

LUIZ GONZAGA DO PRADO FILHO

ENGENHEIRO AGRÔNOMO

INSTITUTO ZIMOTÉCNICO

U. S. P.

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DE
ANTIMICROBIANOS DE ORIGEM
VEGETAL

ANTIMICROBIANO ISOLADO DE CÉRNE DE
CENTROLOBIUM ROBUSTUM BENTH.

Tese de Doutorado apresentada à
Escola Superior de Agricultura «Luiz de Queiroz», U. S. P.
Piracicaba, maio de 1965

E R R A T A

<u>Pag.</u>	<u>Linha</u>	<u>Onde se lê</u>	<u>Leia-se</u>
1	4	Timol com desinfetante	Timol como desinfetante
2	27	-	Extratos
3	38	OKAZKI E HOMMA	OKAZAKI E HOMMA
4	1	Miricetina, dos pigmentos	Miricetina, dois pigmentos
4	4	SIMERZBERGER	SIMETZBERGER
4	34	SANCHES-MARROCHIN	SANCHES-MARROQUIN
7	19	-	Sarcina lutea
7	33	-	Mycobacterium phlei
9	2	-	Instituto Adolfo Lutz
11	13	conseguido pela inoculação	Conseguido inoculando-se
19		éter de petróleo 30-60°C -benzeno 20-30	éter de petróleo. 30-60°C -benzeno, 20:30
25	16	côr vermelho avinhado	côr vermelha avinhada
37	9	tratados	testados
38	7	definidos	localizados
39	8	localizados	definidos
51	35		1961 - Substâncias antimicrobianas de Plantas superiores. Comunicação XVI. Estudo de antimicrobianos cristalizados obtidos de madeira de jacarandá " <u>Dalbergia nigra</u>) Rev. Inst. Antib. Recife, 3 (1): 61-80.

Aos meus pais

A memória do saudoso
Prof. Jayme Rocha de Almeida

	Páginas
1. Introdução	1
2. Revisão Bibliográfica	2
3. Materiais e Métodos	6
3.1. Materiais	6
3.1.1. Amostra Estudada	6
3.1.2. Solventes e Drogas	6
3.1.3. Meio de Cultura Utilizados	6
3.1.4. Microrganismos Utilizados	7
3.2. Métodos	
3.2.1. Métodos de Avaliação da Atividade de Antibiótica	9
3.2.1.1. Método dos Discos de Pa- pel de Filtro	9
3.2.1.2. Método das Estrias em agar	10
3.2.1.3. Método da Placa Gradi- ente	10
3.2.1.4. Determinação da mortali- dade percentual	11
3.2.2. Estudo Preliminar da Atividade..	11
3.2.2.1. Preparo da Amostra e Ex- tração	12
3.2.2.2. Prova de Atividade dos Extratos Preliminares..	12
3.2.2.3. Prova de Termoestabili- dade	12
3.2.3. Extração para obtenção da subs- tância antimicrobiana	13
3.2.3.1. Preparo da amostra e ex- tração	13
3.2.3.2. Prova de Atividade dos resíduos brutos dos ex- tratos	14
3.2.4. Obtenção da Substância Pura e - Cristalina	14
3.2.4.1. Cristalização	14
3.2.4.2. Purificação	14

	Páginas
3.2.5. Provas Físico-Químicas e Biológicas	20
3.2.5.1. Provas Físico-Químicas	20
3.2.5.2. Provas Biológicas	21
4. Resultados	22
4.1. Pesquisas preliminares	22
4.2. Atividade dos Resíduos Brutos	23
4.3. Atividade do Resíduo A	23
4.4. Resultado das provas Físico-Químicas e Biológicas	24
4.4.1. Provas Físico-Químicas	24
4.4.2. Provas Biológicas	29
5. Discussão dos resultados	37
5.1. Pesquisas Preliminares	37
5.2. Provas Físico-Químicas	37
5.3. Provas Biológicas	42
6. Conclusões	45
7. Resumo	46
8. Literatura citada	48
9. Agradecimentos	56

4977/ho

1. INTRODUÇÃO

A busca e a utilização dos vegetais com fins medicinais que se processou através dos séculos de forma empírica, somente no século XIX com os trabalhos de MARTINI (43) começou a ser encarada à luz dos conhecimentos até então adquiridos com maior rigor científico, quando este autor empregou o timol com desinfetante, cuja constituição já havia sido estabelecida. Desde então tem-se ampliado constantemente o campo de estudo dos antimicrobianos de vegetais.

Se bem que os trabalhos sejam numerosos no tocante aos vegetais em geral, menor número de pesquisas foram realizadas - no campo dos antimicrobianos de madeiras, especialmente no que se refere às essências nativas. A estes estudos apresentamos - nossa contribuição.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A primeira tentativa de estudar o problema cientificamente, coube a HAWLEY, FLECK e RICHARDS (25), que em 1924 determinaram a sensibilidade de Fomes anorus, perante extratos aquosos de madeiras de diversas espécies.

SOWDERS (49) em 1929, estudou a ação tóxica dos extratos quosos de cerne de Thuja plicata sobre o fungo Lentinus lenideus.

KITAJIMA (29), obteve, em 1933 do cerne Thujopsis dolabrata uma substância que inibiu o crescimento de Polyporus vaporearius "in vitro".

Em 1939, ERDTMAN (11) extraiu da madeira da espécie Pinus silvestris duas substâncias ativas contra fungo e bactérias. Essas substâncias são relacionadas com o estilbeno, e foram denominadas pinosilvina e respectivo metil-éter.

No ano seguinte LEBDUSKA e PIDRA (30) estudaram a ação germicida do óleo de pinheiro combinado com sabões.

Em 1941 AULIN-ERDTMAN (2) sintetizou o éter dimetilico da pinosilvina. RENNERTFELT (46) em 1943 determinou quantitativamente a ação da pinosilvina e de seu monimetil-éter sobre diversas espécies de fungos destruidores de madeiras. Em 1945 FRYKHOLM (16) realizou estudos bacteriológicos e toxicológicos com as mesmas substâncias mais o dimetil-éter.

SOUTHAM (52) estudou o comportamento antibiótico de extratos de cerne de Thuja plicata, em 1946. Determinou que a ação antibiótica se faz sentir através do bloqueio dos grupos SH de enzimas dos microrganismos afetados. Ainda neste ano WATERMAN (63) pesquisou a toxidez de extratos aquosos de onze espécies de madeiras tropicais das Américas Central e do Sul, e três espécies da América do Norte.

ERDTMAN e GRIPEMBERG (12) isolaram em 1948 de Thuja plicata, três das quatro substâncias isômeras presentes no cerne, de fórmula bruta $C_{10}H_{12}O_2$, cujas presenças já haviam sido determinadas anteriormente por outros autores (15, 50). Tais substâncias foram denominadas α , β e γ tujaplicinas. Ato contínuo ao isolamento dos três isômeros a δ -tujaplicina foi identificada como δ -isopropil tropolona. Em seguida GRIPEMBERG (22) esclarece a estrutura de α -tujaplicina como sendo a α -isopropil propolona e ANDERSON e GRIPEMBERG (3) determinam que a β -tujaplicina é a β -isopropil tropolona.

No ano de 1949 uma outra substância derivada do estilbe

no entanto relacionada à pinosilvina, foi isolada por GRUNDON e KING (24) de madeira de Chlorophora excelsa, tendo sido denominada cloroforina. Ainda em 1949 GRIPENBERG (23) isolou e determinou a estrutura do quarto isômero de fórmula bruta $C_{10}H_{12}O$ presente do cerne de Thuja plicata, denominado-o ácido tújico. Tal substância havia sido isolada anteriormente por ANDERSON e SHERRARD (1) que a tinham denominado ácido dehidroperílico e proposto uma estrutura inexata.

Com os estudos realizados constatou-se uma particularidade interessante. As madeiras das árvores que crescem na América fornecem ácido tújico, β e γ tujaplicinas mas não α -tujaplicina, ao passo que as árvores da Suécia fornecem ácido tújico α e γ -tujaplicinas, porém, não β -tujaplicina. As causas desta diferença na composição química das madeiras de uma mesma espécie, não estão esclarecidas.

ERDTMAN e RENNERFELT (13) isolaram de madeira de Tetraclinis articulata a timoquinona, com propriedades antifúngicas. No ano imediato AULIN-ERDTMAN (4) isolou a nootkatina do cedro amarelo, Chamaecyparis nootkatensis, estabelecendo para a mesma, uma estrutura relacionada à tropolona. A atividade fungistática dessa substância foi evidenciada posteriormente por CARLSSON e colaboradores (10).

Em 1951, JENSEN (27, 28) patenteou o uso de extratos de madeira do gênero Thuja nomeadamente Thuja occidentalis e de madeira de Maclura pomifera como preservativo de alimentos. NISHIDA e colaboradores (40) atestaram a atividade inibidora da 3,3', 4', 5,7-pentahidroxi flavanona, um pigmento de madeira, contra Poria vaporaria e Polystictus sanguineus.

No ano subsequente ROLLE e MAYER (47) realizaram estudos relacionados com a ação desinfetante do óleo de coníferas sobre o bacilo da tuberculose. CARLSSON e colaboradores (10) isolaram de coníferas dois ácidos cíclicos isômeros com forte atividade antifúngica e que foram denominados ácidos chamico e chamínico. Determinou ERDTMAN (14) que a alta durabilidade da madeira de Dacrydium cupressinum é devida à presença de um fungicida fenólico encontrado pelo mesmo autor, no cerne Podocarpus ferrugineus.

OKAZKI e HOMMA (41) constataram, em 1953, a atividade bacteristática do óleo essencial de Tujopsis dolobrata. FUNACKA (17) determinou que a atividade fungistática da destilina e da

miricetina, dos pigmentos de madeira, está ligado à presença de grupos OH fenólicos.

A atividade desinfetante do coniferol contra Mycobacterium tuberculosis foi estudada por SIMERZBERGER (56) em 1953. FUNAOKA (18) determinou que a distilina e a quercetina e seus respectivos penta-acetil e penta-metil derivados, controlam o crescimento de Poria vaporaria e Polystictus sanguineus cultivados sobre serragem de Cryptomeria japonica, embebida de meio de Czapek líquido.

Em 1955 BARNES E GERBER (8) trabalhando com Toxylon pumiferum atribuíram a grande durabilidade e resistência ao apodrecimento desta madeira, a presença do 2,3', 4,5'-tetrahidroxil estilbeno que é uma substância relacionada com a pinosilvina. FUNAOKA e colaboradores (20) estudando o comportamento antifúngico de dois pigmentos de madeira, consideram que suas atividades se fazem sentir através de suas ações bloqueadoras sobre enzimas.

LIMA e colaboradores (31, 32) em 1956 evidenciaram a ação antimicrobiana do lapachol e da xiloidina corantes de madeiras da família Bignoniaceae, particularmente presentes nos gêneros Tabebuia e Tacoma. RODINA publicou em 1957 (48) trabalho no qual revela que o antibiótico obtido do eucalipto, age por fixação bacteriana. ITO (26) realiza estudos farmacológicos nas frações ácida e fenólica do óleo de Thujopsis dolabrata. PAVOLOTS'KII (44) fez estudos comparativos entre extratos de pinheiros siberianos e caucasianos, concluindo pela ação antimicrobiana -- mais acentuada nos primeiros.

Em 1958 OERIU e colaboradores (42) pesquisaram a atividade antimicrobiana de resina de coníferas, dentre as quais se destacam as seguintes espécies: Pinus montana, Picea excelsa, Picea polita e Pseudotsuga taxifolia. MARUZZELA e HENRY (38) -- compararam as atividades antibacterianas de óleos essenciais de diversos vegetais entre os quais estão: eucalipto, cinamomo e cedro. SANCHES-MAROCCHIN e colaboradores (57) extraíram de ramos de Haematoxylon brasiletto um antimicrobiano que foi identificado como brazilina.

Em 1959 LIMA e colaboradores (33) determinaram a presença de atividade antibiótica em madeiras de lei brasileiras, tais como: ipê (Paratecoma peroba), itapecuru-prêto e itapecuru-amarelo (Goniorrachis sp), pau-Brasil (Caesalpinia echinata), jacarandá (Dalbergia nigra), putumujú (Centrolobium robustum), jacaran-

4977/1107

dá-violeta (Dalbergia cearensis).

SAVCHUK (58) em 1960 comparou os efeitos de vários fitoncídeos, entre os quais o do pinho, sobre os processos digestivos.

LIMA e colaboradores (34, 35, 36) expõem, em 1961, trabalhos sobre a ação antibiótica de brazilina, bem como sobre antibióticos extraídos do cerne de barabú (Peltogyne recifensis) e do jacarandá (Dalbergia nigra).

Em 1962, LIMA e colaboradores (37) estudam a atividade antimicrobiana de alguns derivados do lapachol em comparação com a xiloidona, uma nova orto-naftoquinona isolada pelos mesmos, do cerne de "Pau D'arco" roxo Tabebuia avellanedae.

Em 1963 o autor e colaborador (45) estudaram as atividades antimicrobianas presentes em madeiras dos gêneros Machoe-rium, Genipa, Casuarina, Escembekia e Luhea.

4977/11/07

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAIS

3.1.1. AMOSTRA ESTUDADA

O material sob a forma de caibro de aproximadamente 10 x 10 cm de secção transversal, foi obtido de cerne de Centrolobium robustum Benth., família Leguminosae, sub-família Papilionoideae, originário do município de Itabuna no estado da Bahia, onde a espécie é conhecida pelo nome vulgar de "putumujú", sendo no estado de São Paulo conhecida como araribá-amarelo.

A espécie em questão vegeta nos estados da Bahia, Minas Gerais e São Paulo apresentando-se como uma árvore alta e frondosa, caule ereto, fôlhas compostas de folíolos grandes e flôres agrupadas em panículas terminais amplas. O fruto é uma vagem alada espincente.

3.1.2. SOLVENTE E DROGAS

Os solventes utilizados, salvo ressalva, são de grau comercial sofrendo como único processo de purificação uma destilação simples. Como dispersante utilizamos o Tween 80. As demais drogas, quando necessárias são utilizadas no grau "pro-análise".

3.1.3. MEIO DE CULTURA UTILIZADOS

Devido a diversidade de microrganismos provados, vários meios de cultura foram utilizados. Para um mesmo microrganismo usamos meios diferentes conforme desejássemos resultados qualitativos ou quantitativos.

Na pesquisa inicial de atividade usamos um mesmo meio para todos microrganismos, que foi o nutriente agar. Quando nos interessou resultados quantitativos, lançamos mão de meios de cultura específicos. Os meios utilizados foram:

Nutriente-agar (NA)

Meio de Sabouraud (Sb)

Meio de Czapek (CZ)

Meio de m^osto de malte (M)

Meio de Waksman (Wk)

Meio de esporulação para fungos (E)

Todos foram confeccionados segundo o manual Difco 9ª edição reimpressa - 1953.

4977/1/10

3.1.4. MICRORGANISMOS UTILIZADOS

Utilizamos nas provas de atividade, microrganismos dos seguintes grupos: bactérias gram positivas, gram negativas e ácido-resistentes; fungos fitopatógenos, patógenos humanos e leveduras patógenas. Segue-se a relação dos microrganismos:

Bacillus subtilis	IAUR
Bacillus subtilis	ATCC (9945)
Bacillus subtilis	ATCC (9789)
Bacillus subtilis	IAL (47-4)
Bacillus subtilis	NM (4)
Bacillus anthracis	IAUR
Bacillus mycoides	UNT (28)
Bacillus mycoides	IAL (51-240)
Bacillus mycoides	IAUR
Staphylococcus aureus	IAUR
Staphylococcus aureus 37	DPH
Staphylococcus aureus 19	IAL (27-23)
Staphylococcus aureus 38	DPH
Sarcina lutea	IAUR
Sarcina lutea	RSC (10)
Sarcina lutea	ATCC (533)
Escherichia coli	IAUR
Escherichia coli 7	IAL (39-72)
Escherichia coli	ATCC (8677)
Neisseria catharralis	IAUR
Klebsiella pneumoniae	IAUR
Klebsiella pneumoniae	DPH
Salmonella typhosa	IAUR
Salmonella typhosa	UNT (288)
Salmonella typhosa	FMSP
Shigella paradysenteriae	IAUR
Mycobacterium tuberculosis var. hominis	IAUR
Mycobacterium phlei	IAUR
Mycobacterium phlei	DM-BS (111)
Mycobacterium smegmatis	IAUR
Mycobacterium smegmatis	DM-BS (112)
Brucella suis	IAUR
Brucella melitensis	IAUR
Coccidia asteroides	IAUR

PP 77/11/11

- 8 -

Candida albicans	IAUR
Candida albicans	CNIA (112-19)
Candida albicans	FMSF (382)
Candida albicans	IAL (52-76)
Candida krusei	IAUR
Candida krusei	FMP (422)
Candida parakrusei	IBB (48)
Candida tropicalis	IAUR
Candida tropicalis	IOC (2892)
Candida tropicalis	IZ (123)
Candida pseudotropicalis	ATCC (8659)
Candida stellatoidea	IAC (33)
Candida stellatoidea	IAUR
Pseudomonas morganii	IAUR
Pseudomonas aeruginosa 3	IAL (48-3)
Cryptococcus neoformans	IAUR
Candida pseudotropicalis	IOC (2697)
Candida krusei	IZ (81)
Candida krusei	IOC (23-95)
Cryptococcus neoformans	FMSF
Aspergillus oryzae	ATCC (7252)
Aspergillus avenaceus	KBR (517)
Penicillium citreo-viride	ATCC (10425)
Polyporus cinctatus	KBR (1683)
Fusarium aurantii	IBB (115)
Fusarium sulfureum	ATCC (7642)
Fusarium moniliforme	ATCC (7809)
Sporotrichum anglicum	S (496)
Sporotrichum gougeroti	IFO (5983)
Sporotrichum carougeani	S (495)

Para a detecção e pesquisas preliminares, usamos apenas os seguintes microrganismos:

Bacillus subtilis 9	IAUR
Staphylococcus aureus	IAUR
Candida albicans	IAUR
Brucella suis	IAUR
Brucella melitensis	IAUR
Escherichia coli	IAUR

SIGNIFICADO DAS SIGLAS DE ORIGEM

IAUR - Instituto de Antibióticos da Universidade do Recife

2/9/77/1/1/1

- ATCC - American Type Culture Collection
- IAL - Instituto Adolpho Lutz
- NM - Nelson Maravalhas
- DPH - Department of Public Health
- UNT - Universidade Nacional de Tucuman
- RSC - Ruben de Souza Carvalho
- IOC - Instituto Oswaldo Cruz
- CNIA - Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias
- FMSP - Faculdade de Medicina de São Paulo
- DM-BS - Department of Microbiology
- IBB - Instituto Biológico da Bahia
- FMP - Faculté de Medicine de Paris
- IAC - Instituto Agrônômico de Campinas
- KBR - Keneth B. Raper
- MB - Metry Bacila
- IFO - Institute for Fermentation of Osaka
- IZ - Instituto Zimotécnico
- S - Origem desconhecida

3.2. MÉTODOS

3.2.1. MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIÓTICA

3.2.1.1. MÉTODOS DOS DISCOS DE PAPEL DE FILTRO

Este método foi originalmente estabelecido por SHERWOOD e colaboradores (51) para a determinação quantitativa de penicilina. Depois de simplificado tornou-se método rotineiro na determinação qualitativa de poder antibiótico. O método simplificado foi por nós empregado para a determinação qualitativa de atividade nos diversos extratos nas etapas iniciais da pesquisa. Devido às simplificações serem muito numerosas e díspares, descrevemos aquela por nós estabelecida e empregada.

Discos de papel Watman 3 MM de aproximadamente 0,6 cm. de diâmetro, previamente esterilizados, foram colocados sobre uma placa de vidro flambada. Adicionamos aos discos com o auxílio de um capilar, um volume dos extratos cujas atividades desejamos provar, suficiente para embeber completamente o disco. Após a secagem, repetimos a operação. Depois da secagem final foram os discos colocados sobre o meio de cultivo, na superfície do qual previamente fizemos uma sementeira por esfregação do microrganismo escolhido. Procedemos então à incubação, à temperatura e tempo conforme o requerido pelos microrganismos utilizados.

Em alguns casos guardamos as placas em geladeira por

tempo variavel, antes da incubação. Isto propiciou que as substâncias antimicrobianas difundissem antes dos microrganismos - testadores iniciassem seu crescimento. Dêste modo pudemos obter halos de inibição mais definidos e de mais fácil leitura. Este procedimento aplicou-se especialmente aos germes de crescimento rápido.

3.2.1.2. MÉTODO DAS ESTRIAS EM AGAR

Este método foi estabelecido por WAKSMAN-REILLY (62). Empregamo-lo com alterações as quais permitiram-nos provar alíquotas até 1,0 ml, bem como expressar os resultados em peso do antibiótico por ml de meio, e não em unidades diluição como no método original.

Uma solução etanólica contendo 10.000 mcg/ml da substância a provar, foi diluída a 1:10 com água esterilizada; obtemos assim uma solução que contém 1.000 mcg, da substância por ml.

Em seguida, em caixas de Petri vertemos alíquotas de 0,1 a 1,0 ml com intervalos de 0,1 ml. Imediatamente adicionamos às placas quantidades de meio de cultura suficiente para termos em tôdas um volume final igual a 10 ml. Obtivemos dêste modo concentrações da substância antimicrobiana, que variam de 10 mcg/ml a 100 mcg/ml com intervalos de 10 mcg cada um. Colocados os meios de cultura nas placas, agitamos bem a fim de obtermos perfeita homogeneização.

Os inóculos, quando se tratam de bactérias e leveduriformes, foram obtidos fazendo-se uma suspensão dos microrganismos em água esterilizada. Para a obtenção de inóculo de fungos em um tubo de cultura colocamos de 15 a 20 pérolas de vidro e esterilizamos o conjunto. Adicionamos ao tubo 2,0 ml de meio de Sabouraud líquido e incolulamos com um pequeno pedaço de micélio. Após incubação por 48 horas, imediatamente antes do uso procedemos a uma agitação vigorosa para obtermos fracionamento do micélio.

A inoculação das caixas e respectivas leituras foram feitas segundo o método original.

3.2.1.3. MÉTODO DA PLACA GRADIENTE

Este método foi descrito por SZIBALSKY (55) e modifica

PPG 77.11.07

do posteriormente por BRAUDE, BANISTER e WRIGHT (7), empregamo-lo com modificações introduzidas por nós. Usamos caixas de Petri de 90 mm de diâmetro interno e 40 ml de meio em duas camadas de 20 ml. A camada inferior foi sempre constituída de nutriente agar e a superior foi constituída de meio específico para o grupo de microrganismos provados em cada caixa, mais um volume de solução de antibiótico, em etanol e Tween 80 a 5% em água, na proporção 1:9, em quantidade suficiente para fornecer concentração de acôrdo com o gradiente desejado. Os inóculos foram obtidos do mesmo modo que no método das estrias em agar.

Devido à insolubilidade da substância em água fêz-se necessário determinar o tempo ótimo para o estabelecimento do gradiente. Isto foi conseguido pela inoculação nas caixas de Petri, 0, 24, 48 e 72 horas após a confecção das mesmas, microrganismos de sensibilidades previamente conhecidas perante a substância. Incubamos e medimos o tamanho das estrias. Tomamos como tempo ótimo, o das caixas nas quais os tamanhos das estrias concordaram com os tamanhos calculados a partir da sensibilidade dos microrganismos inoculados.

As medidas foram feitas superpondo-se as caixas sôbre um papel milimetrado.

3.2.1.4. DETERMINAÇÃO DA MORTALIDADE PERCENTUAL

Para a determinação da mortalidade percentual usamos o processo rotineiro de semeadura e contagem em caixas de Petri. Comparamos o crescimento observado nas caixas que continham 300 mcg da substância antibiótica por ml de meio, com o crescimento das caixas testemunhas, tendo-se semeado em ambos os tratamentos, número igual de células ou esporos. Os tratamentos foram conduzidos em triplicata e os resultados interpretados estatisticamente através da análise da variância com aplicação do teste Téta (6), êste último forneceu-nos a significância estatística do efeito do antibiótico. O êrro residual usado no cálculo do teste, foi o observado entre as repetições. Antes de analisados os dados foram transformados em variáveis contínuas usando-se a fórmula:

$$x_1 = \sqrt{x + \frac{1}{2}} \quad \text{onde } x \text{ é uma contagem (53)}$$

3.2.2. ESTUDO PRELIMINAR DA ATIVIDADE

Devido à natureza desconhecida da substância em estudo

4977/11/07

não foi possível de antemão estabelecermos métodos fitoquímicos a serem aplicados no trabalho. Assim lançamos mão de processo geral para a detecção de antimicrobianos de vegetais conforme é usado nos laboratórios do Instituto de Antibióticos da Universidade de Recife.

3.2.2.1. PREPARO DA AMOSTRA E EXTRAÇÃO

Uma parte da madeira sem prévia secagem foi transformada em serragem; pesamos cinco porções de 5 g que foram distribuídas em frascos Erlenmeyer de 100 ml. Adicionamos a cada um dos frascos um dos cinco solvente abaixo relacionados:

- Acetona
- Metanol
- Água destilada
- Água destilada pH 8,0
- Água destilada pH 2,0

Acrescentamos volume de solvente suficiente para embeber totalmente a serragem e sobrar, após o que os frascos foram tapados e as amostras assim preparadas foram submetidas a agitação por duas horas. Finda a agitação filtramos em papel e guardamos os filtrados em geladeira, até o momento de usá-los.

3.2.2.2. PROVA DE ATIVIDADE DOS EXTRATOS PRELIMINARES

As provas foram executadas segundo o método dos discos de papel de filtro descrito em 3.2.1.1.

3.2.2.3 PROVA DE TERMOESTABILIDADE

A esta prova foram submetidos os extratos que mostraram atividade na prova anterior, tendo sido utilizados somente os microrganismos que se mostraram sensíveis.

Alíquotas de 2,0 ml dos extratos ativos foram colocados em tubo de ensaio e adicionadas de igual volume de água destilada após marcar na parede do tubo a altura alcançada pela alíquota inicial. Em seguida acertamos o pH aos valores 9,0; 6,0 e 2,0 com HCl 10% e NaOH 10%.

Paralelamente outras alíquotas de 2,0 ml foram acertadas a pH 9,0, 6,0 e 2,0 sem receberem água. Estas alíquotas assim preparadas eram deixadas a temperatura ambiente.

4977/11ho

O primeiro grupo de alíquotas foi aquecido em banho de água em ebulição por 30 minutos. Tomamos a precaução de adicionar água a medida que a solução evaporava evitando-se a secagem completa.

Próximo ao fim do período deixamos evaporar a solução até abaixo da marca feita nos tubos, acertamos então o pH de todas as soluções ao valor 6,0 e completamos o volume até a marca das paredes com o solvente apropriado. Nas soluções que não sofreram tratamento térmico o pH também foi acertado a 6,0. Os extratos assim tratados foram submetidos a prova de atividade pelo método dos discos.

3.2.3. EXTRAÇÃO PARA OBTENÇÃO DA SUBSTÂNCIA ANTIMICROBIANA

Com base nos experimentos preliminares anteriores, procedemos à extração da substância antimicrobiana em quantidades suficientes para novas pesquisas.

Desde que procurávamos isolar uma substância cuja natureza química era desconhecida, não pudemos escolher "a priori" um dos métodos fitoquímicos já estabelecidos. Trabalhamos assim com uma série de solventes de polaridade crescente, na extração de antimicrobiano. Esta série era constituída dos seguintes solventes:

- 1 - Éter de petróleo - fração 30-60°C
- 2 - Benzeno
- 3 - Acetato de etila

O éter de petróleo mostrou-se mais apropriado, seu resíduo era sólido, pouco colorido, ativo e apresentou cristalização incipiente.

3.2.3.1. PREPARO DA AMOSTRA E EXTRAÇÃO

A madeira transformada em serragem, num total de 1.500g foi transferida para balão de 5 litros e adicionada de éter de petróleo em excesso. Após vedação da boca, o balão foi submetido à agitação em agitador rotatório, por 2 horas. Findo esse período filtramos a vácuo em funil sintetizado G-3 e lavamos a serragem com 200 - 250 ml de solvente fresco. Fizemos novas extrações e filtrações seguindo a mesma marcha, num total de quinze.

O filtrado de cada extração foi transferido para balão

48977, 11/10

e evaporado a vácuo em banho de água 28-30°C. Os resíduos de consistência cerosa, cor amarelo palha e odor característico, foram retomados individualmente em pequeno volume de benzeno, transferidos para balão de 250 ml e o solvente eliminado sob vácuo a 28-30°C.

3.2.3.2. PROVA DE ATIVIDADE DOS RESÍDUOS BRUTOS DOS EXTRATOS

A prova de atividade foi feita nos resíduos adotando-se o método das estrias em agar modificado, como foi descrito em 3.2.1.2.

3.2.4. OBTENÇÃO DA SUBSTÂNCIA PURA E CRISTALINA

Constatada a possibilidade de obtenção da substância cristalina diretamente do resíduo sem purificações, tentamos a cristalização.

3.2.4.1. CRISTALIZAÇÃO

Tomamos aproximadamente 150 mcg de cada um dos resíduos transferimos para balões de 100 ml e dissolvemos no mínimo volume de acetona possível. Evaporou-se a vácuo e solvente. Em seguida os balões foram levados ao refrigerador e após 72 horas os resíduos cristalizaram com exceção dos n.ºs. 14 e 15 que só apresentaram cristalização após mais um período de 48 horas à temperatura ambiente.

3.2.4.2. PURIFICAÇÃO

Todos os resíduos foram reunidos e dissolvidos no mínimo volume de acetona. Esta solução foi concentrada a vácuo até turvação (solução A), tendo a mesma sido deixada em refrigerador por 18 horas. Após este período foi a solução centrifugada a 3.000 rpm por 2 minutos, obtendo-se um sedimento (precipitado A) que foi transferido para balão e seco a vácuo tendo-se determinado então sua atividade pelo método das estrias em agar. No "precipitado A" notamos quantidade razoável de poeira microscópica de madeira e não houve indícios de cristais, em vista disso, foi o mesmo descartado.

Ao sobrenadante do "precipitado A" juntamos éter de petróleo fração 30-60°C até turvação permanente. Esta nova solução

4977, 11.07

- 15 -

denominada "B" foi deixada em geladeira por 18 horas, findas as quais obtivemos separação de fase oleosa. Em vista disso, todo o volume líquido foi de novo totalmente evaporado a vácuo em banho de 28-30°C, até resíduo sêco.

Após provas preliminares, escolhemos benzeno e éter de petróleo como solventes mais apropriados para a cristalização. A substância foi purificada por sucessivas recristalizações desses dois solventes. Depois de tratada por carvão ativo para retenção de matérias corantes, a substância foi de novo cristalizada e sêca em dissecador.

Os cristais obtidos apresentaram-se como palhetas alongadas, esbranquiçadas e cerosas ao tacto. A substância cristalina é solúvel em acetona, metanol, etanol, benzeno e clorofórmio; pouco solúveis em tetracloreto de carbono e insolúveis em água.

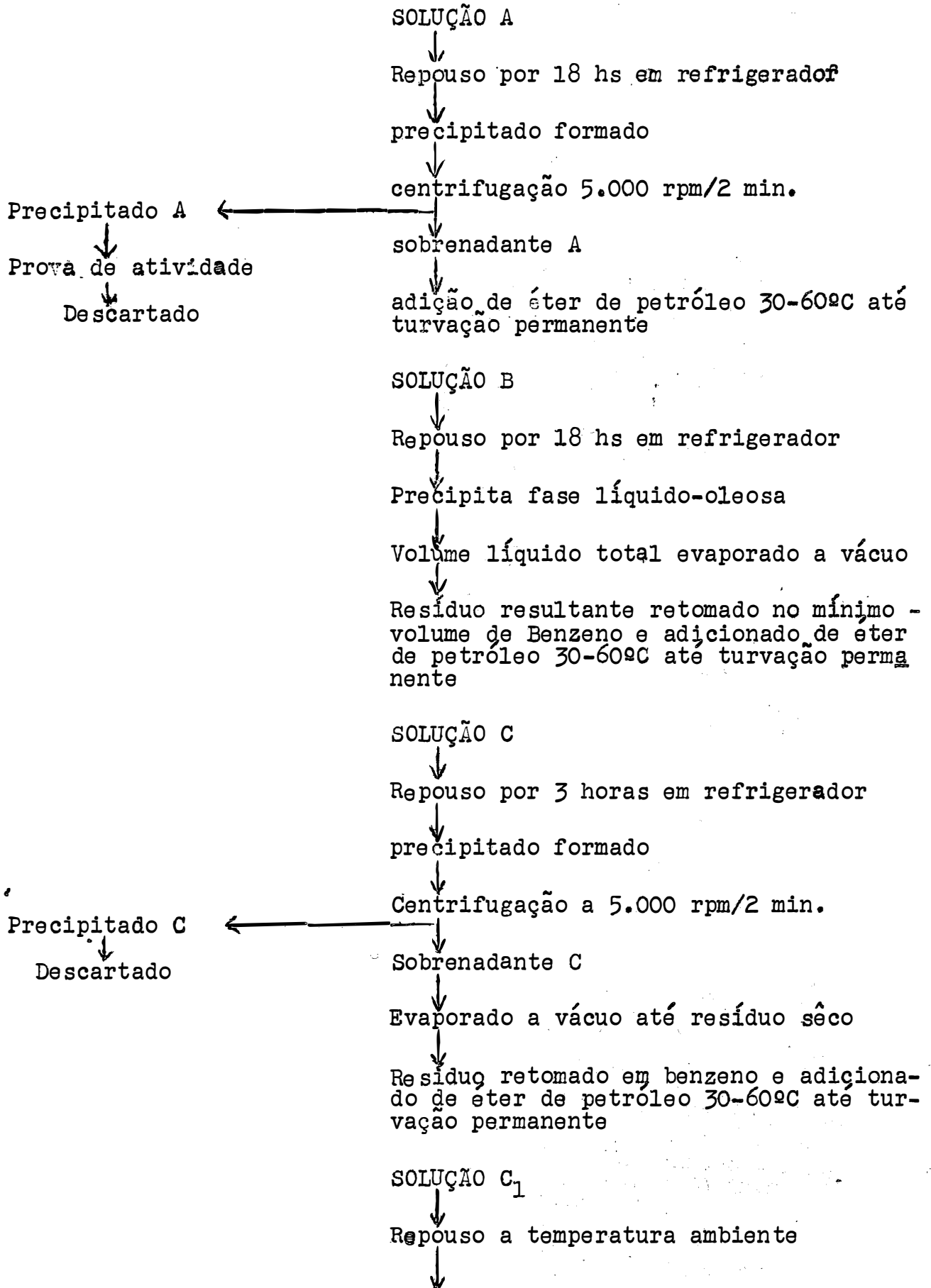
O esquema a seguir esclarece pormenorizadamente os passos seguidos na purificação.

Obtida a substância na forma cristalina, foi a mesma submetida a estudos, que incluíram provas fisicoquímicas e biológicas.

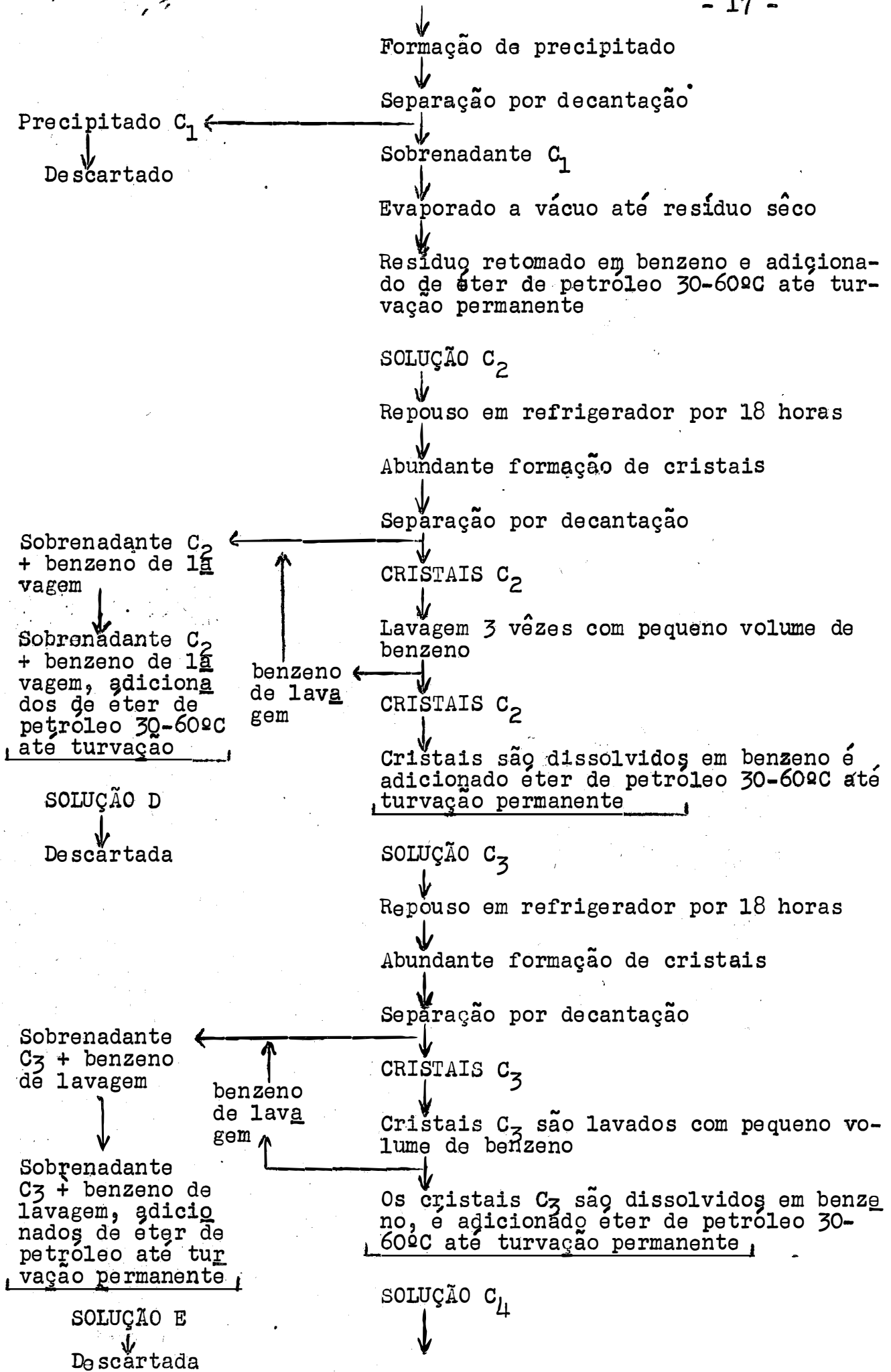
4977.1ho

ESQUEMA DE PURIFICAÇÃO

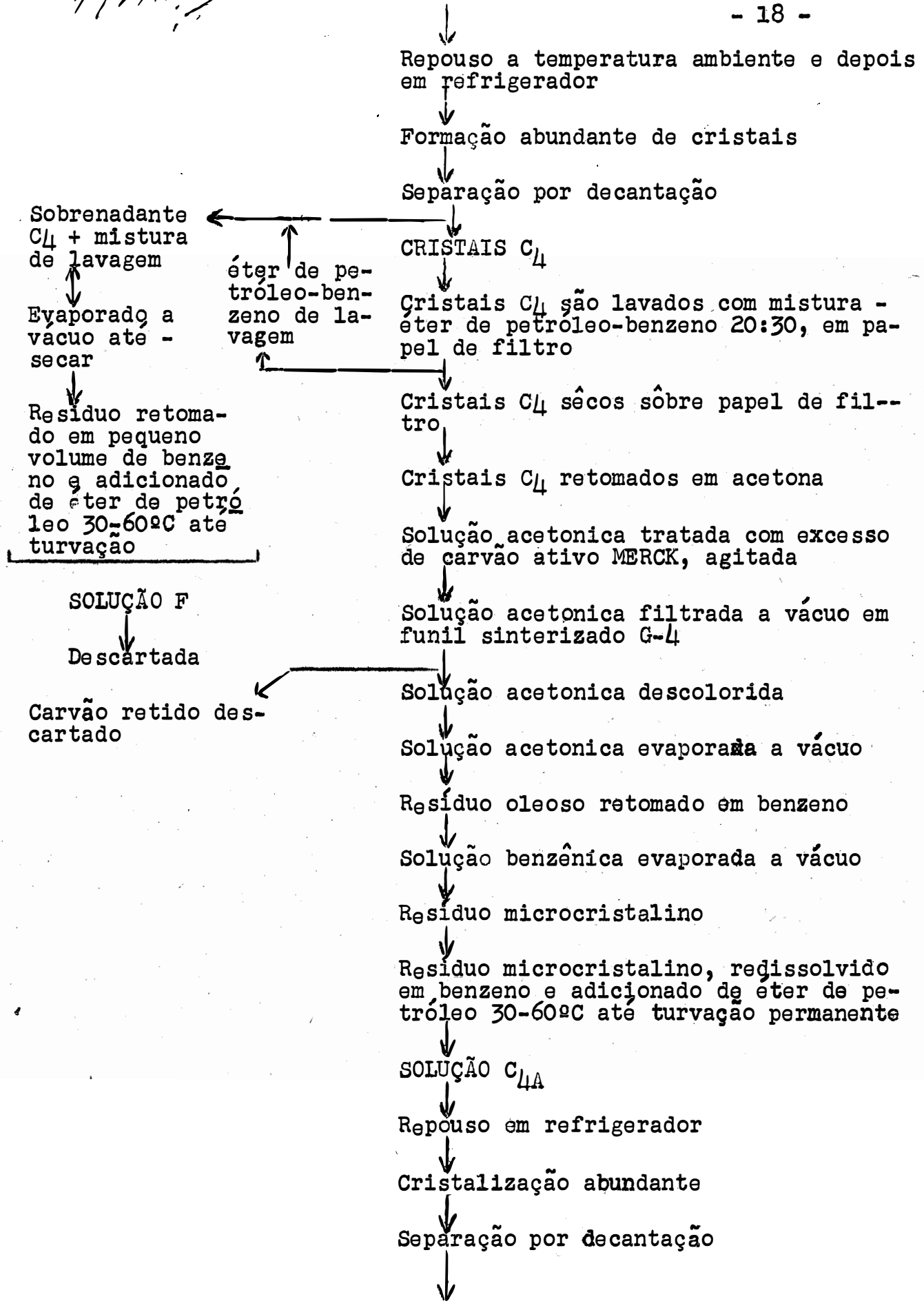
Todos os resíduos solubilizados em acetona e concentrada a solução até turvação permanente



49977, 116

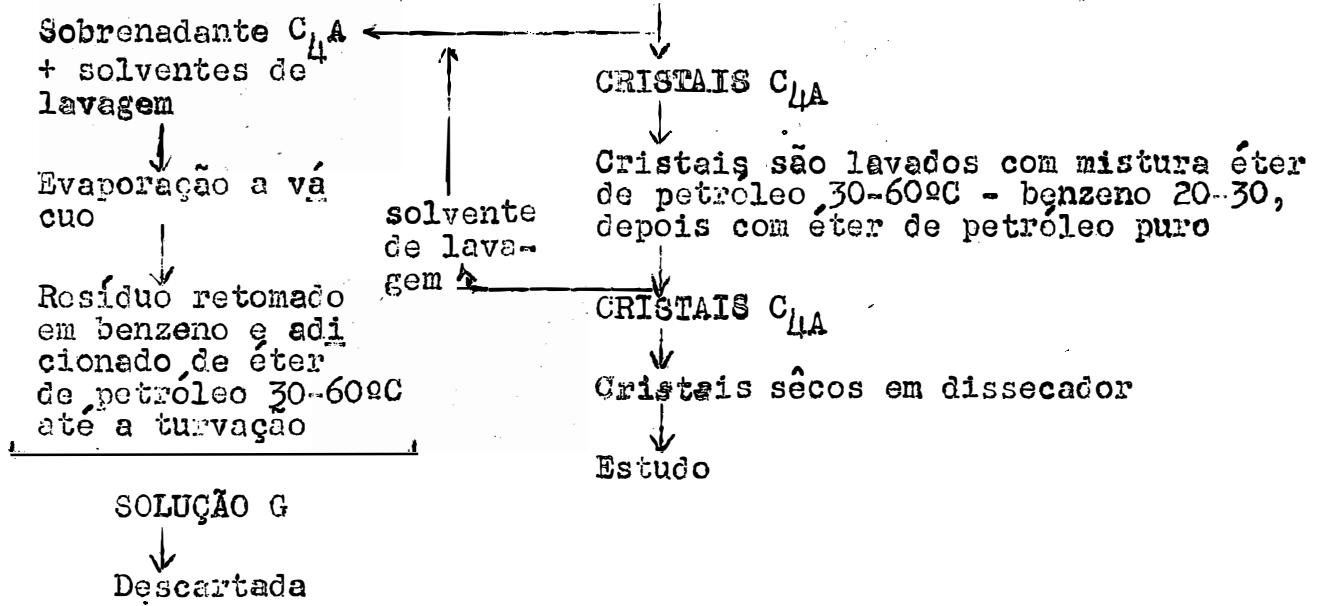


497/1160



4977,1/1/7

- 19 -



3.2.5. PROVAS FÍSICO-QUÍMICAS E BIOLÓGICAS

Estas provas destinam-se a esclarecer as propriedades físico-químicas da substância isolada, bem como estabelecer seu espectro antimicrobiano.

3.2.5.1. PROVAS FÍSICO-QUÍMICAS

Sob este item são agrupadas provas tanto químicas como físicas, devido a sua estreita interdependência.

Ponto de fusão - Determinado em capilar segundo descrição de VOGEL (59).

Peso molecular - Determinado pelo método de Rast, conforme citação de GATTERMANN (21).

Determinação qualitativa de halogênio - Feita pelo método de Beilstein, segundo descrição de SHRINER e FUSON (54).

Determinação qualitativa de nitrogênio e enxofre - Feita pelo método de Lassaigne, segundo citação de SHRINER e FUSON (54).

Determinação quantitativa de carbono e hidrogênio - Feita em aparelho semimicroanalítico Terzano, segundo descrição de CANAL (9).

Espectro ultra violeta - Obtido em espectrofotometro Beckman DU, usando-se como solvente etanol absoluto, contendo 2,5 mg da substância por 100 ml.

Espectro infra-vermelho - Executado pelo prof. W. Manser na Eidig Technische Hochschule, laboratorium für Organische Chemie, Zurique.

Determinação quantitativa de grupos hidroxila - Realizada segundo método descrito por VOGEL (60).

Determinação quantitativa de grupos metoxila - Feita por Alfred Bernhardt no Microanalytisches Laboratorium im Max-Planck Institut für Kohlenforschung, Mulheim.

Provas qualitativas para a função fenól - Foram as seguintes as provas para esta função; reação com cloreto de ferro segundo WESP e BRODE (61); reação de formação de indofenól de Liebermann descrita em PAECH e TRACEY (43); reação com sais de diazonio (43) e reação com ácido nitroso e nitrato de mercúrio de FEIGL (19).

Provas qualitativas para insaturação - Realizadas segundo método descrito por VOGEL (59).

3.2.5.2. PROVAS BIOLÓGICAS

Estas permitiram-nos estabelecer o espectro antimicrobiano da substância isolada.

Prova de atividade pelo método das estrias em agar - Conforme foi descrito em 3.2.1.2.

Prova de atividade pelo método da placa gradiente - Conforme foi descrito em 3.2.1.3.

Prova de atividade pela determinação da mortalidade percentual - Conforme foi descrito em 3.2.1.4.

4. RESULTADOS

4.1. PESQUISAS PRELIMINARES

TABELA I

Atividade dos extratos preliminares

MICROORGANISMOS	E x t r a t o s				
	Nº 1	Nº 2	Nº 3	Nº 4	Nº 5
B. subtilis 9 IAUR	10	10	-	-	-
E. coli IAUR	-	-	-	-	-
Staph. aureus IAUR	14	16	-	-	-
Myc. smegmatis IAUR	13	13	-	-	-
C. albicans IAUR	-	-	-	-	-

Os dados indicam diâmetro da área de inibição em mm.
 Extrato nº 1 acetona; nº 2 metanol; nº 3 água destilada; nº 4 água destilada pH 8,0; nº 5 água destilada pH 2,0.

TABELA II

Termoestabilidade dos extratos preliminares

MICROORGANISMO	T E M P E R A T U R A											
	A m b i e n t e						H ₂ O em ebulição					
	Ext. nº 1			Ext. nº 2			Ext. nº 1			Ext. nº 1		
	pH			pH			pH			pH		
	2,0	6,0	9,0	2,0	6,0	9,0	2,0	6,0	9,0	2,0	6,0	9,0
Staph. aureus IAUR	12	11	13	15	12	11	11	10	10	11	10	10
Bac. subtilis IAUR	11	11	11	12	15	12	14	12	9	10	11	11
Myc. smegmatis IAUR	11	15	15	10	10	10	10	11	10	18	14	15

Os dados indicam diâmetro da área de inibição em mm.

Extrato nº 1 acetona; nº 2 metanol.

4977/ho

4.2. ATIVIDADE DOS RESÍDUOS BRUTOS

TABELA III

Limite das doses inibitórias

RESÍDUO No	M I C R O R G A N S I M O S					
	Bacillus subtilis IAUR	Staph. aureus IAUR	Candida albicans IAUR	Brucella suis IAUR	B. meli- tensis IAUR	Brucella abortus IAUR
1	50-60	60-70	>100	-	-	-
2	50-60	>100	>100	-	-	-
3	40-50	40-50	>100	-	-	-
4	40-50	40-50	>100	-	-	-
5	30-40	30-40	-	-	-	-
6	40-50	50-60	>100	-	-	-
7	40-50	40-50	-	-	-	-
8	60-70	50-60	>100	40-50	30-40	>100
9	40-50	40-50	-	40-50	40-50	-
10	40-50	40-50	-	40-50	30-40	-
11	50-60	50-60	-	30-40	10-20	-
12	50-60	30-40	-	30-40	10-20	-
13	40-50	50-60	-	30-40	10-20	-
14	40-50	50-60	-	20-30	10-20	-
15	50-60	50-60	-	30-40	10-20	-

4.3. ATIVIDADE DO RESÍDUO A

Na tabela a seguir podemos observar os resultados obtidos pelo método das estrias em agar

TABELA IV

Limites das doses inibitórias

MICROORGANISMOS	mcg/ml de meio
Bacillus subtilis - IAUR	70-80
Staphylococcus aureus-IAUR	>100
Brucella suis - IAUR	60-70
Brucella melitensis - IAUR	30-40

4.4. RESULTADO DAS PROVAS FÍSICO-QUÍMICAS E BIOLÓGICAS

Abaixo relacionamos os resultados que nos permitiram o esclarecimento das propriedades físico químicas da substância isolada, bem como a determinação do seu espectro antimicrobiano.

4.4.1. PROVAS FÍSICO-QUÍMICAS

Foram os seguintes os resultados obtidos nas diversas provas realizadas.

Ponto de fusão - 87,2 - 87,6°C

Peso molecular - O Valor obtido foi 285

Determinação qualitativa de halogênio - Os resultados desta prova mostraram-se negativos.

Determinação qualitativa de nitrogênio e enxofre - Os resultados desta prova também foram negativos.

Determinação quantitativa de carbono e hidrogênio - Obtivemos os seguintes valores para cada elemento:

Carbono - 76,80%

Hidrogênio - 7,86%

Por diferença obtivemos para o oxigênio um valor de - 15,34%.

Espectro ultra-violeta - O espectro ultra violeta apresentou pico característico a 275-270_{my} como pode ser observado no gráfico nº 1.

Espectro infra-vermelho - O espectro infra-vermelho - apresentou-nos picos de absorção relacionados com funções locali

4977/ho

zadas e picos relacionados com hidrocarbonetos em geral, como - pode ser observado no gráfico nº 2. Somente levamos em consideração os picos que nos permitiram estudar particularidades da substância isolada.

Determinação quantitativa de grupos hidroxila - Foi obtido um valor de 5,50% de hidroxila na molécula.

Determinação quantitativa de grupos metoxila - O valor determinado para metoxila foi 9,66%.

Provas qualitativas para a função fenól - Foram os seguintes os resultados obtidos nestas provas:

Reação com cloreto de ferro - Positiva, com formação de cor azul intensa.

Reação de indofanól - Positiva, com mudança de cor -- após alcalinização.

Reação com sais de diazonium - Positiva com formação de cor vermelho avinhado.

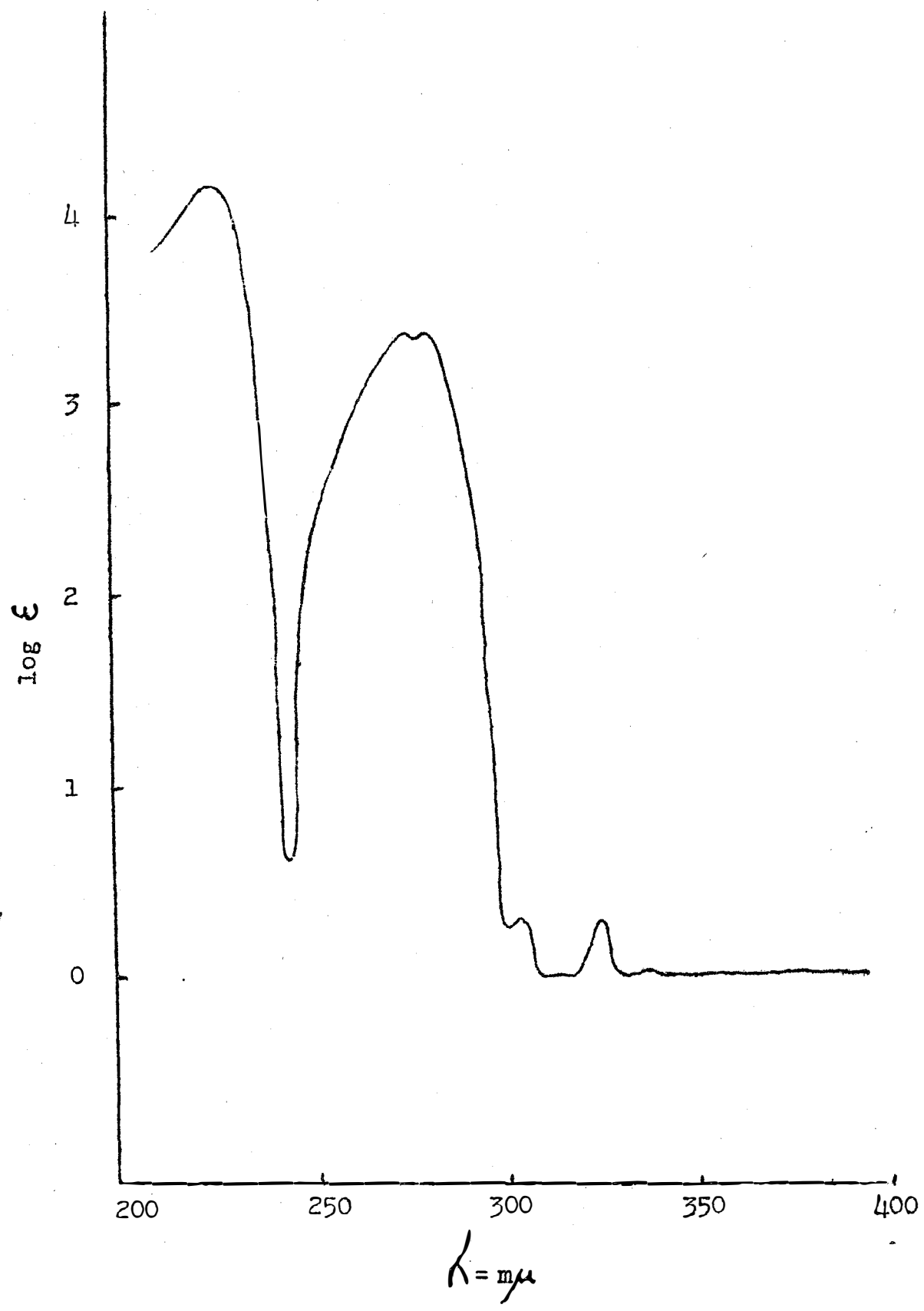
Reação com ácido nitroso e nitrato de mercúrio - Positiva, com formação de cor vermelha.

Provas qualitativas para insaturação - Os resultados obtidos nesta prova foram negativos.

48977.11107

GRÁFICO Nº 1

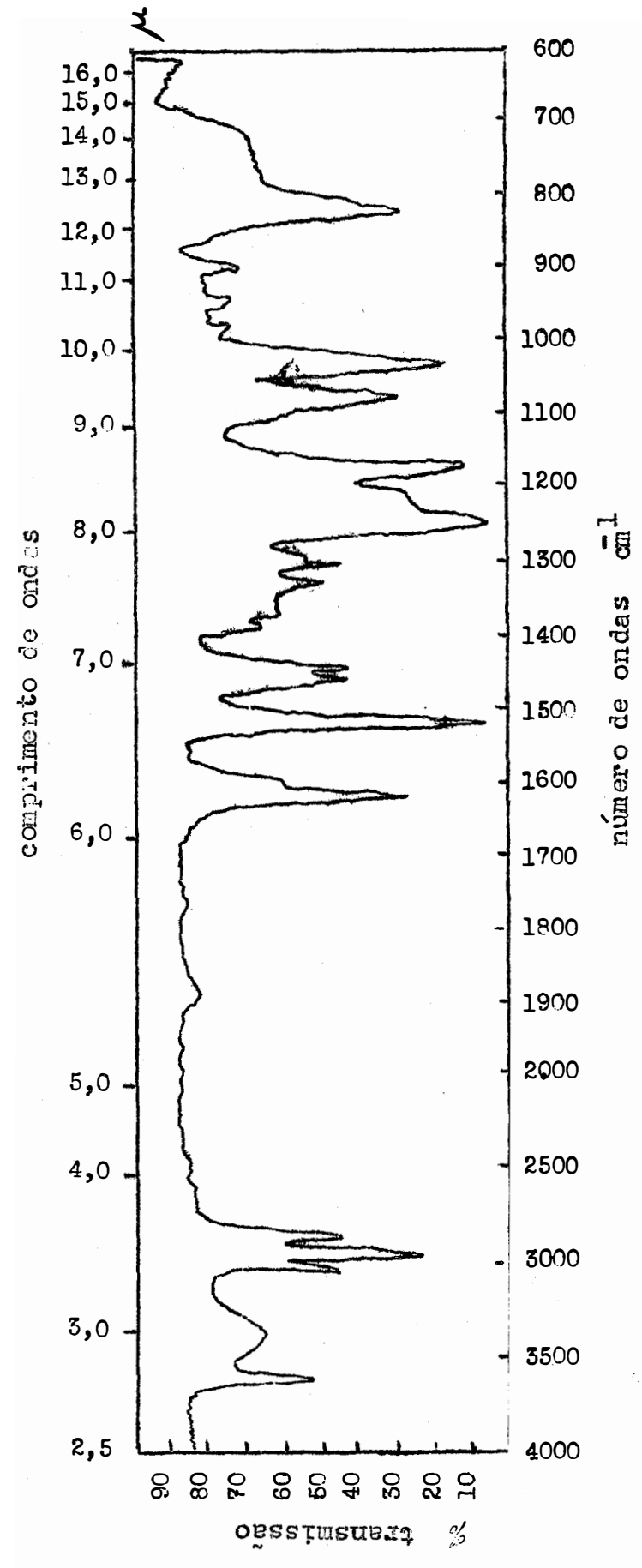
Espectro ultra-violeta



48/977,1/hg

GRÁFICO Nº 2

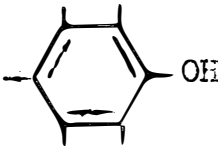

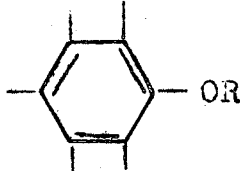
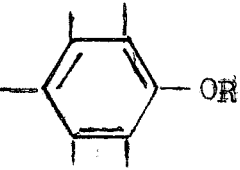
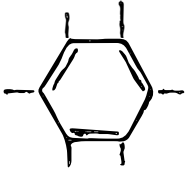
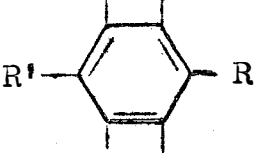
Espectro infra-vermelho



4977,116

TABELA V

Significado dos principais picos de absorção do espectro infravermelho

Número de ondas cm ⁻¹	
3610	
3000	
1615	
1592	
1515	
1245	
1.175	cicloéter
1075	
1033	c - o - c em cicloéter
945	c - o - c
900	
825	

4/9/77/ho

4.4.2. PROVAS BIOLÓGICAS

Sob êste ítem são apresentados os resultados que nós permitiram estabelecer o espectro antimicrobiano da substância isolada

TABELA VI

Limite das doses inibitórias pelo método das estrias em agar

MICROORGANISMOS	DOSE mcg/ml	MEIO	Incubação °C/hs
Bacillus subtilis ATCC 9945	10-20	NA	37/24
Bacillus subtilis ATCC 9789	10-20	NA	37/24
Bacillus subtilis IAL 47-4	10-20	NA	37/24
Bacillus subtilis NM 4	10-20	NA	37/24
Bacillus subtilis 9 IAUR	20-30	NA	37/24
Bacillus anthracis IAUR	10-20	NA	37/24
Bacillus anthracis UNT 28	10-20	NA	37/24
Bacillus mycoides IAUR	20-30	NA	37/24
Bacillus mycoides 1 IAL 51-240	10-20	NA	37/24
Staphylococcus aureus IAUR	20-30	NA	37/24
Staphylococcus aureus 19 IAL 27-23	20-30	NA	37/24
Staphylococcus aureus 37 DPH	20-30	NA	37/24
Staphylococcus aureus 38 DPH	20-30	NA	37/24
Sarcina lutea IAUR	10-20	NA	37/24
Sarcina lutea RSC 10	20-30	NA	37/24
Sarcina lutea ATCC 533	10-20	NA	37/24
Neisseria catharralis IAUR	60-70	NA	37/24
Escherichia coli IAUR	>100	W	37/48
Escherichia coli 7 IAL 39-72	>100	W	37/48
Klebsiella pneumoniae DPH	>100	W	37/48
Klebsiella pneumoniae IAUR	>100	W	37/48
Salmonella typhosa UNT 288	80-90	W	37/48
Salmonella typhosa FMSP	>100	W	37/48
Salmonella typhosa IAUR	>100	W	37/48
Shigella paradysenteriae IAUR	>100	NA	37/24
Mycobacterium phlei IAUR	20-30	NA	37/24
Mycobacterium phlei DM-BS 111	10-20	NA	37/24
Mycobacterium smegmatis IAUR	20-30	NA	37/24
Mycobacterium smegmatis DM-BS 112	10-20	NA	37/24
Mycobacterium tuberculosis var. hominis IAUR	10-20	W	37/24

49977.1ho

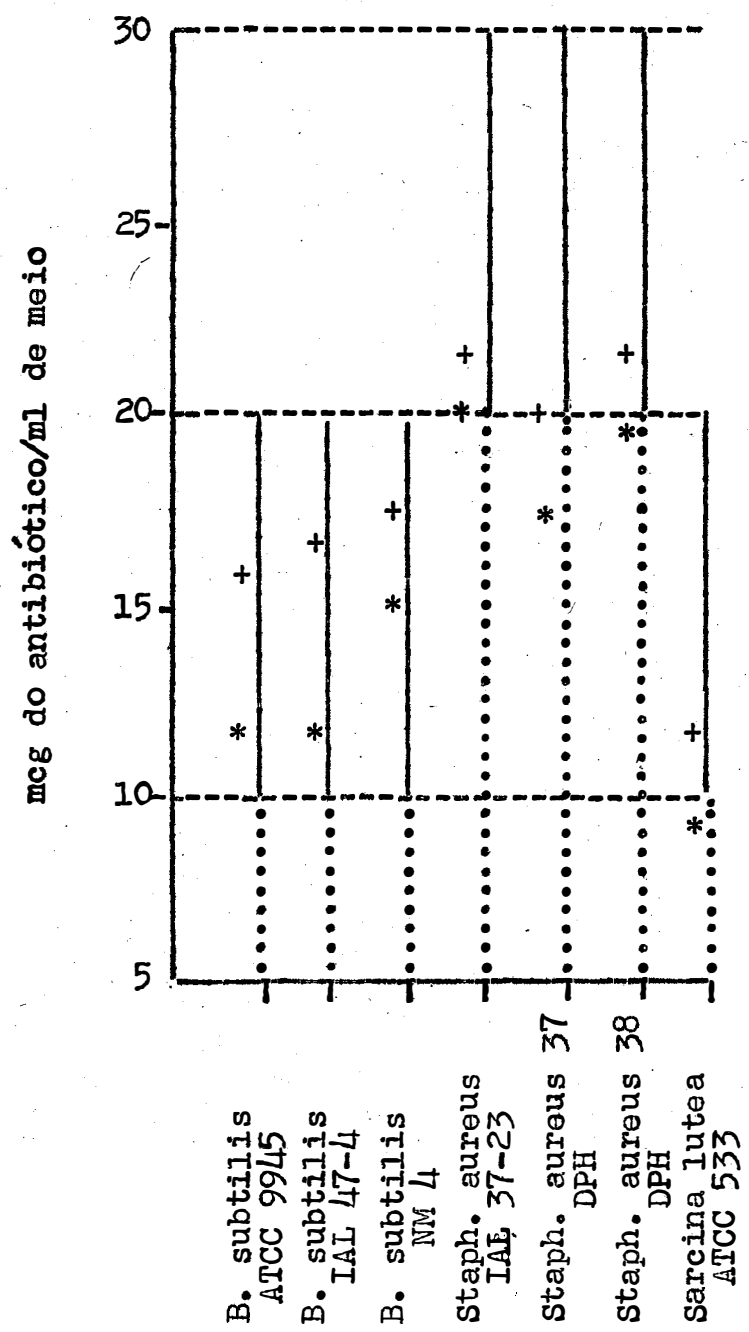
MICROORGANISMOS	DOSE mcg/ml	MEIO	Incubação °C/hs
Nocardia asteroides IAUR	20-30	NA	30/48
Brucella suis IAUR	20-30	NA	37/48
Brucella melitensis IAUR	20-30	NA	37/48
Candida albicans IAUR	>100	M	30/48
Candida tropicalis IAUR	>100	M	30/48
Candida stellatoidea IAUR	>100	M	30/48
Pseudomonas morgani IAUR	>100	NA	37/48
Cryptococcus neoformans IAUR	50-60	NA	37/48
Cryptococcus neoformans FMSB	>100	NA	37/48
Candida albicans IAL 52-76	>100	M	30/48

4/9/77 Filho

GRÁFICO 3

Comparação entre os resultados obtidos pelo método das estrias em agar e pelo método da placa gradiente com 0 e 24 horas de difusão

- * Dose inibitória sem difusão antes da inoculação
- + Dose inibitória com 24 hs. de difusão antes da inoculação
- I Limites de dose inibitória no método das estrias em agar



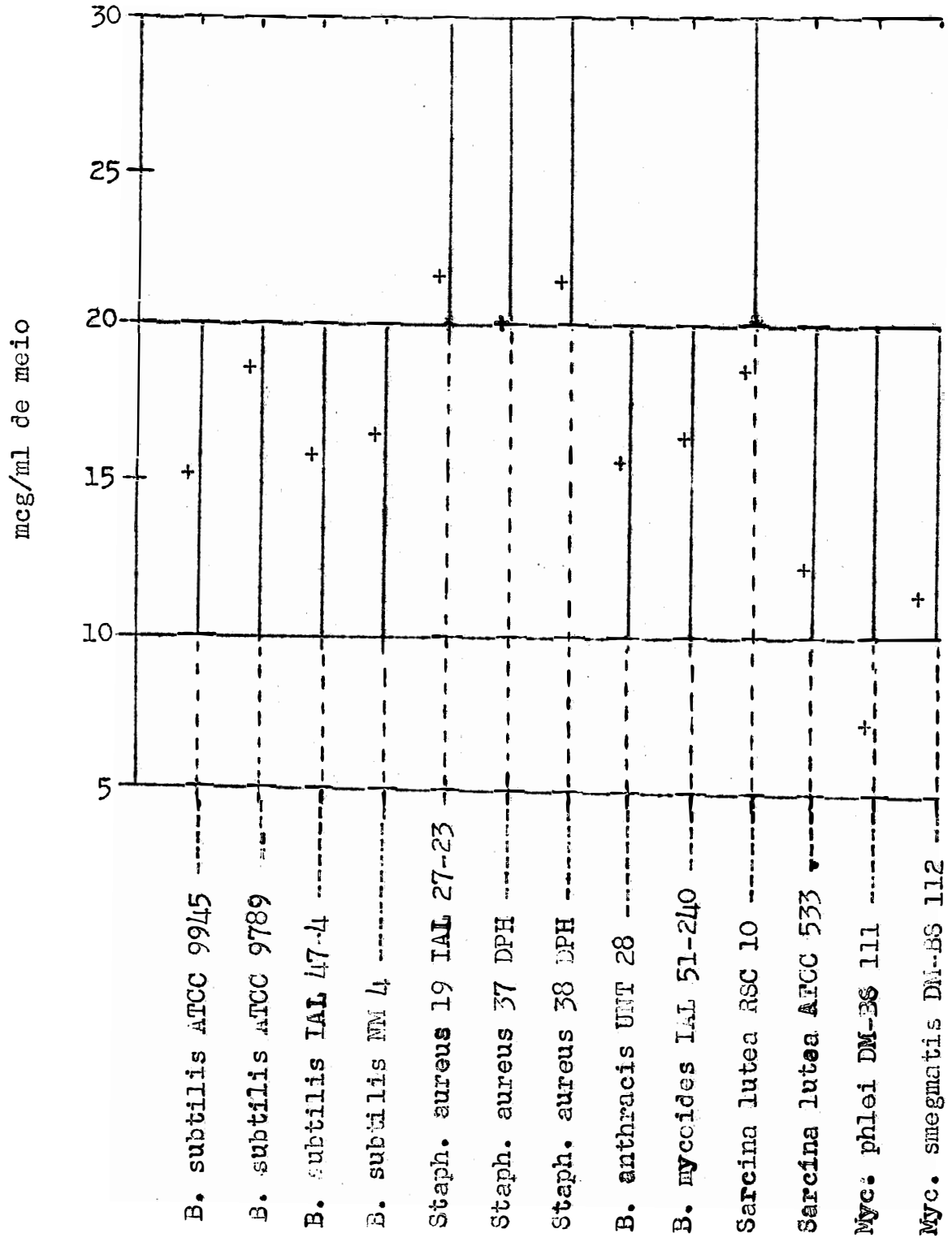
Obs. Nas placas inoculadas após 48 e 72 hs. de difusão, não se observa variação sensível no tamanho das estrias com relação ao tamanho observado nas placas inoculadas após 24 hs. de difusão.

48977/11/7

GRÁFICO 4

Equivalência entre o intervalo de inibição pelo método das estrias em agar e a dose inibitória pelo método da placa gradiente.

| Intervalo de inibição segundo método das estrias em agar
 + Dose inibitória pelo método da placa gradiente



4977/16

TABELA VII

Doses inibitórias pelo método da placa gradiente

MICROORGANISMOS	Dose mcg/ml	Incubação °C/hs	Meio	Pré-incu- bação/hs
Bacillus subtilis ATCC (9945)	15,5	37/24	NA	24
Bacillus subtilis ATCC (9789)	18,3	37/24	NA	24
Bacillus subtilis NM (4)	17,2	37/24	NA	24
Bacillus subtilis IAL (47-4)	16,1	37/24	NA	24
Staphylococcus aureus 19 IAL (27-23)	22,2	37/24	NA	24
Staphylococcus aureus 37 DPH	20,0	37/24	NA	24
Staphylococcus aureus 38 DPH	22,2	37/24	NA	24
Bacillus anthracis UNT (28)	16,1	37/24	NA	24
Bacillus mycoides 1 IAL (51-240)	17,6	37/24	NA	24
Sarcina lutea RSC (10)	18,8	37/24	NA	24
Sarcina lutea ATCC (533)	12,7	37/24	NA	24
Escherichia coli 7 IAL (39-72)	220	37/48	NA	0
Escherichia coli ATCC (8677)	>300	37/48	NA	24
Klebsiella pneumoniae DPH	>300	37/48	NA	24
Salmonella typhosa UNT (288)	78,8	37/48	NA	0
Salmonella typhosa FMSP	180	37/48	NA	0
Mycobacterium phlei DM-BS (111)	7,7	37/24	NA	24
Mycobacterium smegmatis DM-BS (112)	11,6	37/24	NA	24
Candida albicans CNIA 1-12-9	>300	30/24	M	24
Candida albicans FMSP (382)	>300	30/24	M	24
Candida albicans IAL (52-76)	93	30/48	M	24
Candida krusei FMP (422)	>300	30/48	M	24
Candida krusei IOC (2395)	>300	30/24	M	24
Candida krusei IZ (81)	>300	30/24	M	24
Candida parakrusei IBB (48)	>300	30/24	M	24
Candida tropicalis IOC (2892)	>300	30/24	M	24
Candida tropicalis IZ (123)	>300	30/24	M	24
Candida sub-tropicalis IZ-A (174)	>300	30/24	M	24
Candida pseudo-tropicalis ATCC (8659)	>300	30/24	M	24
Candida pseudo-tropicalis IOC (2697)	>300	30/24	M	24
Candida stellatoidea IAC (33)	>300	30/24	M	24
Pseudomonas aeruginosa 3 IAL (48-3)	>300	37/48	NA	0
Cryptococcus neoformans FMSP	140	37/48	NA	0
Aspergillus oryzae ATCC (7252)	>300	30/48	M	0

4/5/77/1102

MICROORGANISMOS	Dose mcg/ml	Incubação °C/hs	Meio	Pré-incu- bação/hs
Penicillium sclerotium KBR (2074)	>300	30/48	M	0
Penicillium citreo-viride ATCC (10425)	>300	30/48	M	0
Aspergillus avenaceus KBR (517)	>300	30/48	M	0
Polyporus cinctatus MB (1683)	>300	30/48	M	0
Fusarium aurantii IBB (115)	>300	30/48	M	24
Fusarium sulphureum ATCC (7642)	>300	30/48	M	24
Fusarium moniliforme ATCC (7809)	>300	30/48	M	24
Sporotrichum anglicum S (496)	>300	30/24	M	0
Sporotrichum gougeroti IFO (5583)	>300	30/24	M	0
Sporotrichum carougeani S (495)	>300	30/24	M	0

9977/69

TABELA VII

Atividade pelo método de mortalidade percentual

MICROORGANISMOS	Incubação hs/°C	Mortalidade %	Significân- cia estatís- tica da morta- lidade %	Desenvolvimento individual das colônias
Candida parakrusei IBB 48	48/30	13,2	*	idêntico em am- bos os tratamen- tos
Candida stellatoi- dea IAC 33	48/30	48,3	*	idêntico em am- bos os tratamen- tos
Candida tropicalis IZ 123	48/30	0	n/s	idêntico em am- bos os tratamen- tos
Candida albicans FMSP 382	48/30	54,0	**	idêntico em am- bos os tratamen- tos
Candida krusei IOC 2395	48/30	100,0	***	-
Candida albicans CNIA 11219	40/30	99,9	***	-
Candida tropicalis IOC 28-92	48/30	59,9	*	Bem menor nas placas que rece- bem antibiótico
Candida krusei IZ 81	48/30	0	n/s	idêntico em am- bos os tratamen- tos
Candida krusei FMP 422	48/30	100,0	*	-
Candida pseudotropi- calis ATCC 8659	48/30	99,8	***	-
Candida subtropica- lis IZ-A 174	48/30	47,6	***	idêntico em am- bos os tratamen- tos
Fusarium aurantii IBB 115	48/30	67,0	***	Bem menor nas placas que rece- bem antibiótico
Fusarium monilifor- me ATCC 7809	48/30	49,9	*	idêntico em am- bos os tratamen- tos
Fusarium sulphureum ATCC 7642	48/30	15,9	n/s	bem menor nas placas que rece- bem antibiótico
Aspergillus avena- ceus KBR 517	48/30	37,0	**	bem menor nas placas que rece- bem antibiótico

4977/ho

MICROORGANISMOS	Incubação hs/°C	Mortalidade %	Significân- cia estatís- tica da mor- talidade %	Desenvolvimento individual das colônias
Aspergillus oryzae ATCC 7252	48/30	82,3	***	Bem menor nas placas que rece- bem antibiótico
Penicillium sclero- tiorum KBR 2074	48/30	54,6	**	idêntico em am- bos os tratamen- tos
Penicillium citreo- viride ATCC 10425	24/30	28,9	*	Bem menor nas placas que rece- bem antibiótico
Candida pseudotro- picalis IOC 2697	48/30	100,0	***	-
Sporotrichum angli- cum S 496	72/30	68,1	**	idêntico em am- bos os tratamen- tos
Sporotrichum gouge- roti IFO 5983	72/30	13,8	**	Bem menor nas placas que rece- bem antibiótico
Sporotrichum carou- geani S 495	48/30	19,2	*	Bem menor nas placas que rece- bem antibiótico
Polyporus cinctatus MB 1683	48/30	40,0	**	Bem menor nas placas que rece- bem antibiótico

n/s = não significativo
 * = significativo a 5%
 ** = significativo a 1%
 *** = significativo a 0,1%

497/1/10

5. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

5.1. PESQUISAS PRELIMINARES

Os resultados das tabelas I e II devem ser encarados do ponto de vista estritamente qualitativo, pois as provas de disco que nos forneceram os resultados nelas tabelados, foram de natureza muito simples. Apesar de sua simplicidade este tipo de prova é indispensável na pesquisa preliminar de atividade antibiótica; sua grande vantagem reside na não necessidade de esterilização dos extratos tratados. Os resultados por nós obtidos - através destas provas, permitiram-nos observar a presença da atividade, bem como a grande estabilidade da mesma em condições agressivas.

A prova de atividade dos resíduos brutos (Tabela III) mostrou-nos a variação da atividade nos emsmos, indicando-nos - também que não estávamos extraindo matéria inerte mesmo nas extrações finais quando a quantidade de resíduo era mínima.

A prova de atividade do resíduo A (Tabela IV) mostrou-nos a inutilidade de considerar o mesmo em posteriores purificações.

5.2. PROVAS FÍSICO-QUÍMICAS

Estas provas forneceram-nos dados importantes para conhecermos detalhes da natureza química da substância em estudo.

O ponto de fusão situou-se entre limites bastante próximos, o que é uma indicação da pureza da substância. O valor 285 encontrados pelo método de RAST é aproximado. Este método admite u'a margem razoável de erro como inerente ao método em si; dêste modo o valor encontrado deve ser considerado em conjunto com outros dados, para o cálculo da fórmula empírica.

Os métodos empregados na determinação de halogênio, nitrogênio e enxôfre, embora qualitativos são muitos sensíveis; - os resultados negativos obtidos são provas que a substância estudada não possui êsses elementos.

Assim, consideramos que a substância possui somente carbono, hidrogênio e oxigênio. Os valores obtidos, C = 76,80% e H = 7,86%, sugerem a presença de insaturações ou anéis aromáticos na molécula, ou ambas as coisas simultaneamente.

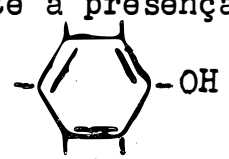
11977/1/ho

O espectro ultra-violeta apresentou a 275-280 m μ um - pico que é característico de aromático, mas não exclui a possibi- lidade da presença de duplas ligações conjugadas. O espectro - infra-vermelho forneceu-nos indicações em maior número e mais definidas.

Está estabelecida que em compostos contendo apenas car- bono, hidrogênio e oxigênio, os picos definidos acima de 1.350 cm $^{-1}$ estão associados à vibrações de grupos localizados.

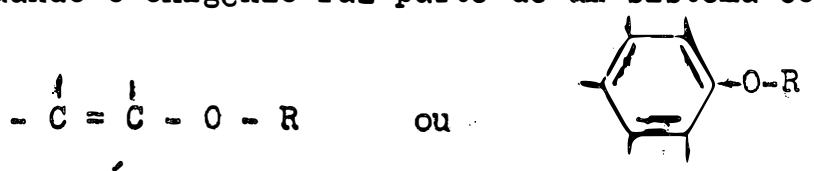
O pico associado a vibrações do grupo OH livre locali- za-se a 3.636 cm $^{-1}$ em alcoóis primários e esta posição é relati- vamente insensível à variações estruturais. Nos alcoóis secun- dários, terciários e fenóis o pico de absorção cai para frequên- cias menores, sendo que para o caso de fenóis éle localiza-se a 3.611 cm $^{-1}$. No espectro da substância em estudo o pico a 3.610 cm $^{-1}$ indicou a presença de OH fenólico, fato comprovado pelas - provas qualitativas para essa função.

Dêste modo é evidente a presença do seguinte grupo de átomos na molécula:

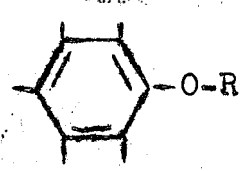


A presença de grupo aromático ainda é evidenciada pelos picos a 3.000 cm $^{-1}$, 1.615 cm $^{-1}$, 1.515 cm $^{-1}$ e 900 cm $^{-1}$. Os picos 1.615 cm $^{-1}$ e 1.592 cm $^{-1}$ situam-se na faixa de absorção caracte- rística dos aromáticos, sendo o último particularmente útil na distinção entre anéis aromáticos e duplas ligações conjugadas.

Os picos a 1.245 cm $^{-1}$ e 1.075 cm $^{-1}$ estão associados res- pectivamente a vibrações assimétricas e simétricas da ligação - C - O - C quando o oxigênio faz parte de um sistema conjugado do tipo



Contudo éteres de primeiro tipo apresentam absorção ca- racterística a cêrca 3.100 cm $^{-1}$, oriunda da ligação C-H (em gru- po etilênico) perturbada pela presença do oxigênio vicinal; a - inexistência de pico na região citada levou-nos a considerar a presença do seguinte grupo na molécula:



4/9/77/11/07

O pico a 1.175 cm^{-1} origina-se de vibrações assimétricas de anel em ciclo éter. O pico 1.033 cm^{-1} é devido a ligações etérica em cicloéter.

O pico a 945 cm^{-1} origina-se da ligação C - O - C em éteres de cadeia aberta.

O pico a 825 cm^{-1} é devido à presença na molécula de aromático dissubstituído em 1-4, os aromáticos trissubstituídos - também originam absorção entre $825-805 \text{ cm}^{-1}$ porém apresentam outro pico característico entre $870-855 \text{ cm}^{-1}$ inexistente no espectro em discussão.

Com base nos resultados qualitativos e quantitativos obtidos, passamos ao estabelecimento de uma fórmula empírica e ao esclarecimento de partes estruturais da molécula.

Para o estabelecimento da fórmula empírica partimos dos seguintes dados: OH%, OCH_3 %, C%, H%, O% e peso molecular.

A massa de um grupo OH é igual a 17, analiticamente obtivemos um valor 5,50% na substância. Para ter no mínimo um grupo hidroxila na molécula, a substância deve ter um peso molecular mínimo de:

$$\begin{array}{rcl} 100 & 5,50 & \\ \text{P.M.}_{\text{min.}} & 17,0 & \approx 309 \end{array}$$

A massa de um grupo OCH_3 é 31, analiticamente foi determinado o valor 9,66% na substância. Pelo mesmo raciocínio temos:

$$\begin{array}{rcl} 100 & 9,66 & \\ \text{P.M.}_{\text{min.}} & 31,0 & \approx 320 \end{array}$$

Assim, temos dois valores aproximados do peso molecular mínimo calculados a partir das percentagens de hidroxila e metoxila, sendo a média 314,5 por aproximação 315. Todas as moléculas que apresentem as mesmas percentagens de hidroxila e metoxila seriam admissíveis, porém seus pesos moleculares seriam múltiplos dos mínimos calculados tantas vezes quantas fôssem as hidroxilas ou metoxilas presentes na molécula.

49977/110

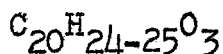
$$PM = PM_{\text{min. calc.}} \times n$$

n = número de metoxilas ou hidroxilas na molécula. O peso molecular determinado limita as possibilidades estabelecendo n= 1.

Calculamos o número de átomos de carbono, hidrogênio e oxigênio possíveis aos valores calculados e na média, com base nos valores percentuais encontrados em análise.

PM calc.	E L E M E N T O		
	C	H	O
309	19,77 ~ 20	24,28 ~ 24	2,96 ~ 3
320	20,48 ~ 20	25,15 ~ 25	3,06 ~ 3
315	20,20 ~ 20	24,75 ~ 25	3,02 ~ 3

Os valores calculados estabelecem que a substância tem na molécula vinte átomos de carbono, três átomos de oxigênio e vinte e quatro ou vinte e cinco átomos de hidrogênio.



Tal possibilidade admite dois pesos moleculares, 312 e 313, comparando os valores percentuais calculados em tais pesos moleculares com os valores encontrados em análise temos:

V A L O R E S	E L E M E N T O				
	C%	H%	O%	OH%	OCH ₃ %
Encontrados em análise	76,80	7,86	15,34	5,50	9,66
Calculados para PM = 312	76,92	7,69	15,38	5,44	9,92
Calculados para PM = 313	76,67	7,66	15,33	5,33	9,90

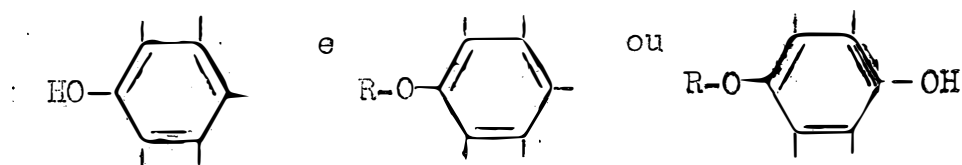
Pelo quadro acima verificamos que os valores calculados situam-se muito próximos dos valores determinados analiticamente.

Baseados nos dados obtidos pudemos esclarecer algumas particularidades estruturais

Em uma substância que possui a proporção encontrada de

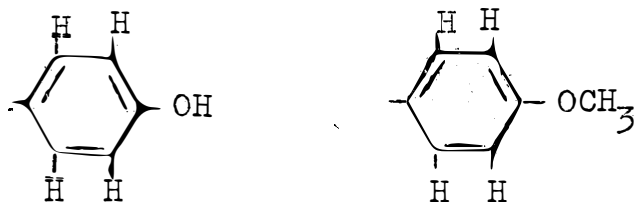
carbono e hidrogênio, e não possui duplas ligações olefínicas - como ficou evidenciado, devemos admitir a presença de dois núcleos aromáticos.

Existem na molécula três átomos de oxigênio que fazem parte dos seguintes grupos:



Uma vez que o espectro infra-vermelho estabelece a presença de cicloéter, o terceiro átomo de oxigênio fica localizado: portanto $R = CH_3$ nos grupos acima.

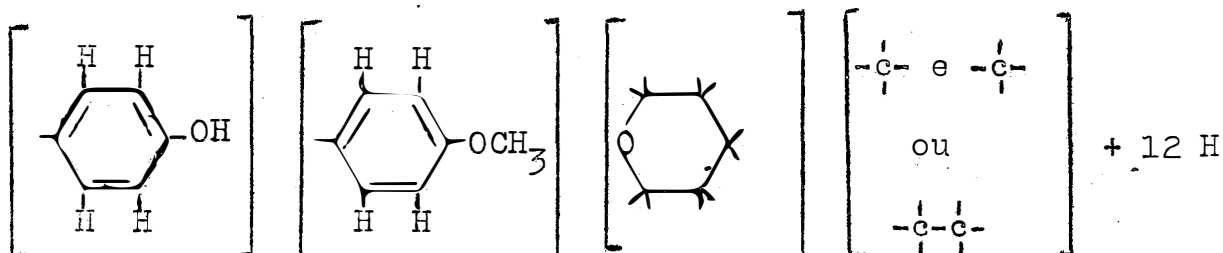
Em vista do pico de absorção a 825 cm^{-1} excluir compostos aromáticos trissubstituídos e dissustituídos que não sejam nas posições 1-4, fica evidenciado que a hidroxila e a metoxila presentes na molécula da substância estão ligadas a núcleos aromáticos diferentes. Quatro das cinco restantes posições estão ocupados por átomos de hidrogênio, pela quinta posição, "para", os núcleos aromáticos ligam-se ao restante da molécula. Deste modo fazem parte da molécula os seguintes grupos de átomos:



Estes grupos exigem 13 átomos de carbono, 12 de hidrogênio e 2 de oxigênio; o restante da molécula é constituído, portanto, de 7 átomos de carbono, 12 de hidrogênio e 1 de oxigênio.

A presença do cicloéter justifica a fórmula $C_{20}H_{24}O_3$ - qualquer que seja o número de átomos de carbono no anel (de 2 a 7 átomos), porém o pico a 1.033 cm^{-1} é característico do tetrahidropirano.

Deste modo propomos como partes da estrutura da molécula os seguintes grupos:



5.3. PROVAS BIOLÓGICAS

O método das estrias em agar, que utilizamos inicialmente para a determinação do espectro antimicrobiano, oferece vantagens marcantes sobre os demais métodos empregados com o mesmo fito. Permite-nos ele trabalhar com amostras não esterilizadas o que o situa em posição vantajosa com relação aos métodos de diluição em série e turbidimétrico; estes exigem esterilização absoluta e que pode acarretar destruição de parte ou toda a atividade pelo calor ou perdas por absorção quanto a esterilização é feita em filtros tipo Seitz ou Berkfield.

Outra vantagem apresentada é não necessitar de padrões nem sofrer grandes limitações devidas à maior ou menor hidrossolubilidade da substância, como sucede no método dos cilindros; além de mais podemos provar vários microrganismos de uma só vez o que não é possível em nenhum dos outros métodos.

Os resultados obtidos pelo método em questão (TABELA - VI) forneceram-nos uma idéia básica do espectro antimicrobiano e serviram-nos também como padrões para provar a viabilidade do método da placa gradiente bem como a necessidade de um período prévio de difusão antes das inoculações.

Os resultados mostram a atividade antimicrobiana da substância isolada, contra microrganismos gram positivos, gram negativos, ácidos resistentes e outros.

Devido à pequena quantidade de substância em nosso poder, limitamos as pesquisas por este método a uma dose máxima de 100 mcg/ml, pois limites maiores exigiriam quantidades relativamente elevadas da substância.

A escassez da substância levou-nos a empregar o método da placa gradiente na determinação das doses inibitórias. Este método apresenta todas as vantagens do método das estrias e mais uma, que é a possibilidade de obtermos numa única caixa uma variação contínua das doses em limites tão amplos quanto se deseje, com pequena quantidade de antibiótico.

Escolhemos sempre gradientes que nos fornecessem leituras de no mínimo 1,0 cm das paredes verticais das placas, a fim de evitarmos erros causados pelo menisco formado ao colocarmos meio fundido nas placas. Tomando esta precaução e escolhendo-se placas de fundo plano, a exatidão obtida foi superior à conseguida

1977/1/10

da pelo método das estrias, uma vez que as doses inibitórias -- são expressas em valores mais definidos.

Em vista da substância ser insolúvel em água tivemos - necessidade de determinar o tempo ótimo para o estabelecimento do gradiente. Isto conseguiu-se procedendo-se conforme foi descrito em 3.º 1.3. No gráfico nº 3 podemos verificar que os resultados são mais concordantes quando os microrganismos são inoculados 24 horas após a confecção da placa; em vista disso tomamos esse tempo como ótimo.

Os microrganismos que necessitam de 48 horas para apresentarem crescimento possível de ser medido, foram inoculados - em seguida à confecção das placas, embora a inoculação após 24 horas de difusão não alterasse de modo sensível os resultados - das leituras.

Pelo gráfico nº 4 podemos verificar a equivalência dos dois processos na determinação da atividade da substância. A discordância observada com relação à Sarcina lutea RSC 10 e ao Mycobacterium phlei DM-BS 111 não invalidam a correspondência entre os métodos, podendo ser atribuídas às imperfeições inerentes ao dois métodos.

Pela tabela VII podemos observar que grande número de microrganismos mostram-se resistentes a doses até 300 mcg/ml, - contudo, é importante frisar que vários dos mesmos apresentam - crescimento menor e irregular na região do gradiente onde a concentração é máxima.

Este método, como o das estrias exige supressão total - do crescimento dos microrganismos para correta leitura e consequente determinação da dose inibitória. Tal não sucedendo o método mostra-se falho.

Baseados na observação do menor crescimento de alguns - microrganismos na região de maior concentração do gradiente, lançamos mão da determinação da mortalidade percentual como terceiro meio de provar a atividade da substância em estudo.

Esta prova é a única que se presta à avaliação da atividade antibiótica, quando esta se manifesta pela supressão apenas parcial do crescimento dos microrganismos testados. Não determina ela a dose inibitória, propriamente, mas sim a sensibilidade, mesmo parcial, dos organismos testados perante doses pré-fixadas.

Utilizamos apenas a dose de 300 mcg/ml e a necessidade de repetições de cada tratamento foi a causa de não utilizarmos doses intermediárias em vista da pequena quantidade de substância disponível.

Como podemos verificar pela tabela VIII, com exceção - de Candida tropicalis IZ-123; Candida krusei IZ-81 e Fusarium sulphureum ATCC -7642; todos os demais microrganismos testados apresentam alguma sensibilidade.

Temos casos em que apesar de alta percentagem de mortalidade a significância é pequena. O caso mais típico é o da - Candida krusei FMP-422 na qual observamos mortalidade de 100%, porém a significância é ao nível de 5%; isto explica-se pelo - fato do coeficiente de variação dentro do tratamento ser relativamente alto com relação ao número de células semeadas.

O antibiótico tem ação específica para cada microrganismo, não se fazendo sentir sua ação igualmente em todos microrganismos de um mesmo grupo.

Durante o desenvolver do nosso trabalho foi repetidamente observado que em vários microrganismos, as colônias sobreviventes expostas ao agente antibiótico apresentaram-se menores que o tamanho usual das colônias nas placas testemunhas. Isto sugere que provavelmente seriam mutantes deficientes respiratórios descritos por EPHRUSSI (15) em leveduras, estas observações sugerem que resultados mais positivos podem ser obtidos utilizando-se linhagens de microrganismos que não dão origem a mutantes deficientes respiratórios. Esta possibilidade não foi explorada, mas nossos resultados estão aproximados dos encontrados por MOAT e colaboradores (39) com linhagens de leveduras, funcionando o antibiótico como agente seletivo e não mutagênico.

49/7/11/07

6. CONCLUSÕES

a) - Da espécie estudada, Centrolobium robustum Benth. foi isolada uma substância antibiótica de ação ampla.

b) - A ação antibiótica da substância isolada, faz-se sentir contra bactérias gram negativas, gram positivas e ácido resistentes; fungos fitopatógenos, patógenos humanos e leveduras. Dentre os microrganismos testados as bactérias apresentam de um modo geral, maior sensibilidade.

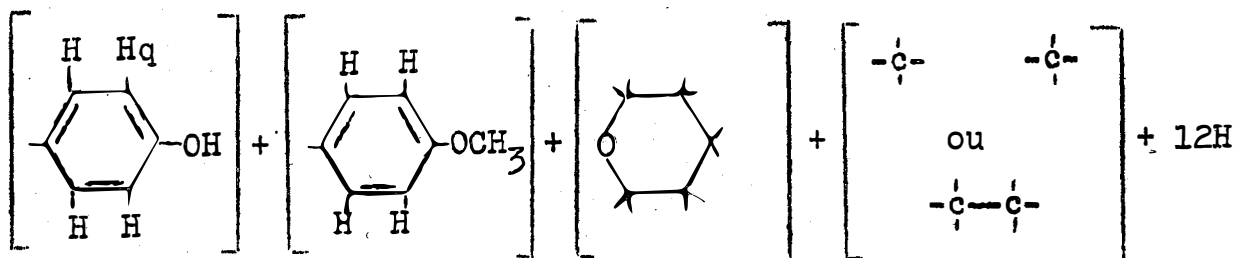
c) - O antibiótico provoca em alguns microrganismos, o aparecimento de colônias menos desenvolvidas que as normais. Isto sugere que tais colônias menores sejam mutantes deficientes respiratórios, agindo o antibiótico como seletivo e não mutagênico. Resultados mais positivos seriam provavelmente obtidos, empregando-se cepas de microrganismos que não dêem origem a mutantes com alta frequência.

d) - A substância antibiótica isolada é estável tanto em pH ácido como alcalino. Apresenta-se quando pura, como palhetas alongadas esbranquiçadas, cerósas ao tato. É solúvel em metanol, etanol, acetona, clorofórmio e benzeno; pouco solúvel em tetracloreto de carbono e éter de petróleo; insolúvel em água.

e) - A substância antibiótica isolada, é composta apenas de carbono, hidrogênio e oxigênio nas seguintes percentagens 76,80; 7,86; 15,34, respectivamente. O peso molecular é 312 e a fórmula empírica $C_{20}H_{24}O_3$.

f) - Na sua estrutura o antibiótico apresenta dois núcleos aromáticos, um cicloéter, um grupo hidroxila fenólico e - um grupo metoxila.

g) - São propostas as seguintes partes estruturais como constituintes da molécula:



7. RESUMO

A grande escassez de informações sôbre a presença de antimicrobianos em madeiras de essências nacionais, levou-nos a estudar êste problema com relação à espécie Centrolobium robustum.

Segundo métodos descritos neste trabalho, conseguimos isolar uma substância com marcantes propriedades antibióticas. Na determinação de seu espectro antibiótico, foram usados bactérias, fungos e leveduras. Pelas provas realizadas verificamos ser a substância isolada ativa contra representantes dos grupos de microrganismos citados, sendo as bactérias as mais sensíveis.

O estudo de suas características físico químicas levou nos a estabelecer na molécula a presença de apenas carbono, hidrogênio e oxgênio, sendo sua fórmula $C_{20}H_{24}O_3$. Na sua estrutura a substância possui uma hidroxila, uma metoxila, dois núcleos aromáticos e um cicloéter.

4977/160

S U M M A R Y

An antimicrobial substance that showed activity against representatives of the bacteria, fungi and yeast groups, was isolated from Centrolobium robustum, a Brazilian variety of wood. It was found that carbon, hydrogen and oxygen were present in the molecule of this substance, which presents the formula $C_{20}H_{24}O_3$. A hydroxyl group, a methoxyl group, two aromatic nuclei and a cycle-ether were found in its structure.

8. LITERATURA CITADA

- 1 - ANDERSON, A.B., E.C. Sherrard
1933 - Dehydroperilic Acid, and Acid from Western Red cedar (Thuja plicata Don), J. Amer. Chem. Soc. 55 (3): 3813-18
- 2 - AULIN-ERDTMAN, G., H. Erdtman
1941 - Die Phenolischen Inhaltsstoffe des Kiefernkernholzes. Synthese des Pinosylvim-dimethiläthers Ber. Dtsch Chem. Ges, 1941 (74.B): 50
- 3 - ANDERSON, A.B., J. Gripemberg
1948 - Antibiotic substances from heart wood of Thuja plicata IV - The constitution of β -thujaplicin. Acta Chem. Scand. 2: 644-50, Chem. Abstr. - 1949 43 (2): 5016-c
- 4 - AULIN-ERDTMAN, G.
1950 - Studies on the tropolone series. I-Thujaplicins and nootkatin, Acta Chem. Scand. 1950, 4: 1031
Antibiotica Veb Gustav Fischer Verlag, Jena, 1961: - 1001
- 5 - BLASDALE, W.C.
1907 - J. Amer. Chem. Soc. 29: 539, J. Amer. Chem. Soc. 1933 - 55 (3): 3813
- 6 - BRIEGER, F.G.
1946 - Limites unilaterais e bilaterais na análise estatística. Bragantia 6: 479-545
- 7 - BRAUDE, A.I., J. Banister and N. Wright
1954/5 - Use of gradient plate for routine clinical determinations of bacterial sensitivities to antibiotics, Antibiotics Annual 1954 - 1955: 1133
- 8 - BARNES, R.A., N.N. Gerber
1955 - The antifungal agent from Osage wood, J. Amer. Chem. Soc. 1955, 77: 3259-62
- 9 - CANAL, F.
1951 - Esperienze nella semimicro e micro analisi elementare organica, Il Farmaco nº 5: 573-586

- 48977.1107
- 10 - CARLSSON, B., H. Erdtman, A. Frank, W.E. Harvey
1952 - The chemistry of the natural order Cupressales
VIII - Heartwood constituents of Chamaecyparis nootka-
tensis - cracavol nootkatin and chamic acid Acta Chem.
Scand 1952, 6: 690, Antibiotica, Veb Gustav Fischer -
Verlag, Jena, 1961: 1002
 - 11 - ERDTMAN, H.
1939 - Ann. Chem. 539: 116, Antibiotica, Veb Gustav -
Fischer Verlag, Jena, 1961: 988
 - 12 - ERDTMAN, H., J. Gripemberg
1948 - Antibiotic Substances from heart wood of Thuja
plicata II - constitution of ~~8~~ -thujaplicim, Acta -
Chem. Scand. 2: 625-38, Chem. Abstr. 1949 43 (2): -
5016-a
 - 13 - ERDTMAN, H., E. Rennerfelt
1949 - Fungicidal properties of some constituents of
the heart wood of Tetraclinia articulata, Acta Chimica
Scand, 1949, 3: 906, Antibiotica Veb Gustav Fischer -
Verlag, Jena 1961: 993
 - 14 - ERDTMAN, H.
1952 - Conifers oils as desinfectants against tubercu-
losis, Monatsh. Prakt, Tierheilk 4: 421-32, Chem. Abs
tract. 1953, 47: 831-c
 - 15 - EPHRUSSI, B.
1952 - Nucleo-Cytoplasmatic Relations in Micro-orga--
nisms - Their Bearings on Cell Heredity and Differen-
tiations - Oxford at The Clarendon Press 1953.
 - 16 - FRYKHOLM, K.O.
1945 - Bacteriological studies of pinosylvina, their
monometil and dimetil ethers and toxicologic studies -
of pinosylvine, Nature 155: 454
 - 17 - FUNAOKA, K.
1953 - Growth-regulating activity of certain heart wood
pigments against wood destroying fungi II, - Trans. -
62nd Meeting Japan. Forest Soc., J. Japan Forest Soc.
1953, Spec. Issue: 166-8, Chem. Abstr. 1956, 50:13180-i

18 - FUNAOKA, K.

1954 - Growth - regulating activity of certain heart wood pigments against wood-destroying fungi III Trans. 63rd Meeting Japan. Forest Soc., J. Japan Forest Soc. 1954 Spec. Issue 368-9, Chem. Abstr. 1956 50: 13181-a

19 - FEIGL, F.

1954 - Spot Tests, Vol. II Organic Applications, fourth English Edition, Elsevier Publishing Company, N.Y.: 134

20 - FUNAOKA, K., M. Tanaka, K. Nishida

1955 - Growth-regulating activity of certain heart - wood pigments against wood-destroying fungi IV, Trans. 64th Meeting Japan. Forest. Soc. J. Japan Forest Soc. 1955, Spec. Issue: 394-5, Chem. Abstr. 1956 50:13181-b

21 - GATTERMANN, L.

1944 - Práticas de química orgânica - 2ª ed. espanhola Manuel Marin Ed. Barcelona: 101-102

22 - GRIPEMBERG, J.

1948 - Antibiotic substances from heart wood of Thuja plicata III - The constitution of α -thujaplicin, Acta Chem. Scand. 2: 639-43, Chem. Abstr. 1949 43 (2): 5016-b

23 - GRIPEMBERG, J.

1949 - Antibiotic substances from heart wood of Thuja plicata VI - The structure of thujic acid (Dehydroperilic acid) Acta Chem. Scand. 3: 1137-46, Chem. Abstract. 1951 45: 2422-d

24 - GRUNDON, M.F., F.E. King

1949 - Chlorophorin, a constituent of Iroko, the timber of Chlorophora excelsa, Nature 163: 564

25 - HAWLEY, L.F., L.C. Fleck e C.A. Richards

1924 - Ind. Eng. Chem. 16: 699, Modern Methods of Plants Analysis Springer Verlag, Berlin 1955 3: 633

4977/110

26 - ITO, H.

1957 - Pharmacological studies on acidic oil of Thuja p_{sis} dolobrata, Nippon Yakurigaku Zasshi, 53: 633-7, Breviaria 31, Chem. Abstr. 1958 52: 14852-d

27 - JENSEN, L.B.

1951 - Antibiotic from Osage Orange tree as food preservative U.S. 2.550.261, Apr. 24 1951, Chem. Abstr. 1951 45: 7724-a

28 - JENSEN, L.B.

1951 - Antibiotics from white cedar as food preservative, U.S. 2.550.263, Apr. 24, 1951, Chem. Abstr. 1951 45: 7724-b

29 - KITAJIMA, K.

1933 - Extracts from Bull. Impl. Forestry Exptl. Stn. 2: 13, Modern Methods of Plants Analysis - Springer Verlag, Berlin 1956 3: 634

30 - LEBDUSKA, J., J. Pidra

1940 - The Value of pine oil as an antiseptic, Zbl. Bact. I Abt. Orig. 145: 261-9

31 - LIMA, O.G., I.L. D'Albuquerque, M.P. Machado, E. Silva, C. P. Pinto

1956 - Primeiras observações sobre a ação antimicrobiana do lapachol, Anais Soc. Biol. Pernambuco XIV - (1 e 2): - 129-35

32 - LIMA, O.G., I. D'Albuquerque, M. Machado

1956 - Uma nova substância isolada do "Pau D'Arco" Tabebuia sp., An. Soc. Biol. de Pernambuco (1 e 2): 136

33 - LIMA, O.G., M.M. de Albuquerque, M.H. Dalia Maia

1959 - Substâncias antimicrobianas de Plantas Superiores Comunicação XIV - Ocorrência de Antibióticos em Madeira de Lei do Brasil, Rev. Inst. Antib. Univ. Recife 2 (1 e 2): 18-51

34 - LIMA, O.G., M.H. Dalia Maia, I.L. d'Albuquerque, M.M.F. de Albuquerque, M.A.P. Borba

1961 - Substâncias antimicrobianas de Plantas Superiores.

- 4977.1ho
- 35 - LIMA, O.G., M.H. Dalia Maia, M.M. Albuquerque, G.M. Maciel
1961 - Substâncias Antimicrobianas de Plantas Superiores. Comunicação XVII. Espectros antimicrobianos de alguns flavanoides e da brasilina, Rev. Inst. Ant. - Univ. Recife 3 (1): 81-6
- 36 - LIMA, O.G., M.H. Dalia Maia
1961 - Substâncias Antimicrobianas de Plantas Superiores. Comunicação XVIII. Sobre uma substância corada com ação contra Mycobacterium, isolada de cerne de Barabú (Peltogyne recifensis Ducke) Rev. Inst. Ant. Univ. Recife 3 (1): 87-92
- 37 - LIMA, O.G., M.H. Dalia Maia, C.G. Lima, I.L. d'Albuquerque
1962 - Substâncias antimicrobianas de plantas superiores. Comunicação XX. Atividade antimicrobiana de alguns derivados do lapachol em comparação com xiloidona, nova orto-naftoquinona natural isolada de extratos de cerne de "Pau D'Arco" roxo, Tabebuia avellanadae - Lor. Ex Griseb - Rev. Inst. Ant. Univ. Recife 4 (1 e 2): 3-18
- 38 - MARUZZELA, J.C., P.A. Henry
1958 - The "in vitro" antibacterial activity of essential oil and oils combinations, J. Am. Pharm. Assoc. 47: 294-6, Chem. Abstr. 1958 52: 10502-h
- 39 - MOAT, A.G., N. Peters Jr., and A.M. Srb.
1959 - Selection and isolation of Auxotrophic Yeast - Mutants with Aid of Antibiotics. J. Bact. 77 (6): - 673-77
- 40 - NISHIDA, K., T. Kondo, K. Funaoka
1951 - Growth - regulating activity of certain heart - wood pigments against wood-destroying fungi I, J. Japan Forest Soc. 33: 390-3, Chem. Abstr. 1956, 50 - 13180-h
- 41 - OKAZAKI, K.A. Homma
1953 - Antibacterial activity of higher plants XXVI - Antimicrobial effect of essential oils-7-oil of Thujo-opsis dolobrata and its components, J. Pharm. Soc. Japan 74: 174-6, Chem. Abstr. 1954 48: 8318-e

497/110

- 42 - OERIU, S., V. Moga, L. Bertesai, B. Mircea, H. Beneshi, M. Carp, M. Tigheciu
1958 - Studies on tuberculosis substances I - Chemical and biological study on products of higher plants, Essential oils (gums) obtained from various kinds of conifers, Acad. rep. populare, Remine, Studii cercetari Chim. 6: 263-76, Chem. Abstr. 1959, 53: 8283-e
- 43 - PAECH, K., M.V. Tracey
1955 - Modern Methods of Plants Analysis, 3, Springer Verlag, Berlin: 336, 627, 335
- 44 - PAVOLOTS'KII, Sh. I
1957 - Microbial action of fir-tree preparations, Ukr R.S.R. 19 (1): 40-3, Chem. Abstr. 51 1957: 18097-i
- 45 - PRADO, L.G. (Fº), S.M.K. Silva
1963 - Contribuição ao estudo de antimicrobianos presentes em madeiras, O Hospital (1) 64: 101-111
- 46 - RENNERFELT, E.
1943 - The Toxicity of Phenolic extractives of pine - toward several decay-reducing fungi, Svensk, Botan. Tid. 1943: 83, Antibiotica, Veb Gustav Fischer Verlag, Jena, 1961: 989
- 47 - ROLLE, M., A. Mayer
1952 - Conifers oils a desinfectants against tuberculosis, Monatsh. Prakt, Tierheilk 4: 421-32, Chem. - Abstract. 1953, 47: 831-c
- 48 - RODINA, V. Ya
1957 - Antimicrobial activity of eucaliptus, Fitontsi dy, ikh Rol v Priroede Izbrannye Deklady 2-go Sovesk-cham po Probleme Fitontsidov Leningrad. Gosdarst Univ. im A.A. Zhdanova, Kiev 1956: 22-31 (publ. 1957) Chem. Abstr. 1959 53: 8227-g
- 49 - SOWDERS, A.M.
1929 - Ind. Eng. Chem. 21: 981, Modern Methods of - Plants Analysis Springer Verlag, Berlin 1955 3: 633

4977/11/10

- 50 - SHERRARD, E.C., C.W. Sondern
1929 - Unpublished report, Forest products Laboratory
Madison Wisc., September 1929, J. Amer. Chem. Soc. -
1933 55 (3): 3813
- 51 - SHERWOOD, M.B., E.A. Falco, E. J. de Beer
1944 - A Rapid, Quantitative Method for the Determina-
tion of Penicilin, Science 99 (2.569): 247-7
- 52 - SOUTHAM, C.M.
1946 - Antibiotic activity for extract of western red
cedar heart wood, Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 61:
391-6, Chem. Abstr. 1946 40 (2): 4409-1
- 53 - SNEDECOR, G.W.
1948 - Métodos de Estadística, Su aplicación a Experi-
mentos en Agricultura y Biología, traducido de la cuar-
ta edición en inglés, ACME agency, Buenos Aires: 510
- 54 - SHRINER, R.L., Fuson, R.C.
1948 - The Systematic Identification of Organic Com-
pound A Laboratory Manual, Third Edition, John Wiley
& Sons, Inc. N.Y.: 53-57
- 55 - SZMBAŁSKY, W.
1952 - Gradient plates for the study of microbial re-
sistence to antibiotics. Bact. Proc. 1952: 36
- 56 - SMETZBERGER, H.
1954 - The activity of the disinfectant coniferol.
V - Particularity against Mycobacterium tuberculosis, -
Milchwiss. Ber. 4: 193-205, Chem. Abstr. 1955 49:
7641-h
- 57 - SANCHES-MARROQUIN, A., L. Garcia, M. Mendez
1958 - Brazilin antibacterial substance from Haemato-
xylon brasiletto, Rev. Latino Am. Microbiol. 1: 225-
32 1960 Chem. Abstr. 54: 24982-f
- 58 - SAVCHUK, L.N.
1960 - Effect of some plant phytoncides on digestive
processes. Trudy Odessk. Gosudarst. Univ. im. I.I.
Mechnikova 150, Ser. Biol. Nauk. nº 9: 189-92, Chem.
Abstr. 1962 56: 9376-d

59 - VOGEL, A.L.

1956 - A Text-Book of Practical Organic Chemistry, Including qualitative Organic Analysis, Third Edition, Longmans, Green and Co., London: 75, 1057

60 - VOGEL, A.

1956 - Elementary Practical Organic Chemistry, Part III Quantitative Organic Analysis, Longmans, Green and Co. London: 677

61 - WESP, E.F., W.R. Brode

1934 - The Absorption Spectra of Ferric Compound I - The Ferric Chloride-Phenol Reactions, J. Am. Chem. Soc. 1934, 56: 1037

62 - WAKSMAN, S.A., H.C. Reilly

1945 - Agar-Streak Method for Assaying Antibiotic Substances Industrial and Engineering Chemistry, Analytical Edition 17 (9): 556-8

63 - WATERMAN A.M.

1946 - The effect of water-soluble extractives from the heartwood of tropical American woods on the growth of two wood-decay fungi, Trop. woods n^o 88: 1-11, Chem. Abstr. 1948 42 (3): 7474-i

4997/11/20

9. AGRADECIMENTOS

Somos profundamente gratos ao Prof. Oswaldo Gonçalves de Lima, digníssimo diretor do Instituto de Antibióticos da Universidade do Recife, pelo grande interesse demonstrado durante a realização deste trabalho e pelas facilidades que nos proporcionou na utilização do material e técnicos do Instituto que dirige, onde parte deste trabalho foi realizado.

Agradecemos à Universidade do Recife da qual fomos bolsista durante o período em que trabalhamos no Instituto de Antibióticos.

Agradecemos ainda, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo auxílio concedido para o término deste trabalho e a todos que direta ou indiretamente nos auxiliaram.