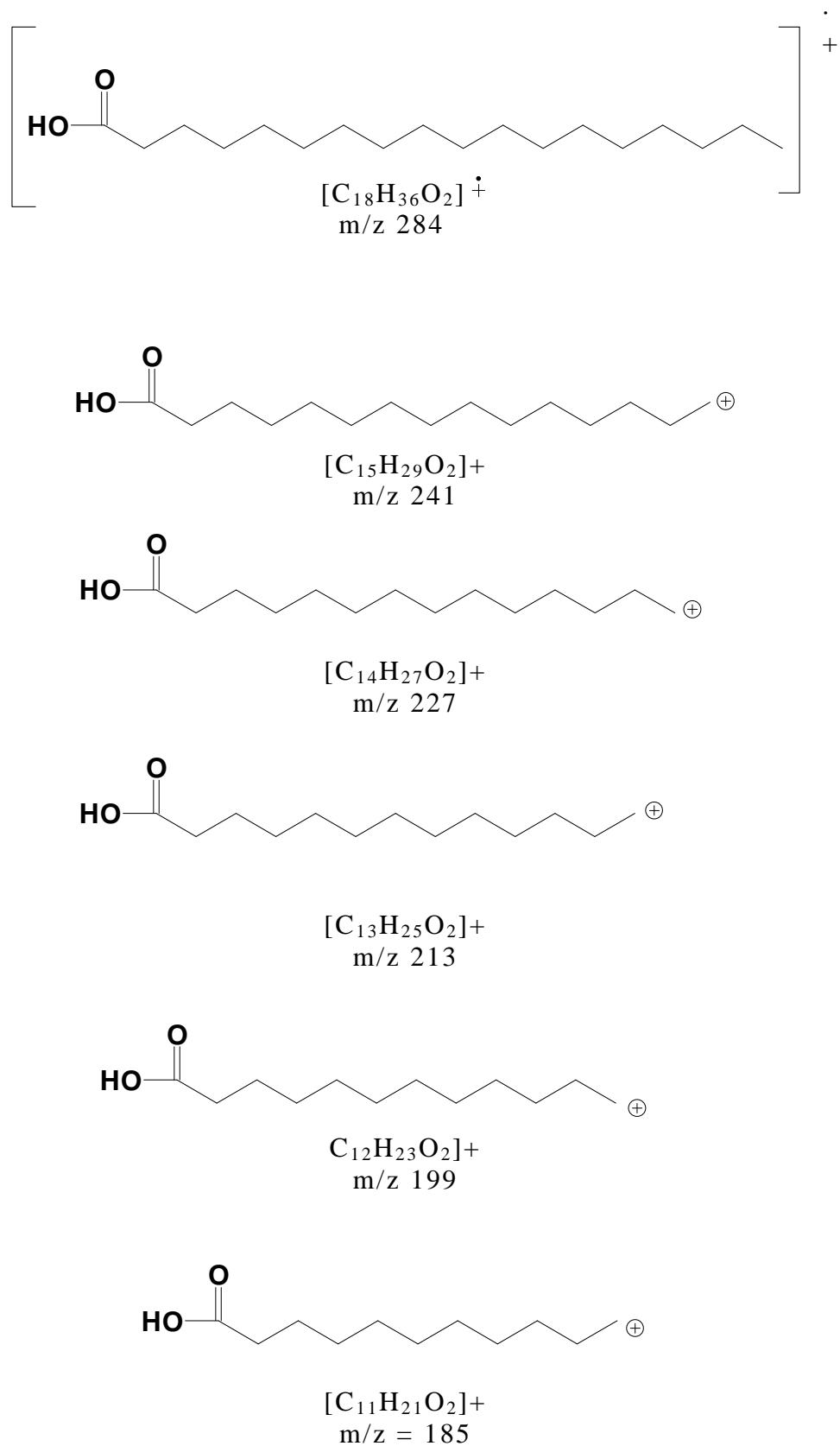


FIGURA 40 - Espectro de massas e estrutura do composto AHS<sub>5</sub>.

**TABELA 14** - Principais fragmentos presentes no espectro de massas do composto AHS<sub>5</sub>.

<b>Massa</b>	<b>Fragmento</b>	<b>Intensidade relativa (%)</b>
284	$[\text{C}_{18}\text{H}_{36}\text{O}_2]^+$	25,56
241	$[\text{C}_{15}\text{H}_{29}\text{O}_2]^+$	15,56
227	$[\text{C}_{14}\text{H}_{27}\text{O}_2]^+$	5,56
213	$[\text{C}_{13}\text{H}_{25}\text{O}_2]^+$	3,65
199	$[\text{C}_{12}\text{H}_{23}\text{O}_2]^+$	6,42
185	$[\text{C}_{11}\text{H}_{21}\text{O}_2]^+$	17,79
171	$[\text{C}_{10}\text{H}_{19}\text{O}_2]^+$	6,46
157	$[\text{C}_9\text{H}_{17}\text{O}_2]^+$	4,64
143	$[\text{C}_8\text{H}_{15}\text{O}_2]^+$	7,57
129	$[\text{C}_7\text{H}_{13}\text{O}_2]^+$	33,54
115	$[\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_2]^+$	12,12
98	$[\text{C}_7\text{H}_{14}]^+$	21,37
97	$[\text{C}_7\text{H}_{13}]^+$	36,61
73	$[\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_2]^+$	72,97
57	$[\text{C}_4\text{H}_9]^+$	83,56
55	$[\text{C}_4\text{H}_7]^+$	<b>100</b>





**FIGURA 41** – Fragmentações do composto AHS<sub>5</sub>

Atividade inseticida tem sido atribuída as Alcanamidas (JACOBSON, 1971).

Amidas alifáticas são metabólitos distribuídos extensamente nas plantas com uma escala larga de atividades biológicas (CHAVÉZ, 2003).

Ácidos graxos de cadeia longa têm comprovada atividade antimicrobiana (ZHENG *et al.*, 2005).

Os constituintes principais do extrato diclorometano da madeira de *Pinus oocarpa* são ácidos diterpênicos, além dos ácidos palmítico e oléico. No óleo essencial da madeira, os componentes principais identificados foram aromadendreno, ledano, hexadecanal e ácido oléico (MORAIS *et al.*, 2005).

Em 2005 Granato *et al.* detectaram a presença de fenóis e terpenos nos extratos obtidos a partir de rejeitos resultantes do beneficiamento de madeiras nobres comercializadas no estado do Paraná, dentre elas Jatobá (*Hymenaea sp.*), bem como comprovaram a atividade antimicrobiana do extrato metanólico frente às bactérias *Escherichia coli*; *Klebsiella pneumoniae*; *Micrococcus luteus*; *Proteus mirabilis*; *Staphylococcus aureus*.

As graxas são definidas como ésteres de ácidos carboxílicos de cadeias longas (ácidos graxos) com glicerol, enquanto as ceras são ésteres de ácidos graxos com álcoois de alta massa molecular. Graxas e ceras são extraíveis da madeira com solventes orgânicos como éter de petróleo, acetona e éter etílico. Vários ácidos graxos e ceras são encontrados em madeiras de *Pinus sp.* (SJÖSTRÖM, 1993).

## 6 - CONCLUSÕES

- A abordagem fitoquímica do alburno de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne revelou a presença de flavonóides, esteróides e terpenóides.
- O extrato acetato de etila apresentou maior rendimento em relação a sua massa no processo de extração utilizado.
- Extrato em acetato de etila apresentou melhor atividade antimicrobiana, no método de difusão em disco, obtendo halos de inibição do crescimento microbiano entre 10mm (100mg/mL) a 27mm (300mg/mL) frente a bactéria gram-positiva *Staphylococcus aureus* (UFPEDA).
- Esse extrato ainda apresentou resultado significativo frente à bactéria álcool-ácido-resistente *Mycobacterium smegmatis* (16 mm e 26 mm).
- O extrato em acetato de etila mostrou halos de inibição entre 09 a 13 mm enquanto que os extratos brutos em etanol apresentaram halos entre 9 a 16 mm frente aos isolados clínicos (PASM)
- Das bactérias Gram negativas testadas a *Pseudomonas aeruginosa* foi a que mostrou maior halo de inibição variando de 13 a 16 mm nos extratos brutos da planta
- Atividade antimicrobiana dos extratos em ciclohexano, acetato de etila e etanol foi comprovada através da microdiluição frente ao microrganismo Gram-positivo *Staphylococcus aureus* (UFPEDA).

- A concentração inibitória mínima (CIM) foi de 128mg/mL para o extrato ciclohexânico, de 32mg/mL para o extrato em acetato de etila e de 64mg/mL para o etanólico.
- Foram identificados cinco compostos do alburno de *Hymenaea stigonocarpa* através da cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG-MS) são eles: N-N-dietil-decanamida, Hexadecanoato de metila, Ácido hexadecanóico, Ácido 9-octadecenóico e Ácido octadecanóico.

## 7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-KADER, M.; BERGER J. M.; SLEBODNICK C; HOCH J, MALONE S, WISSE JH, WERKHOVEN MC, MAMBER S, KINGSTON DG. (2002). Isolation and absolute configuration of ent-Halimane diterpenoids from *Hymenaea courbaril* from the Suriname rain Forest. **Journal of Natural Products**. v. 65, n. 1, 11-15.

ALMEIDA, S. P.; PROENÇA, C. E. B.; SANO, S. M.; RIBEIRO, J. F. **Cerrado: Espécies vegetais úteis**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1998, 202-205.

ALVES, T. M. A., SILVA, A. F., BRANDÃO M., GRANDI, T. S M, SMÂNIA, E. F. A, JÚNIOR, A. S., ZANI, C. L., (2000). Biological Screening of Brazilian Medicinal Plants. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 95(3): 367-373.

ANDREAZZA, R.C.S. **Análise botânica, química e microbiológica de *Salvia aliciae* E. P. Santos, *S. lachnostachys* Benth., *S. microphylla* Kunth, *S. officinalis* L (Lamiaceae)**. Curitiba, 2000, 125 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

BANDEL, G. **Variação numérica de cromossomos e evolução nas Leguminosas**. São Paulo, Tese de Doutorado - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” Universidade de São Paulo, 146p, 1972.

BARROSO, G. M. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. v. II, Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, Imprensa Universitária, 1991.

BARROSO, G. M.; PEIXOTO, A. L.; COSTA, C. G.. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**. 2ª ed., v. II, Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, Imprensa Universitária, 2002.

BASSOLE, I. H. N., OUATTARA, A. S., NEBIE, R., OUATTARA, C. A. T., KABORE, Z. I., TRAORE, S. A., (2003). Chemical composition and antibacterial activities of the essential oils of *Lippia chevalieri* and *Lippia multiflora* from Burkina Faso. **Phytochemistry** 62, 209–212

BARRICHELO, L.E.G. & BRITO, J.O. **Química da madeira**. Piracicaba, SP, ESALQ, 1985. 125.

BARROS, G. S.; MATOS, F. J.; VIEIRA J. E.; SOUSA, M. P.; MEDEIROS, M. C.(1970). **J Pharm Pharmacol**. 22(2):116-22

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J. C. (1966). Antibiotics susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal Clinical Pathology**. 45, 493-496

BRAZ-FILHO, R. (1994). Química de Produtos Naturais: Importância, Interdisciplinaridade, Dificuldades e Perspectivas. A Peregrinação de um Pacatubano; **Química Nova**, 17, 405.

CAKIR, A., KORDALI, S., KILIC, H., KAYA, E., (2005). Antifungal properties of essential oil and crude extracts of *Hypericum linarioides* Bosse. **Biochemical Systematics and Ecology**. 33, 245-256.

CARIBÉ, J., CAMPOS, J. M.,(1991). Plantas que Ajudam o Homem: Guia Prático para a Época Atual, Pensamento, São Paulo, p. 6

CARLINI, C. R.; SÁ, M. F. G;(2002). Plant Toxic Proteins with Insecticidal Properties. A Review on their Potentialities as Bioinsecticides. **TOXICON**, 40(11):1515-39.

CAZES, J. **Encyclopedia of Chromatography**. Editora Marcel Dekker; 927, 2001

CHÁVEZ, E. R.; BUCIO, J. L.; ESTRELLA, L. H.; TORRES, M. P.( 2004). Alkamides Isolated from Plants Promote Growth and Alter Root Development in Arabidopsis. **Plant Physiology**. March; 134(3): 1058–1068

COLLINS. H. C; BRAGA. L. G; BONATO, S. P. **Introdução a métodos cromatográficos**. Campinas: Editora da UNICAMP, 1990. 9-279

CORRÊA, M. P. **Dicionário das Plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro, Ministério da Agricultura, IBDF, v. IV, 1984, p. 500-503.

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

CUMMINGS, B. **Modes of antimicrobial action**. Disponível em: <http://microvet.arizona.edu/Courses/MIC205/Ch20Antimicrobials/Antibiotics.html>. Acessado em: 10/07/2005

CUNHA, F. A., MENEZES, E. A., MORAIS, S. M., CAVALCANTI, E. S. B., BERTINI, L. M., PEREIRA, A. F., OLIVEIRA, C. L. L. (2005). **Perfil de Sensibilidade de Bactérias Frente a Óleos Essenciais de Algumas Plantas do Nordeste do Brasil**. Infarma, 17, nº ¾.

CUNNINGHAM, A.; MARTIN S.S.; LANGENHEIM, J.H (1974). Labd-13-en-8-ol-15-oic acid in trunk resin of Amazonian *Hymenaea-Courbaril*. **Phytochemistry**, 13, -256.

CREWS, P., RODRÍGUEZ, J., JASPARS, M.; **Organic Structure Analyses**. Oxford University Press(1998) 554p

DEVIIENNE, K. F., RADDI, M. S. G. (2002). Screening for antimicrobial activity of Natural Products using a Microplate Photometer. **Brazilian Journal of Microbiology**. 33:166-168

FARIA, D. L.A., EDWARDS, H. G.M., AFONSO, M. C., BRODY, R. H., MORAIS J. L. (2004). Raman spectroscopic analysis of a *tembetá*: a resin archaeological artefact in need of conservation. **Spectrochimica Acta Part A** 60 1505–1513

FRANCO, J. **Determinação *in vitro* da atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Eucalyptus cinerea* F.v.M. Myrtaceae**. Curitiba, 2003, 13 f. Monografia (Especialização em Microbiologia) –Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

JOLY, A. B. **Botânica: Introdução à taxonomia vegetal**. 12ª ed., São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1998, p. 371-380

LIMA, O. G. (1959). Substâncias Antimicrobianas de Plantas Superiores: Ocorrência de antibióticos em madeiras de lei no Brasil. **Revista do Instituto de Antibióticos**, Vol.2 Ns. 1 e 2.

GILMAN, A. G., HARDMAN J. G., LIMBIRD, L. E., **The Pharmacological Basis of Therapeutics**. Ninth edition (International edition), McGraw Hill, New York, 1996.

GRANATO, D., NUNES, D. S., MATTOS, P. P., RIOS, M. E., GLINSKI, A., RODRIGUES, L. C., JÚNIOR, G. Z.(2005). Chemical and Biological Evaluation of Rejects from the Wood Industry. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. 48, 237-241,

HARBORNE, J. B., BAXTER, H., E MOSS, G. P.. **Phytochemical Dictionary: A Handbook of Bioactive Compounds from Plants**. 2nd ed. Taylor & Francis: London, UK. 1999

HENRY, J. B. **Diagnóstico clínicos e tratamento por métodos laboratoriais**. 19<sup>a</sup> ed., São Paulo: Manole, 1999, 1678 p

ISHIBASHI, M.; ODA, H.; MITAMURA, M.; OKUYAMA, E., KOMIYAMA, K., KAWAGUCHI, K.; WATANABE, T.; ALVES, S. M.; MAEKAWA, T., OHTSUK, K. (1999). Casein Kinase II Inhibitors Isolated From Two Brazilian Plants *Hymenaea parvifolia* and *Wulffia baccata* **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters** 9, 2157-2160

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

\_. **Diagnóstico Microbiológico texto e atlas colorido**. 5<sup>a</sup> ed., Rio de Janeiro: Medsi, 2001, 1465

LAMBERT, J. B., WU, Y., SANTIAGO-BLAY, J. A. (2005). Taxonomic and Chemical Relationships Revealed by Nuclear Magnetic Resonance Spectra of Plant Exudates. **Journal of Natural Products**, 68, 5



VALENTIM, A. P. T.; Atividade Antimicrobiana, Estudo Fitoquímico e Identificação de Constituintes Apolares do Alburno de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. Ex. Hayne (jatobá)

LEE, Y. & LANGENHEIM, J. H. (1975). Systematics of the genus *Hymenaea* L. (Leguminosae, Caesalpinioideae, Detarieae). **University of California**, Vol. 69.

LOPEZ, J. A. (1976). Isolation of astilbin and sitosterol from *Hymenaea courbaril*. **Phytochemistry** v. 15, 2027 f.

LORENZI H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa, SP: Editora Plantarum, (1), 1998.

MARSAIOLI, A. J., LEITÃO FILHO, H. F.; CAMPELLO, J. P, (1975). Diterpenes in the bark of *Hymenaea courbaril*. **Phytochemistry**, 14, 1882-1883.

MORAIS, S. A. L.; NASCIMENTO, E. A.; MELO, D. C. ( 2005). Análise da madeira de *Pinus Oocarpa* Parte I – Estudo dos constituintes macromoleculares e extrativos voláteis **Revista Árvore**, Viçosa-MG, 29, 3, 461-470.

NASCIMENTO, G. G. F.; LOCATELLI J.; FREITAS P. C.(2000). Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**. 31, 247–256.

NCCLS/CLSI (2000). **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**; Approved Standard—Fifth Edition. NORMA M7-A5

NETO, F.R. A, NUNES, D.S.S. **Cromatografia Principios básicos e técnicas afins**.Ed. Interciência.Rio de Janeiro, 2003

OLIVEIRA, J.T.S. SOUZA, L. C. LUCIA, R. M. D, JUNIOR, W. P. S.(2005). Influência dos Extrativos na Resistência ao Apodrecimento de seis Espécies de Madeira. **Revista. Árvore**, Viçosa-MG,29, .5, .819-826.

OLIVEIRA, J. T. S., LÚCIA, R. M. D, (1994). Teores de extrativos de 27 espécies de madeiras nativas do Brasil ou aqui introduzidas. Viçosa, MG: **Sociedade de Investigações Florestais**, 5. (Boletim Técnico, 9)

OLIVEIRA, N. S.; MERCADANTE, M.O. LOPES, P. S. N.; GOMES, I. A. C. GUSMÃO, E.; RIBEIRO, **Efeitos alelopáticos dos extratos aquoso e**

**etanólico de Jatobá do Cerrado.** L. M. UNIMONTES CIENTÍFICA. Montes Claros, 4, 2002

PAULA, J.E & ALVES J. L. H.(1997). **Madeiras nativas. Anatomia, Dendrologia, Dendrometria, produção e uso.** Ed. MDA, Brasília 543p.

PEREIRA, J.C.D.; STURION, J.A.; HIGA, A.R.; HIGA, R.C.V.; SHIMIZU, J.Y. (2000) Características da madeira de algumas espécies de eucalipto plantadas no Brasil. Colombo: **Embrapa Florestas**, 113p. (Embrapa Florestas. Documentos, 38).

PETTERSEN, R.C (1984). The chemical composition of wood. In: ROWELL,R.(ed). The chemistry of solid wood. Washington, **American Chemical Society**, 54-126.

PETTIT, G. R., MENG, Y., STEVENSON, C. A., DOUBEK, D. L., KNIGHT, J. C., CICHACZ, Z., PETTIT, R. K., CHAPUIS, JEAN-CHARLES, RATES, S. M. K. (2001). Plants as source of drugs. **Toxicon**. v. 39, n. 5, p. 603-613.

RAVEL, R. **Laboratório clínico: aplicações clínicas dos dados laboratoriais.** 6<sup>a</sup> ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997, 616 p

RIZZINI, C. T. Plantas do Brasil: **Árvores e madeiras úteis do Brasil - Manual de dendrologia brasileira** . 2<sup>a</sup> ed., São Paulo: Edgar Blucher, 1985, p. 124-128

SALISBURY, F. B.; ROSS, C. W. (1992). **Plant Physiology**, 4a ed., Wadsworth Publishing Company, Belmont.

SCHMIDT, J. M.(2003). Isolation and Structure of Palstatin from the Amazon Tree *Hymenaea palustris*. **J. Nat. Prod.**, 66, 259-262

SIQUEIRA, D. S., PEREIRA, A. S., AQUINO NETO, F. R. (2003). Determinação de compostos de massa molecular alta em folhas de plantas da Amazônia. **Química Nova** 26 (5), 633-640

SILVA, T. S. S. **Estudo de tratabilidade físico-química com uso de taninos vegetais em água de abastecimento e esgoto.** [Mestrado] Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública; 1999. 88

SILVA, D.A.; TRUGILHO, P.F.(2003) Comportamento Dimensional da Madeira de Cerne e Alburno Utilizando-se a Metodologia de Análise de Imagem Submetida a Diferentes Temperaturas.**CERNE**. 9,1 56-65.

SILVERSTEIN, R. M., WEBSTER, F. X. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**, 2000. 6 ed.

SJÖSTRÖM, E. **Wood chemistry: fundamentals and application**. London: Academic Press, 1993. 293 p

SOUZA, M.M.; CRUZ, A.B.; SCHUHMACHER, M.B.; KREUGER, M.R.O.; FREITAS, R.A.; CRUZ, R.C.B.. Métodos de avaliação de atividade biológica de produtos naturais e sintéticos. In: **Ciências Farmacêuticas: contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos**. Itajaí: Univali, 2003.

TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfeciosos**. 3ª ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2001

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L.. **Microbiology: an introduction**. 17.ed.New York: Addison Wesley Longman, 2001. 549-575.

ZHENG, C. J., YOO, J-S, WON-GON, K.; CHO, H-Y, KIM, Y-H; KIM, WON-GON (2005). Fatty acid synthesis is a target for antibacterial activity of unsaturated fatty acids **FEBS Letters**, 579, Issue 23, 26, 5157-5162

## **ANEXO 1 - Composição dos reagentes utilizados na abordagem fitoquímica.**

### **Reagente de Mayer:**

Misturaram-se 1,36 g  $\text{HgCl}_2$  / 60mL de água e 5 g de KI / 10mL de água.

Diluiu-se a 100mL.

### **Reagente de Dragendorff:**

**Solução A:** dissolve-se 1,7g de nitrato de bismuto(III) e 20g de ácido tartárico em 80 mL de água.

**Solução B:** dissolve-se 16g de iodeto de potássio em 40 mL de água.

**Reagente:** misturaram-se partes iguais de A e B.

### **Reagente de Liebermann- Burchard:**

Mistura-se 10mL de anidrido acético e duas gotas de ácido sulfúrico concentrado.

### **Solução de cloreto férrico:**

Prepara-se uma solução 10% de cloreto férrico em água destilada

## ANEXO 2 - Perfis de suscetibilidade de microrganismos-teste aos antimicrobianos

<b>Antibióticos</b>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
Amicacina	R	S	S
Ampicilina	NT	NT	NT
Aztreonam	NT	R	NT
Cefalotina	NT	R	R
Cefepime	NT	R	NT
Cefotaxima	NT	R	R
Cefoxitina	S	R	R
Ciprofloxacina	NT	S	S
Eritromicina	R	NT	NT
Gentamicina	S	S	S
Imipenem	NT	S	NT
Meropenem	NT	S	NT
Nitrofurantoíá	S	R	R
Norfloxacina	S	S	S
Oxacilina	S	NT	NT
Penicilina G	R	NT	NT
Tetraciclina	S	S	R
Trimetoprim			
/Sulfametoxazol	S	S	S
Tobramicina	NT	S	S
Vancomicina	NT	NT	NT
NT - Não testado R - Resistente S - Sensível			