

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COORDENADORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

BIOATIVIDADE DA CERA INDUSTRIAL DE LIMA-ÁCIDA
(*Citrus latifolia* Tanaka) SOBRE *Cryptotermes brevis* Walker

Ana Carolina Sbeghen Loss

Caxias do Sul, 2008.

Ana Carolina Sbeghen Loss

**BIOATIVIDADE DA CERA INDUSTRIAL DE LIMA-ÁCIDA
(*Citrus latifolia* Tanaka) SOBRE *Cryptotermes brevis* Walker**

Tese apresentada ao Programa de Doutorado em
Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul
visando a obtenção de grau de Doutor em
Biotecnologia

Orientadora: Dra. Neiva Monteiro de Barros

Co-orientadora: Dra. Maria Veronica Cesio

Caxias do Sul, 2008.

Ana Carolina Sbeghen Loss

**BIOATIVIDADE DA CERA INDUSTRIAL DE LIMA-ÁCIDA
(*Citrus latifolia* Tanaka) SOBRE *Cryptotermes brevis* Walker**

Tese apresentada ao Programa de Doutorado em
Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul

Orientadora: Prof. Dr. Neiva Monteiro de Barros

Co-orientadora: Prof. Dr. Maria Veronica Cesio

Tese defendida em 16 de dezembro de 2008.

Orientadora:

Prof. Dr. Neiva Monteiro de Barros

Co-orientadora:

Prof. Dr. Maria Veronica Cesio

Membros da banca:

Prof. Dr. Ana Costa-Leonardo

Prof. Dr. Horacio Heinzen

Prof. Dr. Sergio Echeverrigaray

Só nos pertence realmente aquilo que interpretamos. Apenas retemos aquilo que tenha vindo de nossas experiências, análises e inspirações.

Hammed

Ao meu querido marido, João Fausto,
companheiro de toda vida, paixão, com
quem aprendi que somente para o verdadeiro
amor não há limites.

Ao meu amado filho, João Vitor, jamais
esqueça que eu levei para sempre um
pedaço do seu ser dentro do meu próprio ser.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que tudo dirige e determina.

Aos meus pais, Valdir e Ivania, pelo amor e por acreditarem em mim.

Às minhas irmãs, Edilia e Fernanda, pelo carinho e apoio.

À tia Inheta, pelo afeto, confiança e dedicação, em especial ao meu filho, João Vítor.

À Gessi, pela sua dedicação e amizade.

À Prof. Dr. Neiva Monteiro de Barros, minha orientadora, pela amizade, confiança, credibilidade e apoio oferecidos durante todas as etapas do trabalho.

À Prof. Dr. Maria Veronica Cesio, pela co-orientação, paciência, confiança e ensinamentos.

À Universidade de Caxias do Sul e ao Instituto de Biotecnologia pela oportunidade e infra-estrutura oferecida.

À CAPES, pela bolsa concedida e ao CNPq e DYNACIT, pelo apoio financeiro de Cooperação Internacional.

Aos professores do Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, pela troca de conhecimentos.

Aos colegas do curso de Doutorado, em especial ao Wilson, Luciana e Fabiane, pelo

carinho, apoio e companheirismo.

Aos colegas do Laboratório de Controle de Pragas, em especial à Lúcia, Vânia e Elton, pela amizade e apoio durante a realização dos bioensaios.

Ao professor Eugen, pela dedicação e troca de conhecimentos.

A todos os integrantes do Laboratório de Farmacognosia da Universidad de La Republica, Uruguai, pelo apoio, carinho e receptividade, em especial aos professores Dr. Horacio Heinzen e Dr. Maria Veronica Cesio e ao químico Mauricio Mato, que foi essencial para o desenvolvimento do trabalho.

ÍNDICE

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | xi |
| LISTA DE TABELAS..... | xii |
| LISTA DE FIGURAS..... | xiv |
| RESUMO..... | xix |
| ABSTRACT..... | xx |
| 1.INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 3 |
| 2.1 Características da Ordem Isoptera..... | 3 |
| 2.1.1 Cupim-de-madeira-seca <i>C. brevis</i> | 4 |
| 2.1.2 Simbiontes intestinais..... | 7 |
| 2.2 Controle de cupins..... | 9 |
| 2.2.1 Produtos naturais..... | 12 |
| 2.3 Resíduos industriais de lima-ácida (<i>C. latifolia</i> Tanaka)..... | 18 |
| 2.3.1 Caracterização química da cera industrial de citrus..... | 22 |
| 2.4 Bioatividade de produtos naturais contra insetos-praga.. | 26 |
| 2.4.1 Efeitos biológicos das cumarinas e furanocumarinas contra insetos-praga..... | 31 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS..... | 35 |
| 3.1 Coleta e identificação de cupins..... | 35 |

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.2 Obtenção e identificação química dos compostos presentes na cera industrial de lima-ácida..... | 35 |
| 3.2.1 Procedimentos gerais..... | 36 |
| 3.2.2 Fracionamento e análise química..... | 36 |
| 3.3 Bioatividade da cera industrial de lima-ácida e suas frações..... | 39 |
| 3.3.1 Avaliação da mortalidade e efeito anti-alimentar..... | 39 |
| 3.3.2 Comprovação da retenção da cera industrial de lima-ácida nos corpos-de-prova.. | 41 |
| 3.3.3 Avaliação dos efeitos da cera industrial de lima-ácida sobre <i>Foaina</i> sp..... | 42 |
| 3.4 Análises estatísticas..... | 43 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 44 |
| 4.1 Composição química da cera industrial de lima-ácida..... | 44 |
| 4.1.1 Fração volátil..... | 45 |
| 4.1.2 Fração não volátil..... | 48 |
| 4.2 Retenção da cera industrial de lima-ácida na madeira de <i>Pinus</i> sp..... | 67 |
| 4.3 Bioatividade da cera industrial de lima-ácida e suas frações contra <i>C. brevis</i> | 74 |
| 4.3.1 Cera industrial de lima-ácida..... | 74 |
| 4.3.2 Óleo essencial..... | 78 |
| 4.3.3 Fração não volátil..... | 82 |
| 4.3.4 Frações obtidas por VLC (Vacuum Liquid Chromatography)..... | 85 |
| 4.3.5 Concentração letal mediana (CL ₅₀) e Tempo letal mediano (TL ₅₀)..... | 89 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------|------------|
| 4.3.6 Atividade anti-alimentar..... | 92 |
| 4.3.7 Ação da cera industrial de lima-ácida sobre <i>Foaina</i> sp..... | 95 |
| 5. DISCUSSÃO GERAL..... | 102 |
| 6. CONCLUSÕES..... | 107 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 109 |
| ANEXO..... | 128 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|------------------|---------------------------------------------------------|
| C1 | Controle (cupins sem alimentação) |
| C2 | Controle acetona |
| CCD | Cromatografia de Camada Delgada |
| CE ₅₀ | Concentração Efetiva Mediana |
| CL ₅₀ | Concentração Letal Mediana |
| CP | Corpos-de-prova |
| DDT | Dicloro-Difenil-Tricloroetano |
| FCs | Furanocumarinas |
| GC | Cromatografia Gasosa |
| GC/MS | Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa |
| IA | Índice anti-alimentar |
| IC | Intervalo de confiança |
| IR | Índice de retenção |
| IRL | Índice de retenção linear |
| SPSS | Statistical Package for the Sciences |
| TL ₅₀ | Tempo Letal Mediano |
| Tr | Tempo de retenção |
| UV | Ultravioleta |
| VLC | Vacuum Liquid Chromatography |

LISTA DE TABELAS

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1. Compostos químicos do grupo das cumarinas e furanocumarinas identificados na fração não volátil do óleo essencial de lima. Fonte: Dugo <i>et al.</i> (1999b)..... | 25 |
| Tabela 2. Índice de retenção linear dos compostos identificados na fração volátil do óleo essencial de <i>C. latifolia</i> Tanaka obtida através de análise por GC (safra 2005/2)..... | 47 |
| Tabela 3. Compostos terpênicos e cumarina identificados por GC-MS na fração 1 da cera industrial de lima-ácida..... | 52 |
| Tabela 4. Perda de massa características do composto 7-metoxicumarina..... | 57 |
| Tabela 5. Perda de massa características do composto 5,7-dimetoxicumarina..... | 60 |
| Tabela 6. Perda de massa características do composto 5-metoxipsoraleno..... | 63 |
| Tabela 7. Perda de massa características do composto 5,8-dimetoxipsoraleno..... | 66 |
| Tabela 8. Coeficiente de Correlação (Pearson) entre retenção e concentração dos diferentes tratamentos da cera industrial de lima-ácida..... | 72 |
| Tabela 9. Valores de Concentração Letal Mediana (CL ₅₀) e Tempo Letal Mediano (TL ₅₀) obtidos para cada tratamento realizado com a cera industrial de lima-ácida..... | 91 |
| Tabela 10. Índice anti-alimentar (IA) e concentração efetiva mediana (CE ₅₀) dos tratamentos utilizando a cera industrial de lima-ácida contra <i>Cryptotermes brevis</i> | 92 |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 11. Índice anti-alimentar (IA) e concentração efetiva mediana (CE ₅₀) dos tratamentos utilizando frações da cera industrial de lima-ácida contra <i>Cryptotermes brevis</i> | 93 |
| Tabela 12. Mortalidade e consumo de substrato pelo cupim-de-madeira-seca <i>Cryptotermes brevis</i> em 30 e 60 dias de ensaio..... | 97 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Distribuição das espécies de <i>Cryptotermes</i> introduzidas na América do Sul. <i>Cryptotermes brevis</i> está presente em muitas regiões urbanas dentro da área cinza. Fonte: Araújo (1977); Bandeira <i>et al.</i> (1989); Fontes & Araújo (1999) <i>apud</i> Constantino (2002)..... | 5 |
| Figura 2. Ciclo biossintético dos metabólitos secundários. Fonte: Santos (2000)..... | 15 |
| Figura 3. Fluxograma do processo de produção de sucos e subprodutos da indústria de cítricos (Dr. Caren Frizzo, 2008)..... | 21 |
| Figura 4. Estrutura química de compostos heterocíclicos encontrados em citrus (Dugo <i>et al.</i> , 1999b)..... | 24 |
| Figura 5. Fracionamento bioguiado realizado com a cera industrial de lima-ácida..... | 38 |
| Figura 6. Perfil cromatográfico do óleo essencial de <i>Citrus latifolia</i> Tanaka obtido por Cromatografia Gasosa (GC)..... | 46 |
| Figura 7. Cromatograma de Camada Delgada. (1) fase aquosa; (2) cera industrial de lima-ácida; (3) fração não volátil; (4) 8-metoxipsoraleno; (5) Esculina hidrolisada; (6) 7-hidroxycumarina e (7) etoxicumarina. Revelação em lâmpada UV 365nm..... | 49 |
| Figura 8. Cromatograma de Camada Delgada das 4 frações obtidas através da VLC (Vacuum Liquid Chromatography). A = revelação em lâmpada UV 365nm; B = revelação em lâmpada UV 254nm..... | 50 |
| Figura 9. Cromatograma de Camada Delgada das 4 frações obtidas da VLC (Vacuum Liquid Chromatography). Sulfato de cobre (CuSO ₄) como revelador universal..... | 51 |
| Figura 10. Perfil cromatográfico da fração 2 obtido através de GC-MS..... | 53 |

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 11. Perfil cromatográfico da fração 3 obtido através de GC-MS..... | 54 |
| Figura 12. Perfil cromatográfico da fração 4 obtido através de GC-MS..... | 54 |
| Figura 13. Estrutura molecular das cumarinas e furanocumarinas presentes nas frações obtidas por VLC (Vacuum Liquid Chromatography) da cera industrial de lima-ácida..... | 55 |
| Figura 14. Espectro de massa do pico 19.36, identificado nas frações 2, 3 e 4 obtidas através da VLC (Vacuum Liquid Chromatography)..... | 56 |
| Figura 15. Possível rota de fragmentação da 7-metoxicumarina..... | 57 |
| Figura 16. Espectro de massa do pico 21.96, identificado nas frações 1, 2, 3 e 4 obtidas através da VLC (Vacuum Liquid Chromatography)..... | 58 |
| Figura 17. Possível rota de fragmentação da 5,7-dimetoxicumarina..... | 59 |
| Figura 18. Espectro de massa do pico 22.7, identificado nas frações 2, 3 e 4 obtidas através da VLC (Vacuum Liquid Chromatography)..... | 61 |
| Figura 19. Possível rota de fragmentação do 5-metoxipsoraleno..... | 62 |
| Figura 20. Espectro de massa do pico 24.4, identificado nas frações 2, 3 e 4 obtidas através da VLC (Vacuum Liquid Chromatography)..... | 64 |
| Figura 21. Possível rota de fragmentação do composto 5,8-dimetoxipsoraleno..... | 65 |
| Figura 22. Retenção da cera industrial de lima-ácida em corpos-de-prova (CP) de madeira de <i>Pinus</i> sp após imersão em soluções com diferentes concentrações. A= retenção avaliada imediatamente após tratamento dos CP; B= retenção avaliada após 6 meses de tratamento dos CP. Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($P < 0.05$)..... | 68 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 23. Retenção da fração não volátil (A) e óleo essencial de lima-ácida (B) em corpos-de-prova (CP) de madeira de <i>Pinus</i> sp após imersão em soluções com diferentes concentrações. Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($P < 0.05$)..... | 68 |
| Figura 24. Retenção das frações obtidas através da VLC (Vacuum Liquid Chromatography), em corpos-de-prova (CP) de madeira de <i>Pinus</i> sp após imersão em soluções com diferentes concentrações. A = Fração 2; B = Fração 3; C = Fração 4. Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($P < 0.05$)..... | 70 |
| Figura 25. Cromatograma..... | 73 |
| Figura 26. Atividade antitermítica da cera industrial de lima-ácida contra <i>Cryptotermes brevis</i> no Teste 1 = ensaio imediatamente após tratamento dos corpos-de-prova. C1 = cupins sem alimentação; C2 = acetona..... | 75 |
| Figura 27. Atividade antitermítica da cera industrial de lima-ácida contra <i>Cryptotermes brevis</i> no Teste 2 = ensaio após 6 meses de tratamento dos corpos-de-prova. C1 = cupins sem alimentação; C2 = acetona..... | 75 |
| Figura 28. Consumo do corpo-de-prova (madeira de <i>Pinus</i> sp) por <i>Cryptotermes brevis</i> em diferentes concentrações de solução da cera industrial de lima-ácida no ensaio imediatamente após tratamento dos corpos-de-prova (Teste 1). Valores seguidos pela mesma letra não diferem significativamente pelo Teste de Tukey ($P < 0.05$)..... | 77 |
| Figura 29. Consumo do corpo-de-prova (madeira de <i>Pinus</i> sp) por <i>Cryptotermes brevis</i> em diferentes concentrações de solução da cera industrial de lima-ácida no ensaio após 6 meses de tratamento dos corpos-de-prova (Teste 2). Valores seguidos pela mesma letra não diferem significativamente pelo Teste de Tukey ($P < 0.05$)..... | 77 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 30. Atividade antitermítica do óleo essencial de lima-ácida contra <i>Cryptotermes brevis</i> . C1 = cupins sem alimentação; C2 = acetona..... | 79 |
| Figura 31. Consumo do corpo-de-prova (madeira de <i>Pinus</i> sp) por <i>Cryptotermes brevis</i> em diferentes concentrações de óleo essencial de lima-ácida. Valores seguidos pela mesma letra não diferem significativamente pelo Teste de Tukey ($P < 0.05$)..... | 80 |
| Figura 32. Atividade antitermítica da fração não volátil de lima-ácida contra <i>Cryptotermes brevis</i> . C1 = cupins sem alimentação; C2 = acetona..... | 83 |
| Figura 33. Consumo do corpo-de-prova (madeira de <i>Pinus</i> sp) por <i>Cryptotermes brevis</i> em diferentes concentrações de solução da fração não volátil de lima-ácida. Valores seguidos pela mesma letra não diferem significativamente pelo Teste de Tukey ($P < 0.05$)..... | 84 |
| Figura 34. Atividade antitermítica da fração 2 obtida da VLC (Vacuum Liquid Chromatography) contra <i>Cryptotermes brevis</i> . C1 = cupins sem alimentação; C2 = acetona..... | 85 |
| Figura 35. Atividade antitermítica da fração 3 obtida da VLC (Vacuum Liquid Chromatography) contra <i>Cryptotermes brevis</i> . C1 = cupins sem alimentação; C2 = acetona..... | 86 |
| Figura 36. Atividade antitermítica da fração 4 obtida da VLC (Vacuum Liquid Chromatography) contra <i>Cryptotermes brevis</i> . C1 = cupins sem alimentação; C2 = acetona..... | 86 |
| Figura 37. Consumo do corpo-de-prova (madeira de <i>Pinus</i> sp) por <i>Cryptotermes brevis</i> em diferentes concentrações da fração 2 obtida através da VLC (Vacuum Liquid Chromatography). Valores seguidos pela mesma letra não diferem significativamente pelo Teste de Tukey ($P < 0.05$)..... | 88 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figura 38. Consumo do corpo-de-prova (madeira de <i>Pinus</i> sp) por <i>Cryptotermes brevis</i> em diferentes concentrações da fração 3 obtida através da VLC (Vacuum Liquid Chromatography). Valores seguidos pela mesma letra não diferem significativamente pelo Teste de Tukey ($P < 0.05$)..... | 88 |
| Figura 39. Consumo do corpo-de-prova (madeira de <i>Pinus</i> sp.) por <i>Cryptotermes brevis</i> em diferentes concentrações da fração 4 obtida através da VLC (Vacuum Liquid Chromatography). Valores seguidos pela mesma letra não diferem significativamente pelo Teste de Tukey ($P < 0.05$)..... | 89 |
| Figura 40. Protozoários do gênero <i>Foaina</i> presentes no intestino de <i>Cryptotermes brevis</i> (Fonte: autor 2007)..... | 96 |
| Figura 41. Número médio de protozoários do gênero <i>Foaina</i> quantificados no intestino de cupins da espécie <i>Cryptotermes brevis</i> , alimentados com corpos-de-prova de madeira de <i>Pinus</i> sp. em diferentes concentrações de cera industrial de lima-ácida. Ensaio de 30 dias. C1 = cupins sem alimentação; C2 = controle (acetona). Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($P < 0.05$)..... | 99 |
| Figura 42. Número médio de protozoários do gênero <i>Foaina</i> quantificados no intestino de cupins da espécie <i>Cryptotermes brevis</i> , alimentados com corpos-de-prova de madeira de <i>Pinus</i> sp. em diferentes concentrações de cera industrial de lima-ácida. Ensaio de 60 dias. C1 = cupins sem alimentação; C2 = controle (acetona). Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($P < 0.05$)..... | 100 |

RESUMO

O potencial da cera industrial de lima-ácida foi avaliado para o controle de *Cryptotermes brevis*, espécie de cupim-de-madeira-seca introduzida no Brasil, a qual causa sérios danos econômicos ao Patrimônio Histórico, Artístico e Cultural e bens em geral. Foram considerados os parâmetros de mortalidade, efeito anti-alimentar e ação sobre o simbionte intestinal do gênero *Foaina*. Os compostos presentes na cera, tanto na fração volátil quanto na não volátil, foram identificados, avaliando-se sua bioatividade. Todos os bioensaios foram preparados utilizando-se como substrato corpos-de-prova de *Pinus* sp., tratados com a cera e suas frações. Nos bioensaios com a cera observou-se altas taxas de mortalidade em concentrações de 50, 75 e 100 mg/cm³, sendo o valor da concentração letal mediana (CL₅₀) de 32,76 mg/cm³, com tempo letal mediano (TL₅₀) de 38 dias. Após 6 meses, verificou-se persistência da ação anti-alimentar. Nos tratamentos com a fração não volátil, a concentração efetiva para reduzir em 50% a alimentação (CE₅₀) foi de 11,68 mg/cm³ (com IA ≥ 50). As frações 2, 3 e 4, obtidas por VLC e analisadas por GC-MS, apresentaram composição química muito similar, porém com proporções distintas dos compostos 7-metoxicumarina, 5,7-dimetoxicumarina, 5-metoxipsoraleno e 5,8-dimetoxipsoraleno. Valores significativos quanto ao efeito anti-alimentar foram obtidos com a cera e a fração 4, com valores de CE₅₀ de 24,69 e 21,91 mg/cm³, respectivamente. O número de protozoários simbiotes do gênero *Foaina* no intestino dos cupins foi significativamente reduzido nos tratamentos com a cera. Os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que a cera de lima-ácida, um resíduo da indústria de cítricos, tem potencial para ser utilizado na proteção de madeira contra *C. brevis*.

ABSTRACT

The potential of the industrial lime wax for control of drywood termite *Cryptotermes brevis* was evaluated. This termite was introduced into the Brazilian ecosystem and causes serious economical damage to the Historical, Artistic and Cultural Patrimony and general property. The mortality, anti-feeding effect, and activity towards the intestinal symbiont genus *Foaina* parameters were evaluated. The wax compounds, in both volatile and non-volatile fractions, were identified, and its bioactivity was determined. All bioassays were conducted using *Pinus* sp. wood blocks as substrate, which were treated with wax and its fractions. The wax bioassays showed high mortality levels in concentrations of 50, 75 and 100 mg/cm³, median lethal concentration (LC₅₀) was 32,76 mg/cm³ and media lethal time (LT₅₀) was 38 days. After 6 months, the anti-feeding action was persistent. The non-volatile fraction treatment showed an effective concentration for 50% feeding reduction (EC₅₀) of 11,68 mg/cm³ (AI ≥ 50). Fractions 2, 3 and 4, obtained through VLC and GC-MS analyzed, presented high similar chemical composition, although presenting distinct 7-methoxycoumarin, 5,7-dimethoxycoumarin, 5-methoxypsoralen and 5,8-dimethoxypsoralen proportions. Significant anti-feeding values were obtained using wax and fraction 4, presenting EC₅₀ of 24,69 and 21,91 mg/cm³, respectively. The total number of the symbionts genus *Foaina* present in the termites intestine was significantly reduced in the wax treatments. The results presented in the current work suggest that the lime wax, a citric industry residue, has potential for protecting wood against *C. brevis*.

1. INTRODUÇÃO

A grande maioria das espécies de cupins é endêmica, principalmente na região neotropical. Esses insetos são essencialmente xilófagos. Nas áreas urbanas mundiais, estima-se que os gastos com tratamento, reparo e substituições de peças atacadas por cupins alcancem, na atualidade, valores da ordem de US\$ 5 a 10 bilhões anuais.

O Patrimônio Histórico e Artístico Cultural também é comumente atacado por cupins, onde a ação destes insetos abrange desde retábulos, altares, imagens e outras peças de madeira, sendo muitas vezes percebida somente quando os danos são de grande extensão, comprometendo, muitas vezes, a própria estabilidade estrutural da edificação.

Além das espécies de cupins nativos do nosso país, outras espécies introduzidas acabaram se tornando importantes pragas nas áreas urbanas, destacando-se a espécie *Cryptotermes brevis* Walker, conhecido como cupim-de-madeira-seca.

A alta toxicidade dos produtos químicos convencionais que sempre foram acompanhados pelo aparecimento de resistência por parte dos organismos e, com o tempo, promovendo o aparecimento de efeitos cumulativos sobre o ambiente, favorecendo o desequilíbrio no ecossistema, têm motivado o interesse de estudos envolvendo métodos alternativos de controle de insetos-praga, incluindo os cupins.

Pesquisas têm sido desenvolvidas à procura de soluções menos agressivas ao meio ambiente e os compostos derivados de plantas, há muito tempo, vêm sendo explorados com sucesso como inseticidas e repelentes de insetos-praga. Essas substâncias, do ponto de vista

de controle de insetos, são normalmente classificados como análogos hormonais de insetos, repelentes e atraentes, toxinas e substâncias deterrentes.

As pesquisas com produtos naturais derivados de plantas podem ser realizadas, principalmente, visando a descoberta de moléculas com atividade contra insetos que permitam a formulação de novos inseticidas naturais para uso direto no controle de pragas. E, embora existam muitos trabalhos sobre os constituintes químicos das plantas, uma pequena porcentagem destes estudos tem sido conduzida através do fracionamento bioguiado.

Também é importante considerar o custo-benefício da utilização destes produtos de origem natural. Em vista disto, pesquisas envolvendo recursos de fácil obtenção e disponibilidade, cujo custo de produção seja menor são necessárias para este fim.

Em ensaios prévios realizados pelo grupo de Controle de Pragas do Instituto de Biotecnologia da UCS, foi observada a ação tóxica de frações obtidas da cera, resíduo proveniente da extração industrial do óleo essencial de laranja-doce (*Citrus sinensis* (L.) Pers.) e lima-ácida (*Citrus latifolia* Tanaka), aos cupins-de-madeira-seca da espécie *C. brevis*, sendo que os resultados com a cera industrial de lima-ácida indicaram bioatividade.

Neste sentido, o presente trabalho objetivou avaliar os efeitos da cera industrial de lima-ácida sobre *C. brevis* e seus simbioses intestinais do gênero *Foaina* e identificar os compostos obtidos nas frações da cera avaliando sua bioatividade.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Características da Ordem Isoptera

Os cupins ou térmitas são insetos sociais polimórficos que constroem seus ninhos, conhecidos por cupinzeiros ou termiteiros, para proteção da colônia, armazenamento de alimento e manutenção de condições ótimas para desenvolvimento dos indivíduos (Berti Filho, 1993). O nome Isoptera deriva do fato de as formas aladas possuírem dois pares de asas membranosas sub-iguais (Iso=igual; *pteron*=asas). São insetos mastigadores e desenvolvem-se por hemimetabolia (ovo, ninfa e adulto) (Gallo *et al.*, 2002).

Existe uma ampla variedade de recursos alimentares que são explorados pelos Isoptera. Este fato permitiu aos cupins ocuparem todas as regiões quentes e temperadas da Terra, ocorrendo em praticamente todos os ambientes terrestres, naturais ou modificados pelo homem (Lima & Costa-Leonardo, 2007).

Existem sete famílias de Isoptera: Mastotermitidae, Kalotermitidae, Termopsidae, Hodotermitidae, Serritermitidae, Rhinotermitidae e Termitidae. Os cupins pertencentes às seis primeiras famílias são denominados “cupins inferiores” e os pertencentes à sétima família (Termitidae) são denominados “cupins superiores”. Tais designações não significam que os insetos apresentam similaridades filogenéticas nem diferentes origens, referem-se apenas à dependência de protozoários flagelados celulolíticos, no caso dos “cupins inferiores”, para auxiliar na degradação da celulose (Costa-Leonardo, 2002). Atividade celulolítica significativa tem sido reportada para a fauna simbiótica dos “cupins inferiores”(Tokuda *et al.*, 2004; Tokuda *et al.*, 2005).

Pode-se classificar os cupins, pragas em áreas urbanas, em duas categorias, segundo Fontes & Araújo (1999): “cupins-de-madeira-seca” e “cupins subterrâneos”, ressaltando, como padrões de interferência termítica no patrimônio que o cupim-de-madeira-seca interage com o alimento, enquanto o cupim subterrâneo interage largamente com o ambiente, além do alimento. A observação desses fatos é fundamental para definir as medidas de controle a serem utilizadas.

Os cupins são abundantes em muitas regiões da América do Sul. Várias espécies nativas têm sido registradas como pragas estruturais e agrícolas, sendo algumas introduzidas de outras regiões (Constantino, 2002). Segundo o autor, as informações sobre os cupins-praga da América do Sul, são ainda muito limitadas, não havendo estimativas das perdas econômicas causadas por estes insetos ou a relativa importância de cada espécie. Nesta região, as pesquisas são altamente concentradas no Brasil, enquanto que os problemas com cupins em países como a Colômbia praticamente não são conhecidos.

De acordo com Constantino (1998), há cerca de 400 espécies de cupins registradas na América do Sul, e dentre estas pelo menos seis espécies foram introduzidas de outras regiões e tornaram-se pragas urbanas, destacando-se *C. brevis*.

2.1.1 Cupim-de-madeira-seca *C. brevis*

Do gênero *Cryptotermes*, *C. brevis* é considerada a praga mais voraz para o ambiente doméstico, sendo amplamente distribuída em todo o mundo (Edwards & Mil, 1986; Bacchus, 1987). Um habitat nativo para esta espécie, entretanto, ainda não foi estabelecido, assim *C. brevis* permanece como uma praga exótica com origem não confirmada (Scheffrahn *et al.*,

2008). Na Figura 1, pode-se observar a ampla distribuição de *C. brevis* na América do Sul.



Figura 1. Distribuição das espécies de *Cryptotermes* introduzidas na América do Sul. *Cryptotermes brevis* está presente em muitas regiões urbanas dentro da área cinza. Fonte: Araújo (1977); Bandeira *et al.* (1989); Fontes & Araújo (1999) *apud* Constantino (2002).

Os cupins desse gênero infestam madeira seca não apodrecida, ramos de árvores vivas em locais sombreados, árvores em pomares, postes e madeiras armazenadas (Marer, 2002), apresentam vôos noturnos, sendo a observação de grande número de indivíduos alados em

luminárias durante a noite, o primeiro indício de uma infestação (Robinson, 1996). O ataque ocorre diretamente na madeira, dependendo das condições de umidade da mesma para o desenvolvimento adequado da colônia. Seus ninhos restringem-se a galerias escavadas na madeira, preferencialmente àquelas com teor de umidade inferior a 30%. Segundo Costa-Leonardo (2002), as colônias desse tipo de cupim são pequenas, com algumas centenas de indivíduos e seus ninhos não apresentam acesso com o solo. Como habitam um ambiente de baixa umidade, os cupins de madeira seca têm que evitar a perda de água, necessária ao organismo, e conseguem isso produzindo pelotas fecais secas. Os resíduos empilhados sob os móveis infestados, conhecidos como “pozinho-de-cupim”, são formados exatamente pelas pelotas fecais.

As colônias dos cupins-de-madeira-seca são compostas de três castas primárias: os reprodutores (rei, rainha, alados e neotênicos), soldados e pseudo-operários ou “pseudergates” (Costa-Leonardo, 2002). Estes últimos, escavam a madeira para se alimentarem e alimentar outras castas da colônia (Scheffrahn & Su, 1999).

De acordo com Su & Scheffrahn (2000), um dos principais determinantes para o tratamento a ser escolhido, e o mais difícil e incerto, é a localização da extensão da (s) colônia (s). O que ocorre é que, após muitos ciclos de re-infestação, uma determinada estrutura pode conter diversos pontos afetados, cada qual infestado por uma ou mais colônias. Dessa forma, as alternativas para o controle desses cupins devem passar por tratamentos preventivos e curativos.

2.1.2 Simbiontes intestinais

A madeira é constituída por três grandes compostos estruturais: celulose (28 – 50%), hemicelulose (20 – 30%) e lignina (18 – 30%) (Breznak & Brune, 1994).

Uma forte ligação covalente entre as microfibrilas celulolíticas da madeira previne a digestão desta pela maioria dos animais. Entretanto, na natureza a quebra da madeira pode ser realizada por microrganismos, tais como bactérias, fungos e protozoários. Por exemplo, protozoários podem digerir partículas de madeira por endocitose e estocá-las em vacúolos alimentares, onde as partículas são transformadas em acetato, CO₂ e H₂ (Breznak & Brune, 1994).

Cupins são abundantes nos ecossistemas terrestres e ecologicamente muito importantes devido a sua habilidade para decompor a lignocelulose, a qual depende da comunidade microbiana presente no intestino destes insetos. O trato digestório dos cupins “inferiores” tem uma porção dilatada na região posterior que contém os simbiontes microbianos (Ohkuma, 2008).

Segundo Tokuda *et al.* (2005), a diversidade dos sistemas celulolíticos em cupins tem ocasionado alguma confusão e controvérsia por muitos anos com respeito à degradação da celulose. Baseado no seu estudo, os autores sugerem que três tipos de mecanismos de digestão estão presentes nos cupins que se alimentam de madeira. É de conhecimento que muitos cupins, com flagelados habitando seu intestino, digerem a celulose primariamente no intestino posterior, via flagelados, com um possível papel de enzimas endógenas derivadas das glândulas salivares (Li *et al.*, 2003). Cupins livres de flagelados, degradam celulose primariamente no intestino médio por enzimas endógenas produzidas. Entretanto, alguns

cupins possuem um sistema alternativo de digestão, tal como observado para *C. formosanus*, na qual a celulose é primeiro hidrolizada por enzimas celulolíticas endógenas no intestino médio e a celulose não degradada por este processo é após digerida por flagelados e outros microrganismos presentes no intestino posterior (Nakashima *et al.*, 2002). O estudo realizado por Tokuda *et al.* (2005), indica que os mecanismos celulolíticos dos cupins, incluindo propriedades das moléculas enzimáticas, têm sido flexíveis no curso da evolução em resposta às alterações na ecologia dos insetos.

Segundo Ohkuma (2008), embora existam estudos que contribuem para o progresso desta área do conhecimento, a compreensão sobre a biologia da microbiota intestinal de cupins ainda é muito escassa devido a complexidade da comunidade e a dificuldade de cultivá-los.

Uma grande quantidade e diversidade de protozoários são encontrados no intestino de cupins, sendo estimado cerca de 30.000 células por intestino (Mauldin *et al.*, 1981).

O número de protozoários no intestino posterior é relativamente constante nos cupins de mesma casta, entretanto, indivíduos que recém sofreram mudas ou que desenvolveram brotos alares em preparação para muda final têm poucos ou nenhum protozoário (Lelis, 1992).

Diferentes espécies de protistas foram descritas e pesquisadas para várias espécies de cupins (Yamin, 1979; Brugerolle, 2005 a,b). Entretanto, a biota simbiote de muitas espécies ainda não tem sido explorada.

Espécies de protozoários foram reportadas para *C. brevis* por Yamin (1979), sendo elas

Calonympha grassii Foa, *Devescovinia cometoides* De Mello Brito, *D. striata* Foa, *Foaina humillis* Kirby, *F. minuta* De Mello, *F. reflexa* Kirby, *Hexamastix conclaviger* Kirby, *H. disclaviger* Kirby, *Oxymonas brevis* Zellig, *Snyderella bandeirantium* De Mello, *Tricercomitus brasiliensis* De Mello, *T. divergens* Kirby. Devido a ativa dependência dos cupins pelos simbiossitos intestinais no que se refere a digestão da madeira, existe uma correlação entre a morte de um ou mais componentes da fauna intestinal e a morte destes insetos (Perrot, 2003).

Estudos demonstrando a alteração na população de protozoários de cupins subterrâneos como consequência da ingestão de diferentes tipos de madeira ou extratos de plantas têm sido registrados, sendo a perda total ou diminuição da fauna intestinal devidas a presença de compostos químicos da madeira (Mauldin *et al.*, 1981; Carter *et al.*, 1983; Cook & Gold, 2000; Maistrello *et al.*, 2002; Alfazairy, 2004; Ahmed *et al.*, 2006),.

Estes resultados indicam que uma completa e normal funcionalidade da fauna intestinal é essencial para a sobrevivência dos cupins.

2.2 Controle de cupins

Os inseticidas de origem química são utilizados para suprir mais de 90% do controle de pragas (Pragnell, 2003).

A demanda do mundo por biocidas está crescendo rapidamente. Aliado ao crescimento da demanda, as regiões mais desenvolvidas do mundo estão sendo regidas por legislações cada vez mais exigentes com relação aos produtos biocidas, restringindo ou proibindo o uso de alguns produtos tradicionalmente utilizados (Brand *et al.*, 2006). O uso

generalizado e excessivo de inseticidas acarreta problemas de toxicidade geral e inespecífica, portanto, do ponto de vista puramente ecológico não seria o método de controle recomendado (Pragnell, 2003).

Segundo Viegas Júnior (2003) o uso de inseticidas consome, mundialmente, valores da ordem de bilhões de dólares na tentativa de controlar insetos. Os produtos naturais inseticidas foram muito utilizados até a década de 40, quando os produtos sintéticos passaram a ganhar espaço a partir da II Guerra Mundial, devido a pesquisas em produtos biocidas. Estes mostraram-se muito mais potentes e menos específicos que os naturais, até então utilizados no controle de pragas agrícolas, e foram quase totalmente substituídos.

A utilização de inseticidas pode ser vista de forma bastante genérica no século XX, segundo três fases, de acordo com Viegas Júnior (2003). Durante os primeiros 50 anos predominaram os produtos inseticidas naturais de origem orgânica e inorgânica. Nas décadas de 50 a 70, logo após a II Grande Guerra, ocorreu uma explosão no desenvolvimento da síntese orgânica, inclusive de produtos com atividade inseticida. Passaram a ser utilizados o hexacloroexano, DDT, aldrin, dieldrin e clordano. O controle químico de cupins teve sucesso com o uso destes inseticidas considerados eficientes, mas que foram banidos do mercado devido aos seus efeitos adversos ao meio ambiente. Novos produtos cupinidas foram testados, com características totalmente distintas dos organoclorados, incluindo organofosforados e piretróides (Su *et al.*, 1999; Laffont & Berti-Filho, 2000).

O efeito desta nova concepção refletiu-se nas décadas seguintes, quando novos produtos passaram a ser planejados e sintetizados, buscando maior seletividade aos insetos alvo, procurando preservar os demais animais do mesmo habitat, incluindo predadores naturais dos insetos indesejados (Vieira & Fernandes, 1999).

De acordo com Matsumura (1987), a perda de eficiência dos inseticidas depois de um tempo de aplicação é devida a seleção de populações de insetos resistentes, o que resulta em um aumento populacional da praga. Os insetos geram resistência a novos inseticidas numa velocidade muito rápida, tendo sido constatado casos de resistência principalmente aos inseticidas organofosforados e piretróides.

Um grande número de fatores, ecológicos, sociais, políticos e econômicos, têm aumentado a motivação para o desenvolvimento de outros métodos de controle de pragas, que não implica apenas o uso de novas substâncias termiticidas, mas também melhorias no método de aplicação e integração entre vários métodos de controle.

O controle microbiano é uma das opções, especialmente para o controle de cupins subterrâneos e de montículo, onde a principal vantagem é a baixa toxicidade dos patógenos para organismos não alvos (Fernandes & Alves, 1991; Grace, 1997). O controle biológico *sensu stricto* implica o uso de patógenos naturais ou introduzidos ou de inimigos naturais (predadores) para o controle das espécies-praga. Predadores especializados são muito limitados em número, possivelmente devido ao habitat protegido no qual os cupins vivem (Grace, 1997).

Reguladores de crescimento de insetos exibem uma variedade de efeitos disruptivos em cupins. Muitos destes químicos induzem o desenvolvimento de soldados e pré-soldados supérfluos, causam anormalidades morfológicas (intercastas), inibem alimentação, entre outros efeitos. O hormônio juvenil é um hormônio presente em todos os insetos e tem papel vital no crescimento, desenvolvimento e reprodução. Sua principal função é retardar o desenvolvimento do adulto e é, portanto, responsável pela manutenção das características larvais ou ninfais, durante a vida pré adulta (Oliveira *et al.*, 1986). No estudo realizado por

Amaral (1998), o autor verificou a ação do metoprene, análogo do hormônio, sobre pseudergates de *C. brevis*, onde houve diferenciação desta casta em soldados.

Outro método utilizado é a fumigação pelo calor ou frio extremo que matam os cupins-de-madeira-seca pois mantém temperaturas que excedem o mínimo e máximo fisiológico tolerado por estes insetos (Costa-Leonardo & Torne, 1995; Rust *et al.*, 1997). Embora teoricamente, a fumigação pelo calor possa ser empregada na eliminação de estruturas inteiras, na prática ela é usada para tratamento de áreas menores, sendo uma desvantagem desta técnica o seu valor econômico, pois é necessário uma grande quantidade de equipamentos, além do tempo necessário para aquecer grandes estruturas (Costa-Leonardo & Torne, 1995).

Outro método muito estudado atualmente é a utilização de produtos naturais derivados de plantas (Serit *et al.*, 1991, 1992; Fernandes *et al.*, 2002; Maistrello *et al.*, 2002; Leite *et al.*, 2005; Fokialakis *et al.*, 2006; Ballesta-Acosta *et al.*, 2008; Barros *et al.*, 2008), com potencial para serem utilizados no controle de insetos-praga.

2.2.1 Produtos Naturais

O estudo dos Produtos Naturais é uma antiga ciência que tem evoluído e mudado no decorrer dos séculos (Torssel, 1983). A partir do século XVIII começou-se a deixar de lado os mitos e a magia como base do uso dos extratos vegetais, iniciando-se o seu uso de forma cada vez mais racional. Esta racionalização baseou-se na química, e iniciou-se com o desenvolvimento sistemático dos métodos para separar, purificar e analisar os compostos provenientes dos organismos vivos (Nakanishi, 1992). O campo de estudo relacionado com

os Produtos Naturais acompanhou este desenvolvimento, e os conceitos básicos que se tinha sobre eles também evoluiu. À medida que se isolavam e analisavam substâncias, era acumulada muita informação, levando à identificação de grandes vias comuns de origem para os diversos grupos de compostos.

A química ecológica é o estudo da interação entre seres vivos mediada por compostos químicos, e é um dos avanços conceituais recentes mais importantes relacionados aos Produtos Naturais (Oldham & Boland, 1996). Atualmente, os estudos sobre Produtos Naturais incluem química, determinação estrutural, biossíntese e bioatividade dos compostos isolados (Shapiro, 1991; Pupo *et al.*, 2007).

As plantas são uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais se constituem em modelos para síntese de um grande número de fármacos. Geralmente estas substâncias encontram-se na planta formando misturas complexas, onde os diferentes componentes presentes se completam e reforçam sua ação sobre o organismo.

Os produtos naturais são classificados como metabólitos primários ou secundários. Os lipídios, os carboidratos, as proteínas e os ácidos nucleicos são metabólitos primários. Estão relacionados com o crescimento e a reprodução dos seres vivos (Pickett *et al.*, 1997). São constituintes universais de todas as células.

Os metabólitos secundários têm características particulares em sua distribuição, tanto do ponto de vista taxonômico como ontogenético (Hegnauer, 1969; Waterman, 1999). Os metabólitos secundários são derivados de compostos que participam em processos fisiológicos primários. O Fosfoenol Piruvato (PEP) e a eritrosa-4-fosfato (E4P) estão no início da rota metabólica do ácido chiquímico, por sua vez o início biossintético de uma

ampla gama de metabólitos secundários (Bruneton, 1995). Nas plantas, metabólitos secundários como alcalóides, cumarinas, glucosinolados e glucosídeos cianogénicos, são derivados dos aminoácidos, que são metabólitos primários (Berenbaum, 1995). Outros metabólitos secundários, como poliquétidos e terpenos, têm como precursor comum a acetilcoenzima A.

Embora qualquer tecido ou célula vegetal tenha a capacidade de biossintetizar metabólitos secundários, este processo ocorre somente em alguns tecidos ou mesmo em células especiais, em função do grau de diferenciação e desenvolvimento dos mesmos. Em alguns casos, a produção pode estar restrita a um estágio específico do desenvolvimento do vegetal ou a determinadas condições ecológicas ou ambientais o que muitas vezes dificulta sua extração e purificação (Santos, 2000).

Na Figura 2, podem ser observados os metabólitos derivados do acetato (via ciclo do ácido cítrico, via mevalonato ou produtos de condensação), representados pelos metabólitos de forma livre, denominados agliconas, e os heterosídeos, ligados a unidades de açúcar (Santos, 2000).

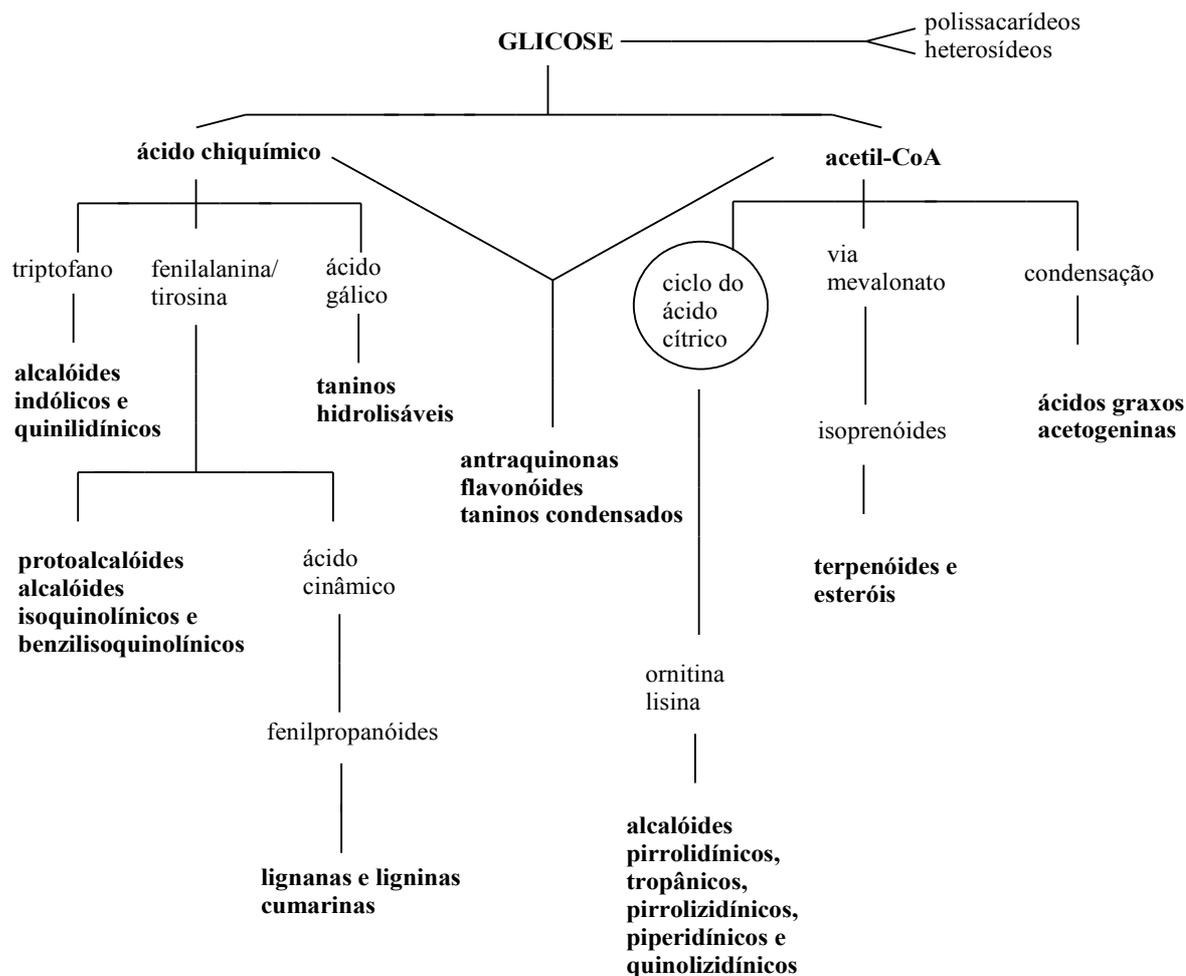


Figura 2. Ciclo biossintético dos metabólitos secundários. Fonte: Santos (2000).

Até pouco tempo, os metabólitos secundários eram considerados substâncias inúteis ou derivados de falhas metabólicas, até que foram sendo descritas diferentes funções para os mesmos (Baas, 1989), por exemplo: regular a composição química das plantas e/ou das frutas, iniciar ou terminar a dormência de sementes e tubérculos, controlar o tamanho da planta ou do órgão, controlar a floração, controlar a maturação e o desenvolvimento das frutas e aumentar

a resistência a pragas.

Em sua evolução, as plantas têm desenvolvido mecanismos de defesa contra agressões provenientes do meio ambiente, e um caso importante é a defesa dos vegetais frente a depredadores e parasitas. Acredita-se que a maioria dos mecanismos defensivos das plantas são de caráter químico e se devem a existência de metabólitos secundários (Harborne, 1993).

O emprego de produtos “bioracionais” para o controle de pragas tem se tornado muito popular na atualidade, como uma maneira “natural” de controle, em oposição ao controle usando agroquímicos. O termo “bioracionais”, foi definido por Stansly & Liu (1995) como “um tipo de material natural ou sintético, com atividade contra populações de pragas, mas relativamente inócuos a organismos não alvo. Muitos destes produtos são formulações de extratos e produtos naturais, sendo o principal atrativo destes produtos seu baixo impacto ambiental, pois, em geral, são facilmente biodegradáveis.

De acordo com Roel (2001), a extensão dos efeitos e o tempo de ação de produtos naturais são dependentes da dosagem utilizada, de maneira que a morte ocorre nas dosagens mais elevadas e os efeitos menos intensos e mais duradouros nas dosagens menores. A utilização de doses subletais causa redução das populações a longo prazo e necessita de menores quantidades de produtos. As doses letais muitas vezes tornam sua utilização inviável pela grande quantidade necessária.

Quando se utilizam produtos naturais com atividade inseticida, os seguintes efeitos nos insetos podem ser observados: repelência, inibição da oviposição, inibição da alimentação, inibição do crescimento, alterações do sistema hormonal, alterações morfogênicas, alterações no comportamento sexual, esterilização dos adultos, mortalidade na fase imatura ou

adulta, entre outros (Gallo *et al.*, 2002). Dessa forma, a mortalidade do inseto é apenas um dos efeitos e nem sempre esse deve ser o único objetivo.

É importante salientar que a toxicidade de uma planta contra insetos não a qualifica necessariamente como um inseticida. Vários aspectos devem ser levados em consideração tais como: forma de extração e conservação dos extratos, eficácia em baixas concentrações, ausência de toxicidade para mamíferos e animais superiores, fácil obtenção, manipulação e aplicação e viabilidade econômica (Viegas Júnior, 2003).

Para Bueno (2005), o uso de produtos naturais deve ser incentivado, mas antes devem ser submetidos a todos os procedimentos de segurança, da mesma forma que os produtos sintéticos. Segundo o autor, pelo menos quatro aspectos importantes devem ser considerados: a atividade biológica de um composto químico é mais uma função de sua estrutura do que de sua origem; as propriedades biológicas, especialmente as relativas à segurança de um produto químico dependem de sua estrutura, de como ele é utilizado ou da forma que ele é exposto no ambiente; a simples percepção sobre riscos nem sempre são consistentes com riscos reais e, ainda, um determinado composto químico dentro da planta, está interagindo como outros compostos e está num sistema em equilíbrio, mas quando ele é isolado, suas propriedades podem não ser as mesmas.

Novas substâncias são necessárias, portanto, para o efetivo controle de pragas, oferecendo maior segurança, seletividade, biodegradabilidade, viabilidade econômica e aplicabilidade em programas de controle de pragas e baixo impacto ambiental. Esta preocupação também refere-se aos novos produtos para o tratamento preservante da madeira.

De acordo com Brand *et al.* (2006), o desenvolvimento de pesquisas sobre preservantes de madeira está em uma fase crucial, sendo necessário o seu direcionamento

para a análise de produtos com menor potencial de danos ambientais e à saúde de outros organismos. Porém, apesar da eficiência comprovada de algumas alternativas ambientalmente corretas para o tratamento da madeira, as informações sobre sua viabilidade econômica ainda são difíceis de serem encontradas, ou ainda nem começaram a ser avaliadas.

2.3 Resíduos industriais de lima-ácida (*C. latifolia* Tanaka)

Além dos produtos naturais derivados diretamente do metabolismo secundário e que atuam na defesa das plantas contra insetos, pode-se encontrar produtos de origem natural, de fácil obtenção e viabilidade econômica, como por exemplo os resíduos agroindustriais.

A economia brasileira é uma das mais importantes do mundo baseadas na agricultura, produzindo e exportando açúcar, soja, frutas, entre outros. Entretanto, a grande produção desses produtos agrícolas gera uma grande quantidade de resíduos. As perspectivas de aproveitamento de resíduos agroindustriais aumentam na medida que, a partir deles, produtos de alto valor sejam gerados. Se enquadram neste caso, por exemplo, as cascas de frutas cítricas, abundantemente produzidas na indústria de sucos. As cascas de cítricos contém vários componentes de interesse comercial: óleos essenciais, matérias corantes diversas, pectinas, açúcares, ácidos, substâncias proteicas, enzimas, vitamina C e heterosídeos livres (Costa, 1994). Uma das aplicações em potencial desses resíduos pode ser a utilização como fonte de carbono em bioprocessos para obtenção de produtos químicos, compostos de aromas e metabólitos secundários biologicamente ativos (Uenojo & Pastori, 2007).

Vários trabalhos têm mostrado que o óleo essencial extraído da casca e sementes de várias espécies de citrus contém compostos químicos que exibem atividade inseticida e

antifúngica (Serit *et al.*, 1991; Fernandes *et al.*, 2002; Salvadore *et al.*, 2004; Siskos *et al.*, 2008).

O Brasil se destaca como o segundo maior produtor de frutos cítricos e o maior exportador de sucos cítricos, tendo a lima-ácida (limão Tahiti), como um dos seus frutos de maior relevância comercial (Mendonça *et al.*, 2006).

O Estado do Rio Grande do Sul tem mostrado grande potencial para o cultivo de frutas cítricas. A produção destas frutas está concentrada principalmente em três regiões: Montenegro, Lajeado/Estrela e Caxias do Sul. Com relação à produção de laranjas, as três regiões são responsáveis por cerca de 42% da produção total. A cidade de Montenegro é responsável por 34% da produção de tangerina no Estado. Cerca de 50% dos limões produzidos no Estado referem-se à região de Montenegro e Lajeado/Estrela.

A lima-ácida é um fruto de origem tropical, de exploração econômica relativamente recente. É uma das espécies de citrus de maior precocidade, apresentando, já a partir do terceiro ano, uma produção significativa (Coelho, 1993). O volume do material descartado pelas indústrias na obtenção do suco é, em média, de 45% dos frutos. Este resíduo apresenta grande potencial para ser usado como matéria-prima de excelente qualidade para a indústria (Mendonça *et al.*, 2006).

O peso médio do fruto da lima-ácida é de 170g, sendo a casca geralmente fina, com superfície lisa e cor amarelo pálido na etapa de maturação. É composta de duas frações distintas: o “flavedo” ou epicarpo e o “albedo” ou mesocarpo, facilmente separáveis da polpa, que corresponde à fração comestível do fruto. No “flavedo” encontram-se substâncias químicas como os carotenóides, vitaminas e óleo essencial (Coelho, 1993).

O óleo essencial é um dos subprodutos da indústria cítrica de grande valor agregado. Durante o processo industrial para sua obtenção, vários resíduos são produzidos e descartados, sendo principalmente utilizados para a fabricação de ração animal (Yamaka, 2005).

Em escala industrial a obtenção do óleo essencial de cítricos ocorre paralelamente ao processamento de suco. Quando o fruto é pressionado nos copos do extrator, as bolsas de óleo da casca se rompem. Anéis em volta dos copos jogam jatos de água que removem o óleo que está na casca. Da mesma forma que o suco, a emulsão água-óleo vai para o piso térreo da planta, onde estão posicionados os “finishers”, que removem os sólidos da emulsão, e as centrífugas. No processo de extração do óleo há três etapas de separação deste por centrifugação (Yamanaka, 2005).

Na primeira etapa de concentração a água separada é chamada de água amarela, que é encaminhada para a fabricação de ração. As águas da segunda etapa de centrifugação (clarificação) são redirecionadas para os extratores (remoção do óleo essencial da casca) e para o processo de ração. O polimento é a etapa final de centrifugação. A seguir, temos a “winterização”, que é a separação da cera presente no óleo essencial pelo resfriamento dele até que as ceras e ácidos cristalizem (Yamanaka, 2005). Esta cera, considerada um resíduo da indústria cítrica é encaminhada para a fabricação de ração animal (Figura 3).

Conhecendo o potencial de aproveitamento dos resíduos industriais de frutos cítricos e a falta de trabalhos que caracterizem a sua composição química, o estudo destes resíduos como uma alternativa à utilização de preservantes sintéticos na madeira, que tanto prejudicam o meio ambiente e causam problemas à saúde humana é importante e de real interesse econômico e ambiental.

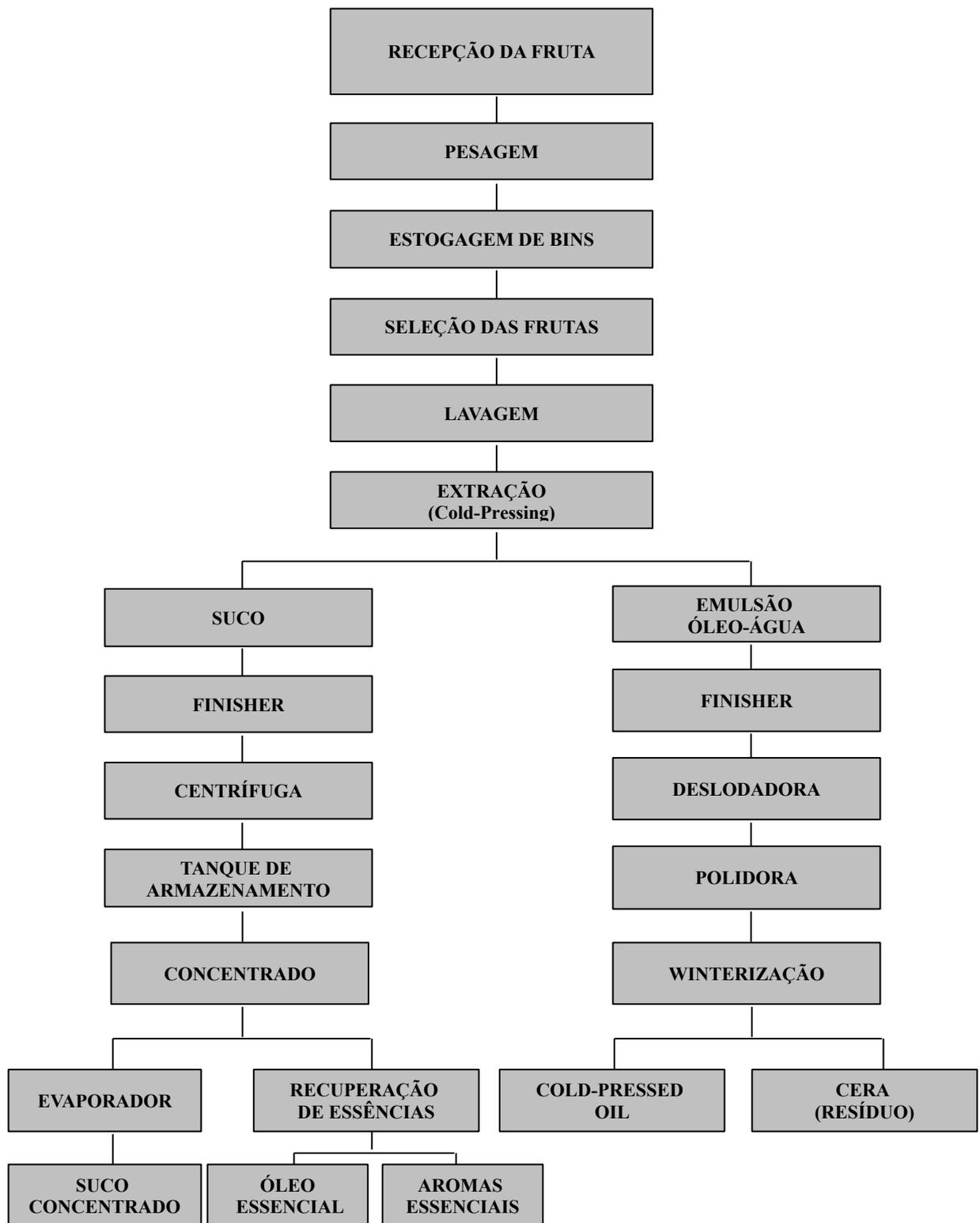


Figura 3. Fluxograma do processo de produção de suco e subprodutos da indústria de cítricos. Fonte: Dr. Caren Frizzo (comunicação pessoal).

2.3.1 Caracterização química da cera industrial de citrus

Na indústria de cítricos, o termo cera é usado para designar substâncias não voláteis dissolvidas no óleo essencial durante a extração industrial (Braddock, 1999).

A fração volátil dos óleos essenciais de frutas cítricas compreende hidrocarbonetos monoterpênicos e sesquiterpênicos e seus compostos oxigenados tais como alcoóis, aldeídos, cetonas, ésteres e óxidos como também hidrocarbonetos alifáticos, aldeídos, cetonas, ácidos e ésteres de compostos fenólicos e seus derivados (Sato *et al.*, 1996; Dugo *et al.*, 1999a). Os terpenos representam a principal classe de compostos, constituído principalmente de *d*-limoneno, monoterpene presente na maioria dos óleos essenciais de citrus (Lanças & Cavichioli, 1990). Os terpenóides oxigenados, que são os constituintes menores, contribuem com maior intensidade no aroma dos óleos. Diferenças na composição de extratos de diferentes espécies de cítricos são mais quantitativos que qualitativos (Huet, 1991). Além disso, a época e local de coleta, forma de cultivo, condições climáticas, idade do material vegetal, período e condições de armazenamento, podem influenciar na composição do óleo (Farias, 1999).

A fração não volátil caracteriza-se pela presença de hidrocarbonetos, ácidos graxos, esteróis, carotenóides, ceras, compostos oxigenados heterocíclicos (cumarinas, furanocumarinas como por exemplo psoralenos e flavonas polimetoxiladas). Cumarinas e psoralenos são compostos comuns nas plantas da família Rutaceae e juntamente com as flavonas metoxiladas estes compostos representam uma grande porção do resíduo não volátil dos óleos de citrus, aproximadamente 10 a 15% no óleo de lima-ácida (Dugo *et al.*, 1999b).

As cumarinas constituem um grupo importante de compostos naturais. A cumarina

per se é o esqueleto básico de todos os outros derivados e é considerada quimicamente como a fusão dos anéis benzeno e 1,2-pirona (primeiro átomo numerado do ciclo é o oxigênio sem dupla ligação) (Costa, 1994). De acordo com Dominguez (1973) & Santos (2000), as cumarinas podem ser classificadas como segue: cumarinas simples, que compreendem os derivados da cumarina *per se* contendo radicais hidroxil, alcóxi, alquil, bem como as formas glicosídicas. A oxigenação ocorre em um ou mais das seis posições do núcleo da cumarina, sendo que as cumarinas sem átomos de oxigênio são de rara ocorrência. As furanocumarinas são compostos que consistem de um anel furano (anel de 5 membros) condensados ao núcleo cumarínico, e se subdividem em lineares e angulares com substituintes ligados às posições dos demais anéis benzenóides (C5, C6, C7 e C8). Piranocumarinas são análogas às furanocumarinas, porém com anel pirano (6 membros). Cumarinas com substituintes no anel pirona que são cumarinas com grupos substituintes na posição C3 e C4, e cumarinas miscelâneas, que compreendem biscumarinas (cumarinas diméricas como o dicumarol). As isocumarinas que com relação a cumarina, tem o átomo de oxigênio e o carbono ligado ao oxigênio por dupla ligação invertidos de posição.

A Figura 4 mostra a estrutura básica das cumarinas e furanocumarinas (ex: psoraleno), exemplos de compostos heterocíclicos oxigenados presentes na fração não volátil dos óleos de citrus. Na posição numerada, cumarinas e psoralenos podem conter os grupos hidroxil, metoxil, isopentenil, isopenteniloxi e geraniloxi (Dugo *et al.*, 1999b).



Figura 4. Estrutura química de compostos heterocíclicos encontrados em citrus (Dugo *et al.*, 1999b).

De acordo com Dugo *et al.* (1999b), a literatura dos anos de 1930 até aproximadamente 1970 registra numerosas separações por CCD (cromatografia de camada delgada) para a fração não volátil de óleos de citrus, especialmente cumarinas e furanocumarinas, com o intuito de isolar os compostos responsáveis pela absorção UV.

Muitos métodos desenvolvidos para análise por CCD usaram sílica gel como fase estacionária e misturas de hexano ou ciclohexano com variável quantidade de acetato de etila como fase móvel (Dominguez, 1973; Dugo *et al.*, 1999b; Ugaz, 1994). Numerosos métodos qualitativos e quantitativos para análise de cumarinas são realizados, sendo que este grupo de compostos apresenta bandas de absorção ultravioleta características a 274 e 311nm, as quais são atribuídas aos anéis de benzeno e pirona, respectivamente (Ugaz, 1994).

A Tabela 1 lista algumas das cumarinas e furanocumarinas identificadas no óleo essencial de lima por Dugo *et al.* (1999b).

Tabela 1. Compostos químicos do grupo das cumarinas e furanocumarinas identificados na fração não volátil do óleo essencial de lima. Fonte: Dugo *et al.* (1999b).

| Cumarinas | Furanocumarinas |
|-----------------------------------|------------------------------------------------------------------|
| Herniarina (7-metoxicumarina) | Bergapteno (5-metoxipsoraleno) |
| Citropteno (5,7-dimetoxicumarina) | Bergamotina (5-geraniloxipsoraleno) |
| 5-isopenteniloxi-7-metoxicumarina | Oxipeucedanina (5-(2,3-epoxi-isopentiloxi)psoraleno) |
| 5-geraniloxi-7-metoxicumarina | Oxipeucedanina hidrato (5-(2,3-diidroxii-isopentiloxi)psoraleno) |
| - | Isoimperatorina (5-isopenteniloxipsoraleno) |
| - | 8-geraniloxipsoraleno |
| - | Heraclenina (8-4,2,3-epoxi-isopentiloxi)psoraleno |
| - | Imperatorina (8-isopenteniloxipsoraleno) |
| - | 5-geraniloxi-8-metoxipsoraleno |
| - | Isopimpinellina (5,8-metoxipsoraleno) |

A espectrometria de massas tem sido de grande utilidade em determinações estruturais de produtos naturais, particularmente em cumarinas e furanocumarinas. Um exemplo de fragmentação é citado para os compostos 7-hidroxi e 7-metoxicumarina, onde as moléculas mostram perdas características de monóxido de carbono, observando-se no primeiro caso um

forte íon molecular a m/z 162 com um pico base a m/z 134 e no segundo caso, um m/z 176 e m/z 148, respectivamente, sendo neste último caso observado um fragmento a m/z 133 com perda do grupo -CH₃ (Ugaz, 1994).

As cumarinas são substâncias fluorescentes, comumente fotossensíveis. Apesar da abundância deste grupo de compostos na natureza e a sua diversidade estrutural, o seu papel fisiológico é conhecido parcialmente (Domínguez, 1973).

2.4 Bioatividade de produtos naturais contra insetos-praga

Extratos de plantas vêm sendo utilizados pelo homem desde a Idade Antiga, numa prática que persiste até hoje, com mais de 2000 espécies de plantas conhecidas por suas propriedades inseticidas (Viegas Júnior, 2003). Várias pesquisas têm mostrado que compostos com alta bioatividade contra insetos podem ser encontrados em óleos essenciais, flavonas e compostos fenólicos.

Os efeitos repelentes de limonóides de *Citrus* (Serit *et al.*, 1991) e de plantas das famílias Meliaceae e Rutaceae sobre cupins foram testados por Serit *et al.* (1992).

Embora tenha sido registrada uma ação antialimentar potente de azadirachtina contra uma variedade de insetos, o mesmo não foi observado no estudo de Serit *et al.* (1992). De acordo com os autores, a pobre estabilidade da azadirachtina e sua aparente falta de ação antialimentar absoluta, observada nos testes de laboratório contra cupins limitam sua utilização no controle de cupins. Entre os limonóides de Rutaceae testados no trabalho duas substâncias, obacunona e nomilina, foram eficientes em prevenir o consumo de papel pelo cupim da espécie *Reticulitermes speratus* Kolbe.

Há pelo menos três vantagens para o uso de obacunona e nomilina no controle de térmitas. Primeiro, limonóides de Rutaceae são facilmente disponíveis em grandes quantidades como subprodutos do processo industrial de citrus. Segundo, obacunona e nomilina poderiam reduzir o número da microflora intestinal ninfal, importantes na sobrevivência dos cupins. Terceiro, obacunona e nomilina não são tóxicos, até mesmo para os térmitas. Por outro lado o uso de azadirachta como composto para o controle de cupins têm uma limitada aplicação devido a sua pobre disponibilidade como fonte natural (Serit *et al.*, 1992).

A eficiência de óleos essenciais de citrus contra *Culex pipiens* e *Musca domestica* também foi descrita por Shalaby *et al.* (1998), os quais observaram que o óleo da casca do limão foi o mais efetivo contra larvas e adultos de *C. pipiens* e o mais efetivo para larvas de *M. domestica*. Por outro lado, os autores observaram que o óleo da casca de laranja foi pouco efetivo contra larvas e adultos de ambas as espécies, demonstrando que os óleos essenciais de citrus podem ser considerados promissores para o controle dos insetos estudados.

A atividade biológica de óleos de sementes de *Citrus* (*C. sinensis*, *C. limon*, *C. reticulata*) foi avaliada por Fernandes *et al.* (2002), para verificar o efeito inseticida dos extratos à formiga cortadeira *Atta sexdens* e ao seu fungo simbionte. Os resultados indicam que os três óleos analisados apresentaram efeitos tóxicos para os organismos estudados. O óleo de tangerina foi o mais tóxico, sendo este efeito relacionado a presença de limonóides.

Com a mesma espécie de formiga citada anteriormente, Leite *et al.* (2005), avaliaram a atividade inseticida de diferentes extratos de plantas da família Meliaceae. Neste estudo, os autores isolaram um limonóide (cidapesina B), que juntamente com outros compostos presentes ocasionaram alta mortalidade aos insetos estudados.

Maistrello *et al.* (2002), avaliaram a atividade do óleo de vetiver ao cupim *Coptotermes formosanus* e seus simbioses intestinais e, de acordo com os ensaios laboratoriais realizados, observaram uma redução na atividade alimentar dos insetos e na abundância dos protozoários presentes no intestino, evidenciando um certo grau de toxicidade deste óleo aos cupins estudados.

Wandscheer *et al.* (2004), compararam a atividade inseticida de extratos etanólicos do fruto de *Melia azedarach* e *Azadirachta indica* em duas temperaturas diferentes, 25°C e 30°C, contra larvas do mosquito da dengue. Ambos extratos apresentaram atividade larvicida significativa, apesar do extrato de *A. indica* ter sido, de forma geral, mais efetivo que o extrato de *M. azedarach* nas condições testadas.

Arruda *et al.* (2003), avaliaram a toxicidade do extrato bruto etanólico da casca do caule de *Magonia pubescens* (Sapindaceae) em larvas de *Aedes aegypti* e verificaram que esse extrato induziu alterações principalmente no intestino médio do inseto. Tais alterações incluíram destruição total ou parcial das células, alta vacuolização citoplasmática, aumento do espaço subperitrófico e hipertrofia das células.

Seguindo o estudo com *M. pubescens*, Silva *et al.* (2004) fracionaram o mesmo extrato bruto obtendo nove frações, sendo a fração mais ativa, caracterizada como um tanino catéquico, com uma CL₅₀ de 3,1 ppm e CL₉₀ de 36,6 ppm.

Os efeitos de repelência e toxicidade de seis quinonas extraídas de *Diospyros sylvatica* foram avaliados por Ganapaty *et al.* (2004) contra o cupim subterrâneo *Odontotermes obesus* e os resultados indicaram alta taxa de mortalidade para os operários desta espécie após 48 horas de tratamento, sendo os compostos termílicos majoritários

identificados como plumbagina e isodiospirina.

O efeito do extrato metanólico de *Atlantia monophylla* (Rutaceae), foi testado em 3 espécies de mosquito por Sivagnaname & Kalyanasundaran (2004). Os autores observaram um efeito larvicida em *A. aegypti* e uma atividade pupicida em *A. stephesi*. Além disso, o extrato foi considerado seguro para três espécies de animais predadores.

Fecundidade, mortalidade e consumo alimentar do cupim *C. formosanus* Shiraki, foi avaliado por Boué & Raina (2003) em resposta a 5 flavonóides (genisteína, biochanina A, apigenina, quercetina e gliceolina). De acordo com os resultados, apigenina provou ser o flavonóide mais tóxico, sendo que biochanina A foi o mais efetivo na redução da fecundidade.

Alfazairy (2004), avaliou a atividade de três óleos essenciais extraídos de folhas e sementes das plantas medicinais *C. sempervirens* L., *E. citriodora* Hook F. e *T. distichum* L., contra flagelados simbiossitos encontrados no intestino do cupim-de-madeira-seca *K. flavicollis* Fabr., observando-se redução do número de flagelados nos tratamentos com os óleos de *T. distichum* (95-100% com 2-4 dias), seguido por *E. citriodora* (89-100%) e *C. sempervirens* (31-100%).

O efeito tóxico e anti-alimentar de 8 tiofenos extraídos de quatro espécies de *Echinops* foram testados contra cupins subterrâneos da espécie *C. formosanus* por Fokialakis *et al.* (2006). Segundo os autores, os compostos majoritários identificados como 2,2':5',2''-tertiofeno e 5'-(3-buteno-1-inil)-2,2'-bitiofeno, foram os mais ativos, sendo os mais tóxicos, com 100% de mortalidade dos insetos nas concentrações de 1 e 2% w/t e também foram os que apresentaram melhor efeito anti-alimentar.

O óleo de laranja foi testado contra cupins da espécie *C. formosanus* por Raina *et al.* (2007). Os autores observaram que quando expostos a ação do vapor do óleo, 96% e 45% dos cupins morreram em 5 dias na dose mais alta e mais baixa, respectivamente. A mortalidade no grupo controle foi de 4 a 7%. O consumo do papel filtro foi significativamente reduzido nas duas concentrações testadas de 2,5 e 5,0 ppm. Segundo os autores, provavelmente este efeito se deva a presença do limoneno, composto majoritário encontrado neste óleo.

Extratos encontrados na madeira têm um significativo efeito na sua durabilidade, como também podem atuar protegendo a madeira contra insetos xilófagos. Cheng *et al.* (2007), verificaram o efeito termiticida do óleo essencial extraído da madeira de coníferas contra o cupim *C. formosanus*, sendo a ação observada contra os insetos devido a toxicidade e repelência provocada pelos compostos presentes no óleo essencial.

Potencial anti-termítico de extratos de sementes de *Withania somnifera*, *Croton tiglium* e *Hygrophila auriculata* foi verificado por Ahmed *et al.* (2007) contra *O. obesus*. Os extratos ocasionaram mudança no comportamento de direção dos insetos, diminuição do número de colônias de bactérias presentes no intestino posterior, afetando também a atividade das enzimas presentes no intestino médio dos insetos. Com relação a este último aspecto, o trabalho dos autores foi o primeiro registro referente ao efeito de fitoquímicos no sistema enzimático do intestino de cupins.

Vários estudos recentes têm sido realizados, avaliando as propriedades inseticida e anti-alimentar de compostos de origem natural contra espécies pertencentes ao grupo dos lepidópteros e dípteros, sendo os resultados obtidos satisfatórios quanto aos efeitos investigados (Abdelgaleil *et al.*, 2008; Georges *et al.*, 2008; Messiano *et al.*, 2008).

2.4.1 Efeitos biológicos das cumarinas e furanocumarinas contra insetos-praga

O grupo das cumarinas e furanocumarinas possuem um espectro amplo de atividade biológica. No campo biotecnológico, este grupo químico vêm despertando grande interesse em função das diferentes bioatividades atribuídas a alguns de seus compostos como propriedades inseticidas, antiplasmodial, anti-alimentar e inibidora de crescimento (Berenbaum, 1981; Escoubas *et al.*, 1992; Oketch-Rabah *et al.*, 2000; Sharma *et al.*, 2006), sendo alguns trabalhos discutidos a seguir.

Uma série de experimentos foram conduzidos por Salvatore *et al.* (2004) para avaliar a toxicidade de extratos obtidos da casca do limão para a mosca das frutas *Ceratitis capitata*. Os extratos foram obtidos com diferentes solventes: dietil éter, acetato de etila e metanol. De acordo com os resultados a mistura de constituintes não polares da casca do limão com adição de citral, 5,7-dimetoxicumarina e linalol mostrou-se a mais eficaz para o tratamento de larvas e adultos de *C. capitata* em diferentes concentrações testadas. A capacidade de oviposição das fêmeas foi afetada, sendo esta dependente da exposição ao fotoperíodo.

Sharma *et al.* (2006) avaliaram a ação inseticida de uma cumarina extraída das folhas da espécie *Boenninghausenia albiflora* (Rutaceae) contra diferentes espécies de insetos pragas. Os autores verificaram que com o extrato bruto da planta houve 70% e 75% de mortalidade das pragas *Clostera cupreata* e *Plecoptera reflexa*, respectivamente. A cumarina aplicada pura provocou 80% e 85% de mortalidade contra as mesmas espécies na concentração de 1,0% w/v, sendo a mortalidade aumentada de maneira dose-dependente.

Em estudo realizado por Moreira *et al.* (2007), os autores isolaram uma cumarina

tóxica de *Ageratum conyzoides* (Compositae) para insetos pragas das espécies *M. Domestica* (Diptera), *Periplaneta americana* (Blattodea), *Rhysoperda dominica* (Coleoptera) e *Diaphania hyalinata* (Lepidoptera). Os resultados da curva dose-mortalidade evidenciaram que a espécie *P. americana* é a que possui mais alta homogeneidade de resposta ao composto testado, com uma DL_{50} de 3 mg/g. Quando comparada ao controle positivo (cumarina sintética) usando a mesma dose, a cumarina natural apresentou resultados similares de mortalidade.

Furanocumarinas (FC), derivados aromáticos tricíclicos da via dos fenilpropanóides, são metabólitos de defesa de várias espécies de plantas, incluindo as famílias Rutaceae e Apiaceae. FCs podem eliciar comportamentos e efeitos fisiológicos em insetos herbívoros, como atividade repelente e deterrente (Berenbaum, 1981).

Hadacek *et al.* (1994), realizaram um estudo onde isolaram, analisaram e verificaram a atividade inseticida de furanocumarinas lineares e outras cumarinas de *Peucedanum* (Apiaceae). Os autores observaram que bergapteno e imperatorina, furanocumarinas lineares, ocasionaram toxicidade pós-ingestória específica contra larvas da espécie *Spodoptera littoralis*.

Calcagno *et al.* (2002), avaliaram a atividade fagodepressora de 5 furanocumarinas, bergapteno, xantotoxina, psoraleno, imperatorina e angelicina contra larvas da lagarta *S. littoralis*. Os autores observaram que o sinergismo das FCs foi mais tóxico aos insetos do que os compostos isolados. As doses usadas foram de 0-10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ para furanocumarinas lineares e 0-30 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ para angelicina, uma FC angular.

Em estudo realizado por Stevenson *et al.* (2003), foi comprovada a ação deterrente

alimentar de quatro furanocumarinas lineares extraídas de frutas secas de *Tetradium daniellii* (Rutaceae) contra larvas de duas espécies de lepidópteros, *S. littoralis* e *Heliothis virescens*.

Em estudo recente realizado por Ballesta-Acosta *et al.* (2008), os autores testaram vários diterpenóides, flavonas, cumarinas e furanocumarinas extraídas de plantas contra larvas de *S. littoralis* para avaliar a ação anti-alimentar destes compostos. Os autores verificaram significativa atividade de alguns dos compostos, destacando-se a furanocumarina xantotoxina como tendo uma ação anti-alimentar bastante expressiva contra os insetos estudados.

Siskos *et al.* (2008), isolaram e identificaram os compostos biologicamente ativos presentes no extrato obtido da casca de *C. aurantium* e testaram o efeito das frações isoladas na viabilidade na mosca *Bactrocera oleae*. No estudo, os autores identificaram três compostos ativos através do fracionamento bioguiado, sendo que uma das frações obtidas ocasionou 96% de mortalidade para os adultos da espécie estudada. Os compostos identificados como bioativos são do grupo das cumarinas e furanocumarinas, sendo que também foi observado através dos resultados que um composto foi tóxico individualmente, enquanto outros, como por exemplo o bergapteno (furanocumarina), foi bioativo atuando sinergicamente com 6',7'-epoxibergamotina.

As ceras de lima-ácida (*C. latifolia*) e laranja (*C. sinensis*), provenientes da extração industrial do óleo de citrus, foram testadas contra o cupim-de-madeira-seca *C. brevis* por Barros *et al.* (2008), sendo os resultados obtidos com as frações da cera de lima-ácida promissores quanto a sua toxicidade aos cupins estudados. Entre os compostos identificados nas frações mais ativas destacam-se limonina e furanocumarinas, tais como bergapteno, pimpinelina, isopimpinelina e xantotoxina.

No ramo da preservação de madeira, a eficiência de compostos naturais há muito tem sido avaliada, visando encontrar substâncias que possam ser empregadas na formulação de produtos preservantes da madeira. É importante também que estes produtos não só aumentem a vida útil de madeiras de baixa durabilidade, mas também causem menor dano ao meio ambiente.

Conhecendo a real potencialidade dos produtos naturais derivados de plantas contra insetos-praga descrita anteriormente, o estudo da atividade da cera industrial de lima-ácida e seus compostos contra cupins da espécie *C. brevis* resulta de particular interesse, especialmente por ser um resíduo natural, abundante e de fácil obtenção na indústria cítrica, com o qual seria possível desenvolver um produto comercial para ser aplicado na madeira, atuando como um preservante, apresentando potencial como uma alternativa de fornecer um novo valor agregado a um subproduto da indústria cítrica.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta e identificação de cupins

Os cupins foram coletados em residências da região serrana e outras localidades do Rio Grande do Sul. A madeira coletada foi serrada e armazenada dentro de bacias plásticas com tela na parte superior, sendo utilizada no decorrer do experimento. Em laboratório, a madeira foi estocada em condições adequadas de temperatura e umidade (24 ± 1 °C e $70 \pm 5\%$).

À medida que os bioensaios foram sendo realizados, os cupins foram removidos cuidadosamente da madeira. A espécie coletada foi identificada pelo Dr. Luiz Roberto Fontes, especialista em cupins (São Paulo, SP).

3.2 Obtenção e identificação química dos compostos presentes na cera industrial de lima-ácida

A cera foi fornecida pela Biocitrus Ltda, indústria localizada no município de Montenegro, RS.

Para determinar as frações ativas do produto, o fracionamento das amostras e identificação dos compostos presentes foram realizadas na Facultad de Química, Universidad de La Republica (UdelaR), Montevideo, Uruguai.

3.2.1 Procedimentos gerais

Para a realização das análises foram utilizados reagentes de alta pureza (Sigma Aldrich).

As placas de Cromatografia em Camada Delgada (CCD) utilizadas foram Polygram Sil G/UV₂₅₄; 0,25 mm Layer (Macherey-Nagel).

Para a VLC (Vacuum Liquid Chromatography), a Sílica Gel utilizada foi grade 60, 60 Å (Merck, Darmstadt, Germany) (Hostettman *et al.*, 1986).

Todas as soluções foram rotaevaporadas à pressão reduzida com temperatura menor do que 40°C.

A análise por Cromatografia Gasosa (GC) foi realizada empregando um GC-Shimadzu 17-A equipado com uma coluna capilar SE-52 (60°C 8' - 3°C/min - 180°C - 20°C/min - 250°C -25' a 250°C), empregando Helio com gás portador e detector FID (320°C).

A análise por Espectrometria de Massa (GC-MS) foi realizada empregando um cromatógrafo de gases GC-Shimadzu 17-A com uma coluna capilar SE-52 (25m, 0,25 d.i., 0,25µm de espessura), gás portador Helio, acoplado com um MS quadrupolar Shimadzu QP5050 com EI como modo de ionização/fragmentação.

3.2.2 Fracionamento e análise química

O óleo essencial presente na cera foi separado por hidrodestilação em aparelho Clevenger, descrito por Mechkovski & Akerele (1992). A massa de 31,7g da cera foi colocada em

balão de fundo redondo juntamente com cerca de 800 mL de água. Após foi realizada a hidrodestilação em aparelho Clevenger, obtendo-se 10,7818g (34%) de óleo essencial.

O óleo foi analisado por GC e os picos correspondentes aos distintos compostos foram identificados com base na co-cromatografia com padrões e análise de tempo de retenção (Tr) relativos aos cromatogramas obtidos (Kovats, 1958).

A fase aquosa resultante após o processo de hidrodestilação por Clevenger foi extraída em balão de decantação quatro vezes com 200 mL de Acetato de Etila (AcOEt). A solução obtida da partição com AcOEt foi rotaevaporada até total evaporação do solvente. Com o extrato sólido, ou seja, a fração não volátil, foi realizado uma coluna de VLC contendo 50 g de Sílica Gel utilizando um gradiente de solventes: Hexano; Hexano: AcOEt (80:20); Hexano: AcOEt (50:50); AcOEt, sendo obtidas quatro frações assim denominadas: Fração 1, Fração 2, Fração 3 e Fração 4.

As frações obtidas foram controladas por CCD nas condições anteriores sendo comparadas com padrões de 8-metoxipsoraleno (Sigma – St. Louis – Mo –USA), 7-hidroxycumarina e 7-etoxicumarina (Fluka AG.Chemische Fabrik Buchs SG, Switzerland) e Aesculina (Fluka AG. Chemische Fabrik Buchs SG, Switzerland) (Hildeberg *et al.*, 1996). Inicialmente, foram utilizados como reveladores lâmpadas de UV 365 e 254nm. Em seguida, os compostos foram detectados pulverizando-se as placas de CCD com 5% de CuSO₄ (sulfato de cobre) em 10% aq. H₃PO₄ (ácido fosfórico), seguido por aquecimento em estufa a 20 – 140°C (4°C/min) (Davyt *et al.* (1995). Como fase móvel foram utilizados os solventes Hexano:AcOEt (50:50).

As quatro frações foram analisadas quimicamente por GC e GC/MS para determinar a estrutura química dos compostos presentes.

A Figura 5 apresenta um esquema resumido do fracionamento bioguiado realizado com a cera industrial de lima-ácida, apresentando as frações testadas nos ensaios biológicos.

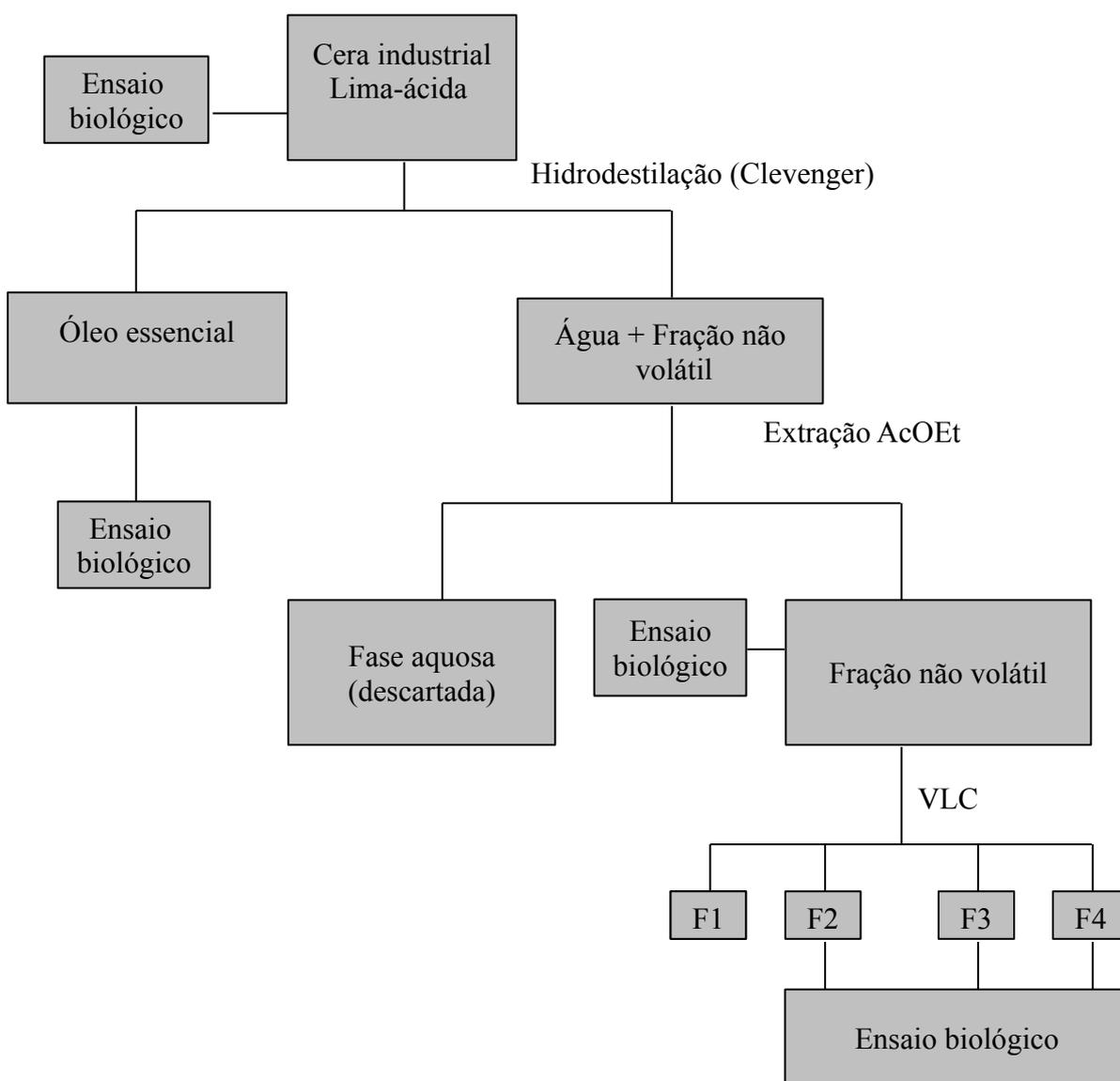


Figura 5. Fracionamento bioguiado realizado com a cera industrial de lima-ácida.

3.3 Bioatividade da cera industrial de lima-ácida e suas frações

A bioatividade da cera e suas frações sobre *C. brevis*, foi avaliada considerando os seguintes parâmetros: mortalidade, efeito anti-alimentar e ação sobre os simbiontes intestinais do gênero *Foaina* presentes no intestino dos cupins.

3.3.1 Avaliação da mortalidade e efeito anti-alimentar

Os testes utilizando como substrato corpos-de-prova (CP) de madeira foram adaptados segundo metodologia descrita por Cornelius *et al.* (1997).

Foram utilizados CP de *Pinus* sp. (sem tratamento químico), medindo 2,54 x 2,54 x 0,64 cm, de acordo com a norma ASTM D3345 (1999). Os CP foram confeccionados na Empresa Madezatti, Caxias do Sul/ RS.

Os CP foram pesados individualmente, em balança de precisão, em estado úmido e em estado absolutamente seco, após permanecer em estufa a $103 \pm 2^\circ\text{C}$, durante 4 horas, tempo suficiente para obter a constância do peso.

A umidade em relação à massa seca dos CP foi calculada através da fórmula:

$$U = (MU - M0) / M0 \times 100, \text{ onde}$$

MU= massa úmida inicial em g

M0 = massa seca em g após secagem em estufa até peso constante.

Inicialmente, foram realizados testes somente com a cera industrial de lima-ácida.

Todos os CP foram preparados e tratados ao mesmo tempo, sendo testados em dois momentos: imediatamente após o tratamento do CP (Teste 1) e após 6 meses do tratamento do CP (Teste 2).

Os CP foram imersos nas soluções com as diferentes concentrações da cera (5, 25, 50, 75, 100 mg/cm³), diluídas em acetona, durante 24 horas. Em seguida, os mesmos foram colocados em Capela de Fluxo Laminar por 24 horas, para evaporação do solvente.

A variação do peso seco inicial, após o tratamento, foi avaliada para o cálculo de retenção, a partir da fórmula:

$(M_f - M_0) / V$ onde:

M_f = massa final após 24 horas de evaporação do solvente (mg)

M_0 = massa seca inicial (mg)

V = volume do corpo-de-prova (cm³)

O teste foi conduzido em placas de Petri, com 9,1cm de diâmetro, com um CP por tratamento. Em cada placa foram introduzidos 30 cupins (pseudergates) da espécie *C. brevis*. Para cada tratamento foram realizadas 5 repetições, sendo para o controle CP tratados com acetona.

Os mesmos procedimentos foram conduzidos para todos os ensaios do fracionamento bioguiado, sendo que para a fração não volátil e frações 2, 3 e 4 obtidas através da VLC foram utilizadas as seguintes concentrações: 10, 20, 30, 40, 50 mg/cm³ e para o óleo essencial foram

utilizadas as concentrações: 20, 40, 60, 80 e 100 mg/cm³. As concentrações foram determinadas a partir do resultado obtido no ensaio com a cera industrial de lima-ácida.

Para determinar a toxicidade das concentrações testadas da cera, óleo essencial, fração não volátil e frações 2, 3 e 4, foi registrada a mortalidade dos cupins a cada 48 horas, durante 60 dias.

Foi calculada a concentração letal mediana (CL₅₀) e o tempo letal mediano (TL₅₀) através do método de Probit (Finney, 1971).

O consumo de substrato foi determinado pela perda de massa do CP [(massa inicial = após impregnação com o produto) – (massa final = após exposição com os cupins)] x 100.

Seguindo a metodologia descrita por Simmonds *et al.* (1990), o índice anti-alimentar (IA) foi calculado de acordo com a fórmula: $IA = [(C - T) / (C + T)] \times 100$, onde C = o peso (mg) do CP controle consumido, e T = o peso (mg) do CP tratado consumido. Se o valor do IA > 0 foi registrado, o tratamento foi considerado como tendo atividade anti-alimentar. O resultado negativo para o IA foi interpretado como negativo para esta mesma atividade. Análise de Probit foi usada para determinar a concentração efetiva para reduzir a 50% a alimentação dos cupins (CE₅₀) (Finney, 1971).

3.3.2 Comprovação da retenção da cera industrial de lima-ácida nos corpos-de-prova

A massa de 10 g da cera industrial de lima-ácida, depois do processo de hidrodestilação, foi colocada em 100 mL de AcOEt. Esta solução foi colocada em um banho de ultrasom durante 10 minutos, sendo posteriormente filtrada em balão com papel filtro e

evaporada por destilação à vácuo. Ao extrato obtido foi adicionado 60 mL de acetona, obtendo-se uma concentração final de 50 mg/mL. Os CP foram imersos em 30 mL desta solução durante 24 horas. Após transcorrido este tempo os CP foram deixados em Capela de Fluxo Laminar por 24 horas para evaporação do solvente, e a solução não absorvida nos CP foi armazenada para posterior análise em CCD.

Finalmente, os CP foram cortados em camadas muito finas (serragem), realizando-se extração com o solvente AcOEt, sendo posteriormente realizada uma CCD, comparando o perfil cromatográfico obtido, com os perfis da fração não volátil da cera testada biologicamente e da solução não absorvida nos CP logo após 24 horas do tratamento.

3.3.3 Avaliação dos efeitos da cera industrial de lima-ácida sobre *Foaina* sp.

Os efeitos da cera sobre o simbiote intestinal de *C. brevis*, *Foaina* sp., foram avaliados segundo metodologia descrita por Lewis (2003) e Alfazairy (2004), com adaptações.

A impregnação dos CP com a cera foi realizada conforme metodologia descrita no item 3.3. A cera industrial de lima-ácida foi testada em concentrações consideradas sub-letais (0,5 mg/cm³ a 15 mg/cm³) sendo realizadas 5 repetições para cada concentração e dois controles: C1 = cupins sem alimentação e C2 = CP tratados com acetona.

Seis cupins sobreviventes de cada placa de Petri foram removidos ao final de 30 e 60 dias pós-tratamento, para verificar a presença e quantificar o protozoário do gênero *Foaina* viáveis no intestino dos cupins. A identificação do protozoário foi realizada com base na classificação de Yamin (1979) e descrição morfológica de Brugerolle (2000). Foram avaliados

somente cupins com abdômen escuro o que demonstra o não esvaziamento do trato digestório pelo processo de muda. Para esta avaliação, foi realizado o exame do conteúdo intestinal dos cupins, sendo o intestino posterior dilacerado e colocado em 50 µL de solução salina 0,9% (NaCl) e agitado por 10 segundos. Após, 5 µL da mistura foram transferidos para Câmara de Neubauer para quantificação dos simbioses em microscópio de contraste de fase (Zeiss), aumento de 400x.

O resultado da contagem foi transformado para número de células por cupim usando a seguinte fórmula: n° de células contadas x volume de solução salina / volume contado x n° de cupins x 5 (Lewis, 2003).

O tempo necessário para uma contagem ao microscópio foi menor do que 20 minutos, tempo ideal para que os simbioses ainda estejam viáveis.

3.4 Análises estatísticas

As análises estatísticas dos experimentos foram realizadas através de testes paramétricos com o auxílio do programa computacional SPSS for Windows (Green & Salkind, 2004) e PrismGraphPad, versão 4.0 (Müller, 2003). O consumo do substrato, mortalidade e o número total de protozoários por intestino de cupim nos diferentes tratamentos realizados com a cera industrial de lima-ácida e suas frações foram analisados usando ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um dos principais objetivos dos procedimentos experimentais realizados através de bioensaios na busca de um produto com atividade biológica contra insetos-praga é identificar os compostos responsáveis pela atividade observada. Não é comum que um único composto seja responsável pela atividade verificada e muitos dos compostos isolados podem exercer o mesmo efeito biológico, embora possam ser diferentes quanto a sua potência. Entretanto, não pode-se assumir que os compostos presentes em maior concentração resultam na maior atividade do extrato, sendo muito importante, dentre outros aspectos relevantes, relacionar com suas características dose-resposta em procedimentos experimentais (Amaral, 2003).

Programas de "screening" para produtos naturais biologicamente ativos requerem a realização de bioensaios. A detecção de compostos com atividade esperada num complexo extrato de plantas depende da confiabilidade e sensibilidade do sistema de testes utilizado. Bioensaios são também essenciais por monitorarem os efeitos requeridos através do fracionamento bio-guiado: todas as frações são testadas e para aquelas que continuam a exibir atividade biológica, é dada continuidade ao fracionamento químico até que a substância, ou seja, o composto bioativo seja purificado (Hostettmann, 1999). Assim, os resultados da análise química e dos bioensaios obtidos no presente trabalho e apresentados a seguir, serviram para a identificação e caracterização das frações bioativas de interesse neste estudo.

4.1 Composição química da cera industrial de lima-ácida

A cera industrial de lima-ácida, um resíduo semi-sólido obtido da extração e posterior resfriamento do óleo essencial, é caracterizada por uma fração não volátil, mas que ainda

contém na sua composição, compostos representativos da fração volátil do óleo essencial (Braddock, 1999).

4.1.1 Fração volátil

Ao final do processo de hidrodestilação da cera, obteve-se um rendimento de 34 % de óleo essencial e uma fase aquosa como resíduo da hidrodestilação.

O cromatograma do óleo essencial obtido a partir da cera industrial de lima-ácida (Figura 6) revela inicialmente picos correspondentes a hidrocarbonetos monoterpênicos. Na área central, com Tr intermediários, pode-se visualizar picos característicos de monoterpênicos oxigenados e, por último, com Tr maiores, os hidrocarbonetos sesquiterpênicos e seus compostos oxigenados. Embora a análise por GC seja uma ferramenta poderosa para elucidação dos compostos presentes no óleo essencial, ela requer a utilização de métodos analíticos complementares. Em se tratando de óleos essenciais faz-se o uso do índice de retenção (IR), que possui valores bastante distintos para estruturas isoméricas com grande similaridade estrutural.

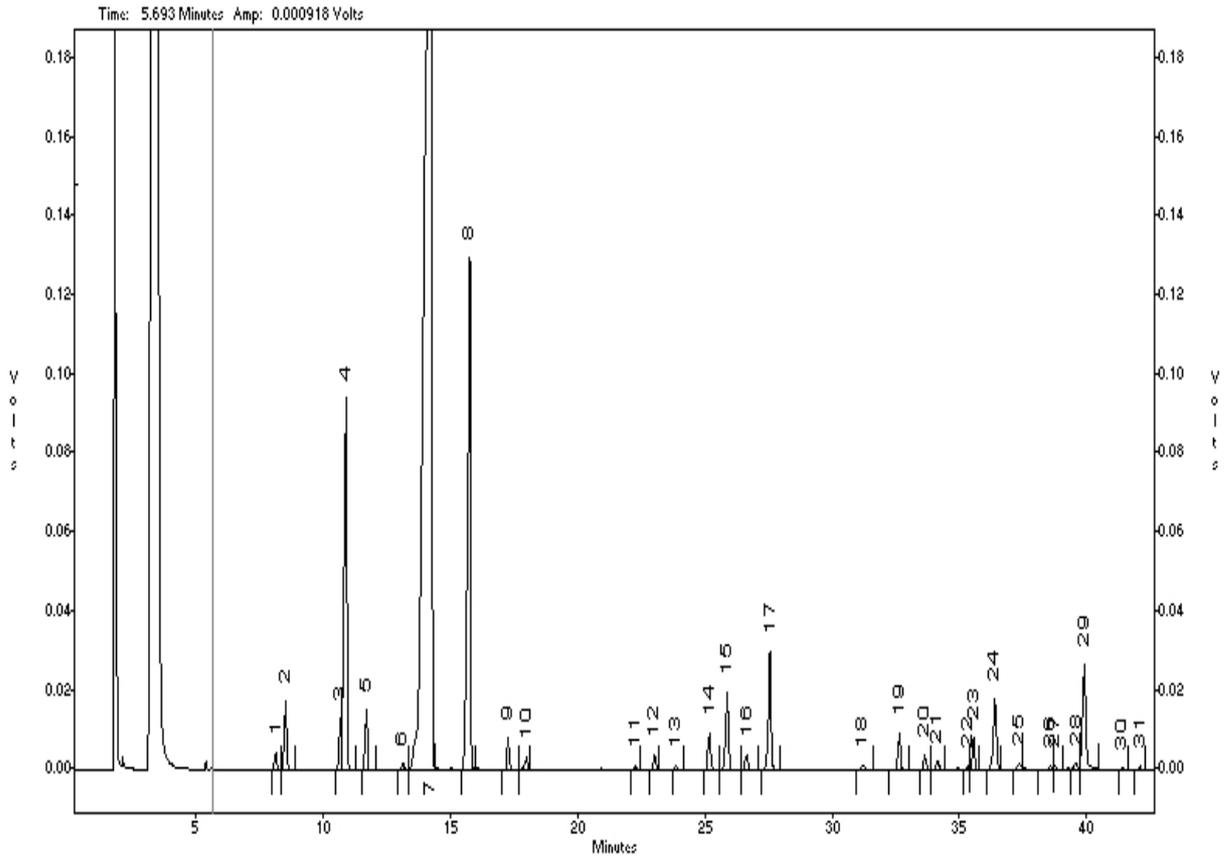


Figura 6. Perfil cromatográfico do óleo essencial extraído da cera industrial de *Citrus latifolia* Tanaka, obtido por Cromatografia Gasosa (GC).

A análise por GC associada aos índices de retenção linear (IRL), permitiu a caracterização de aproximadamente 99,15% dos constituintes do óleo essencial da cera industrial de lima-ácida (Tabela 2). Na Tabela estão relacionados os constituintes identificados, com suas respectivas concentrações e índices de retenção linear. A análise qualitativa e quantitativa do óleo essencial permitiu a identificação de 27 compostos, todos

terpênicos. O constituinte majoritário foi o limoneno (59,56%). Outros componentes identificados em teores elevados foram γ -Terpineno (13,27%) e β -Pineno (7,97%). Uma comparação entre a composição química do óleo essencial obtido da cera industrial de lima-ácida com dois trabalhos da literatura que analisam a composição química do óleo essencial de lima-ácida (Dugo *et al.*, 1999a & Atti-Santos *et al.*, 2005), mostra resultados similares quanto aos compostos identificados.

Tabela 2. Índice de retenção linear dos compostos identificados na fração volátil do óleo essencial de *C. latifolia* Tanaka obtida através de análise por GC (safra 2005/2).

| Composto | Concentração relativa % (v/v) | IRL | Composto | Concentração relativa % (v/v) | IRL |
|---------------------|------------------------------------------|------------|------------------------------|------------------------------------------|------------|
| α -Thujeno | 0,31 | 922 | Nerol | 0,81 | 1222 |
| α -Pineno | 1,27 | 928 | Citronelol | 0,81 | 1222 |
| Sabineno | 1,04 | 969 | Neral | 1,69 | 1231 |
| β -Pineno | 7,97 | 971 | Geraniol | 0,34 | 1255 |
| Mirceno | 1,20 | 990 | Geranial | 2,79 | 1273 |
| α -Terpineno | 0,17 | 1009 | Neril-acetato | 0,77 | 1370 |
| Limoneno | 59,56 | 1027 | Geranil-acetato | 0,31 | 1386 |
| γ -Terpineno | 13,27 | 1057 | β -Cariofileno | 0,70 | 1413 |
| Terpinoleno | 0,59 | 1085 | Trans- α -bergamoteno | 1,68 | 1418 |
| Linalol | 0,29 | 1100 | β -santaleno | 0,18 | 1436 |
| Citronelal | 0,04 | 1154 | Bisaboleno | 2,79 | 1500 |
| Terpinen-4-ol | 0,09 | 1175 | Norbonanol | 0,04 | 1636 |
| α -Terpineol | 0,31 | 1188 | Canferenol | 0,04 | 1650 |
| Decanal | 0,09 | 1205 | --- | | --- |
| TOTAL | | | | 99,15 | |

IRL = Índice de Retenção Linear

4.1.2 Fração não volátil

As cumarinas simples, no comprimento de onda de 365nm, apresentam uma fluorescência intensa azul ou azul-esverdeada, e as furanocumarinas, às vezes, mostram bandas de coloração amarelada, marrom ou azul fluorescente, como reportado por Wagner (1996). Muitos compostos pertencentes a estes dois grupos químicos, são citados na literatura com tendo atividade biológica contra várias espécies de insetos-praga (Salvatore *et al.*, 2004; Sharma *et al.*, 2006, Moreira *et al.*, 2007, Siskos *et al.*, 2008, Barros *et al.*, 2008).

Na Figura 7, verifica-se a ausência de compostos característicos do grupo das cumarinas e furanocumarinas na fase aquosa (água resultante após o processo de hidrodestilação e extraída com AcEOt), sendo portanto, esta fração descartada do estudo. Também pode-se observar que a fração não volátil (3) contém compostos que revelam com o mesmo perfil dos padrões utilizados, sendo dado continuidade ao fracionamento com esta fração.

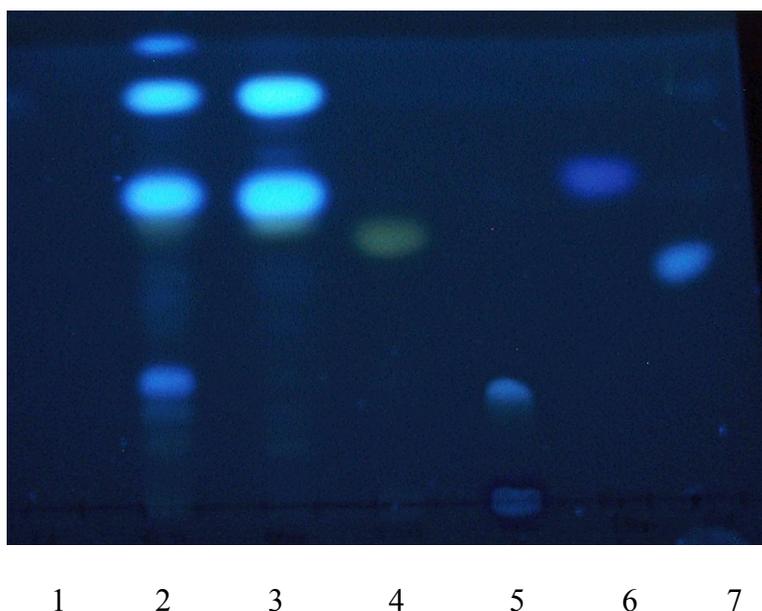


Figura 7. Cromatograma de Camada Delgada. (1) fase aquosa; (2) cera industrial de lima-ácida; (3) fração não volátil; (4) 8-metoxipsoraleno; (5) Esculina hidrolisada; (6) 7-hidroxycumarina e (7) etoxicumarina. Revelação em lâmpada UV 365nm.

Foram obtidas quatro frações por VLC (Vacuum Liquid Chromatography), não sendo possível a obtenção de nenhuma fração com um composto puro, mas três frações (2, 3 e 4) com a mesma composição, porém em proporções diferentes, de acordo com a polaridade dos compostos (Figura 8). Tanto na revelação da placa por lâmpada UV 365nm quanto 254nm, em todas as frações aparece claramente a presença de bandas fluorescentes, principalmente na porção superior da placa, sendo estas bandas indicativas da presença de cumarinas e furanocumarinas.

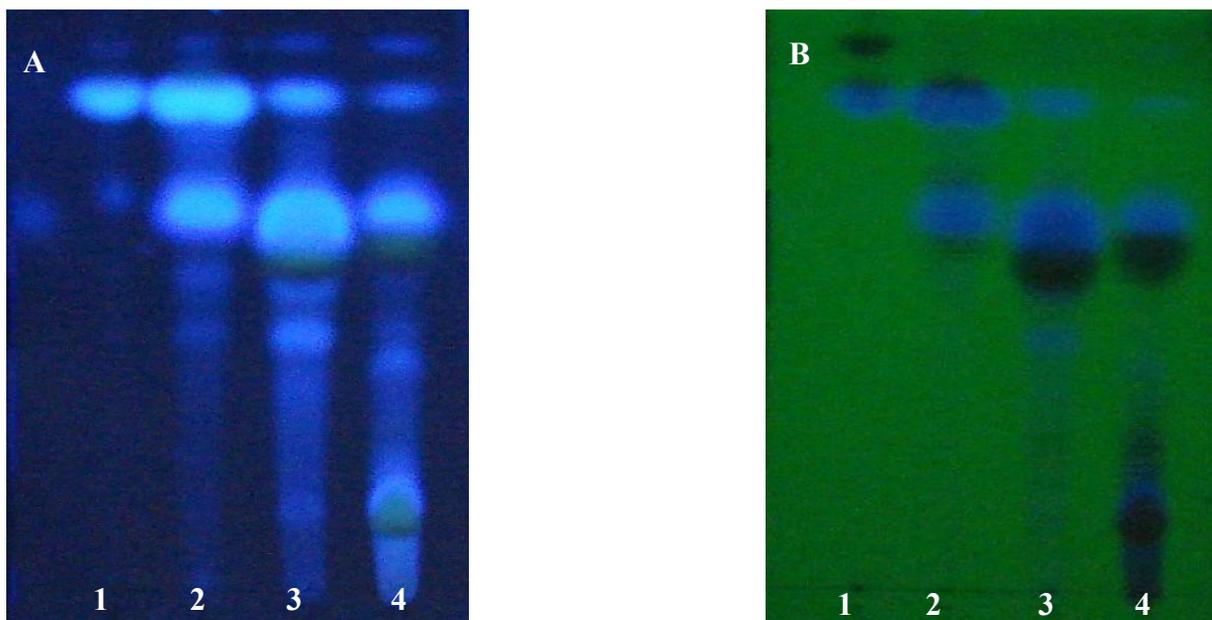


Figura 8. Cromatograma de Camada Delgada das 4 frações obtidas através da VLC (Vacuum Liquid Chromatography). A = revelação em lâmpada UV 365nm; B = revelação em lâmpada UV 254nm. As frações 1, 2, 3 e 4 foram obtidas a partir da extração com solventes de polaridade crescente: hexano, hexano: acetato de etila (80:20), hexano:acetato de etila (50:50), acetato de etila, respectivamente.

Na Figura 9 observa-se que além dos compostos verificados na CCD (Figura 8), a revelação com sulfato de cobre permite identificar outros compostos com coloração rosa-lilás e valor de Rf maior daquele obtido para as cumarinas e furanocumarinas, forte indicativo da presença de compostos terpênicos (Wagner, 1996), o que ficou comprovado na análise do GC-MS (Tabela 3).



Figura 9. Cromatograma de Camada Delgada das 4 frações obtidas da VLC (Vacuum Liquid Chromatography). Sulfato de cobre (CuSO_4) como revelador universal. As frações 1, 2, 3 e 4 foram obtidas a partir da extração com solventes de polaridade crescente: hexano, hexano:acetato de etila (80:20), hexano:acetato de etila (50:50), acetato de etila, respectivamente.

Provavelmente estes compostos terpênicos ainda estejam presentes na fração não volátil devido ao fato da hidrodestilação do óleo essencial não ter sido completa. A Tabela 3 apresenta os compostos identificados através de GC-MS na fração 1, caracterizada pela presença de compostos terpênicos e uma cumarina identificada como 5,7-dimetoxicumarina, com $\text{Tr} = 21.90$.

Tabela 3. Compostos terpênicos e cumarina identificados por GC-MS na fração 1 da cera industrial de lima-ácida.

| Composto | Classificação | Tempo de retenção (Tr) |
|----------------------|---------------|------------------------|
| B-pineno | Terpeno | 7.83 |
| Linalol | Terpeno | 10.20 |
| 1,4-terpineol | Terpeno | 11.70 |
| Aromadendreno | Terpeno | 18.50 |
| 5,7-dimetoxicumarina | Cumarina | 21.90 |

No cromatograma obtido para a fração 2 através de GC-MS (Figura 10), observa-se que a proporção de compostos que fazem parte da fração volátil ainda presente na cera é consideravelmente menor, predominando, neste caso, os constituintes da fração não volátil, ou seja, cumarinas e furanocumarinas ($Tr \geq 19.35$). Os picos deste grupo de compostos não aparecem com uma boa resolução no cromatograma, e, provavelmente, este fato seja devido a uma sobresaturação dos mesmos nesta fração.

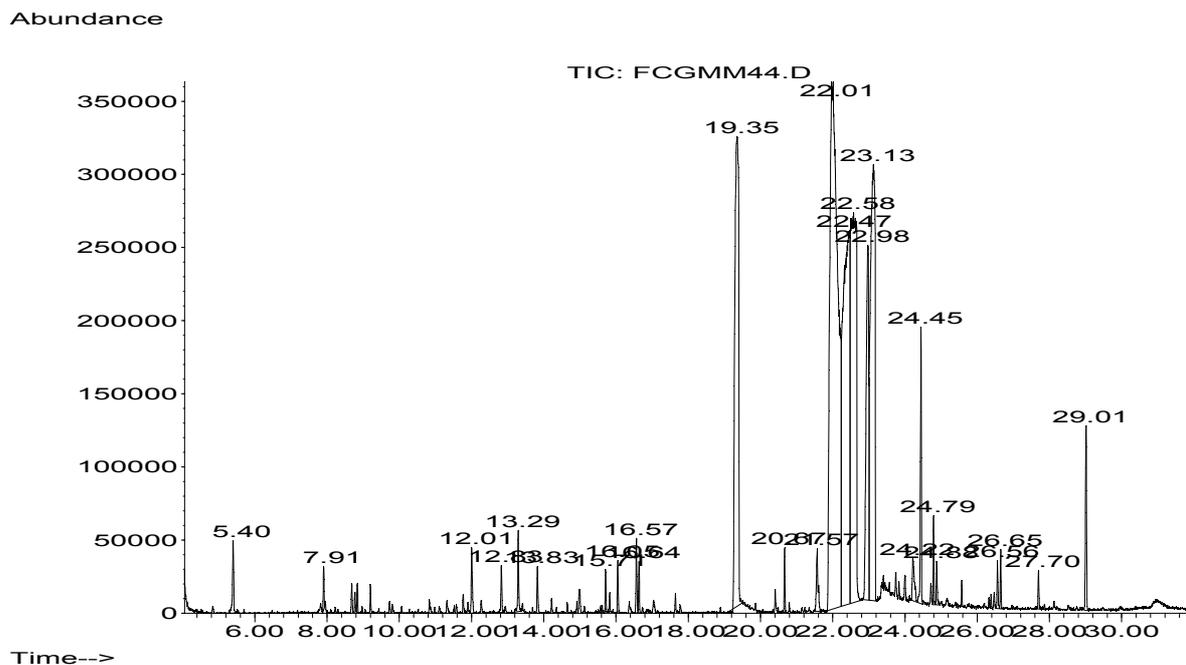
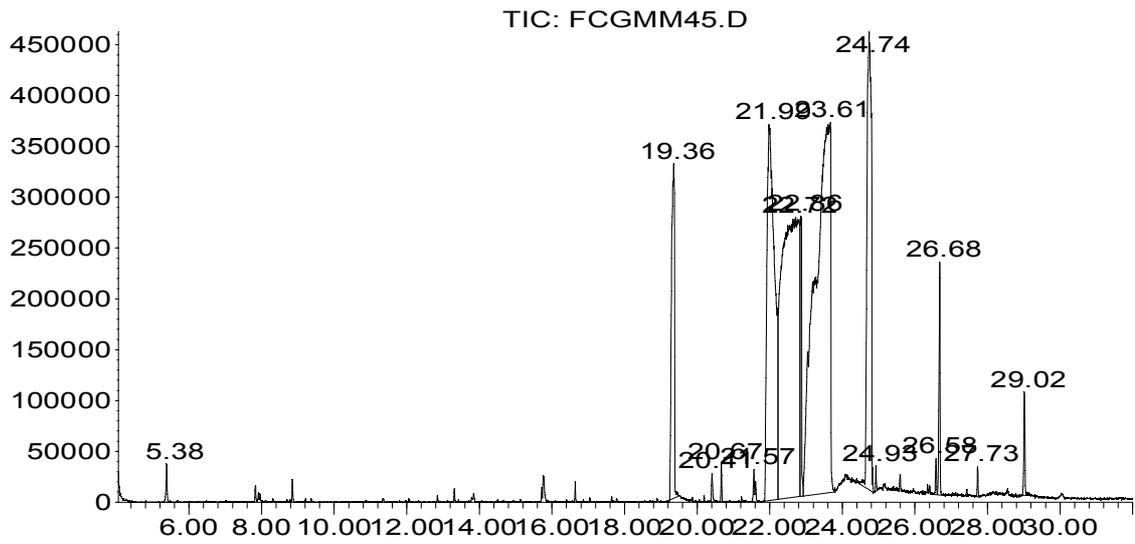


Figura 10. Perfil cromatográfico da fração 2 obtido através de GC-MS.

Nos cromatogramas obtidos por GC-MS para as frações 3 e 4 (Figuras 11 e 12), pode-se observar picos correspondentes a compostos pertencentes ao grupo das cumarinas e furanocumarinas.

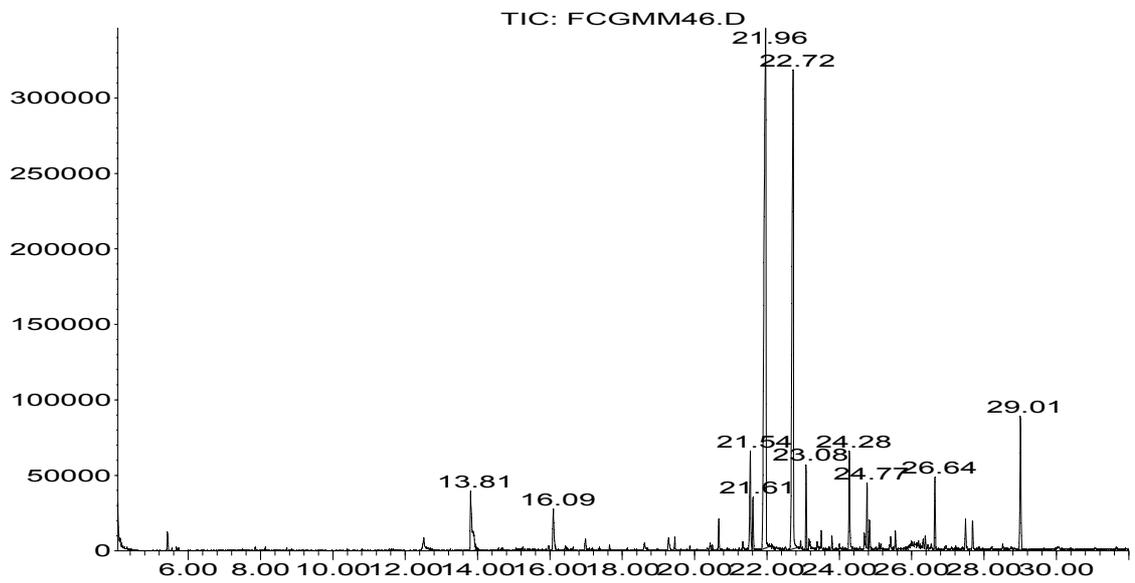
Abundance



Time-->

Figura 11. Perfil cromatográfico da fração 3 obtido através de GC-MS.

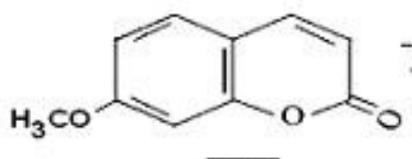
Abundance



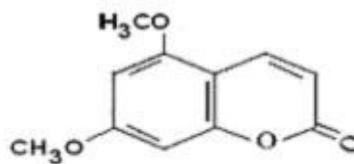
Time-->

Figura 12. Perfil cromatográfico da fração 4 obtido através de GC-MS.

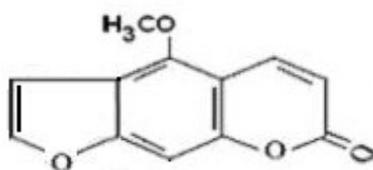
Através da análise por espectrometria de massa, comparando os valores de Tr com a biblioteca comercial de Wipke *et al.* (1974), foram identificados os seguintes compostos não voláteis nas frações 1, 2, 3 e 4 da cera industrial de lima-ácida: hernianina (7-metoxicumarina), citropteno (5,7-dimetoxicumarina), bergapteno (5-metoxipsoraleno), isopimpinellina (5,8-dimetoxipsoraleno). A representação da estrutura molecular dos compostos identificados pode ser observada na Figura 13. Além dos compostos identificados, há outros picos minoritários que podem ser visualizados nos cromatogramas anteriores mas que não foram identificados.



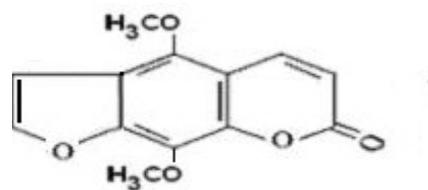
7-metoxicumarina



5,7-dimetoxicumarina



5-metoxipsoraleno



5,8-dimetoxipsoraleno

Figura 13. Estrutura molecular das cumarinas e furanocumarinas presentes nas frações obtidas por VLC (Vacuum Liquid Chromatography) da cera industrial de lima-ácida.

Mediante a comparação do espectro de massa do pico com $Tr = 19.36$, com os espectros da biblioteca comercial, pode ser identificado este composto como sendo 7-metoxicumarina (Figura 14).

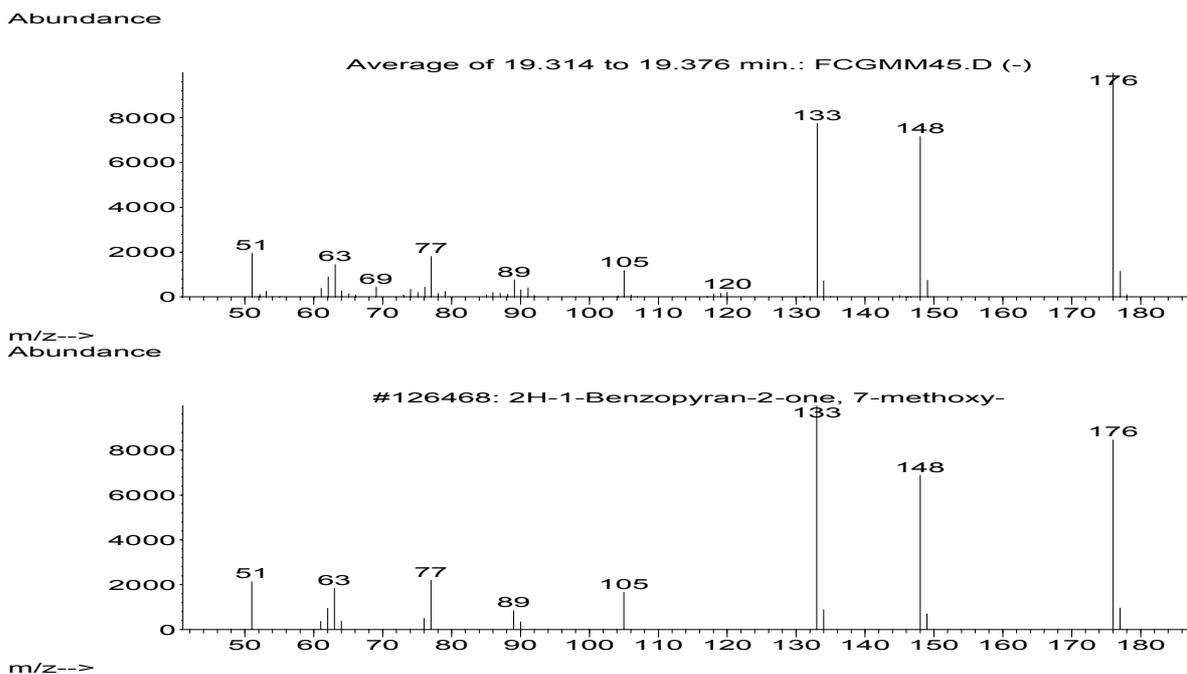


Figura 14. Espectro de massa do pico 19.36, identificado nas frações 2 e 3 obtidas através da VLC (Vacuum Liquid Chromatography).

Uma possível rota de fragmentação que identifica os principais íons que se obtém pela espectrometria de massa para a 7-metoxicumarina está esquematizada na Figura 15 e resumida na Tabela 4.

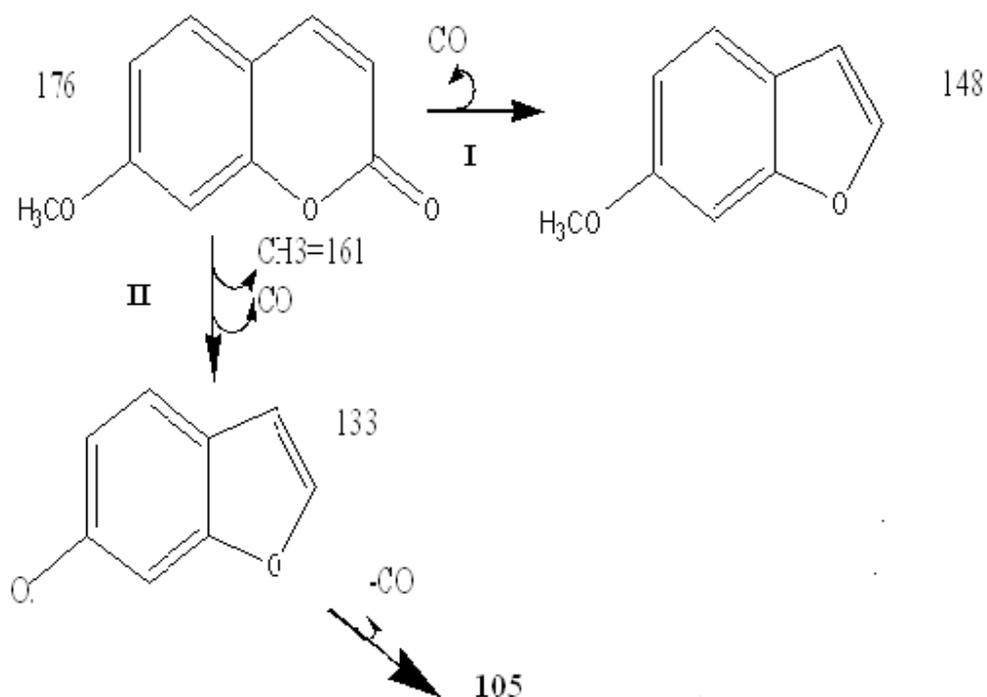


Figura 15. Possível rota de fragmentação da 7-metoxicumarina.

Tabela 4. Perda de massa características do composto 7-metoxicumarina.

| Rota de fragmentação | m/z (μ mas)* | Íon |
|----------------------|-------------------|-----------------------------|
| I | 176 | M ⁺ |
| | 148 | M ⁺ - CO |
| II | 176 | M ⁺ |
| | 133 | M ⁺ - (CO + Me) |
| | 105 | M ⁺ - (2CO + Me) |

*massa/carga.

O espectro de massa da 7-metoxicumarina apresenta as fragmentações dos substituintes a partir do íon molecular 176. Os demais picos observados correspondem principalmente aos fragmentos formados pela perda de CO e CH₃, de acordo com Ugaz (1994).

O espectro de massa dos compostos com Tr = 21.96 corresponde, por comparação com a biblioteca comercial ao composto 5,7-dimetoxicumarina (Figura 16).

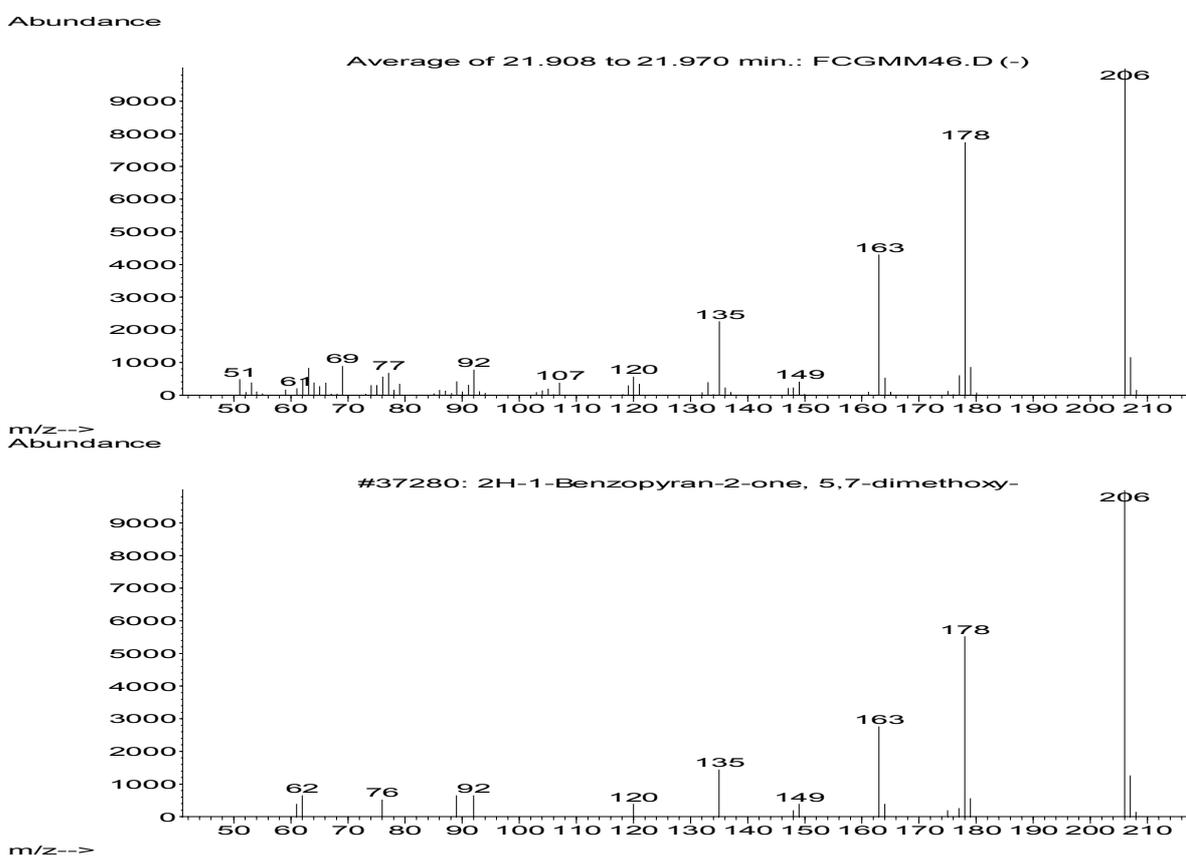


Figura 16. Espectro de massa do pico 21.96, identificado nas frações 1, 2, 3 e 4 obtidas através da VLC (Vacuum Liquid Chromatography).

Através da espectrometria de massa obtida para o composto 5,7-dimetoxicumarina, uma possível rota de fragmentação que identifica os principais íons, está representada na Figura 17.

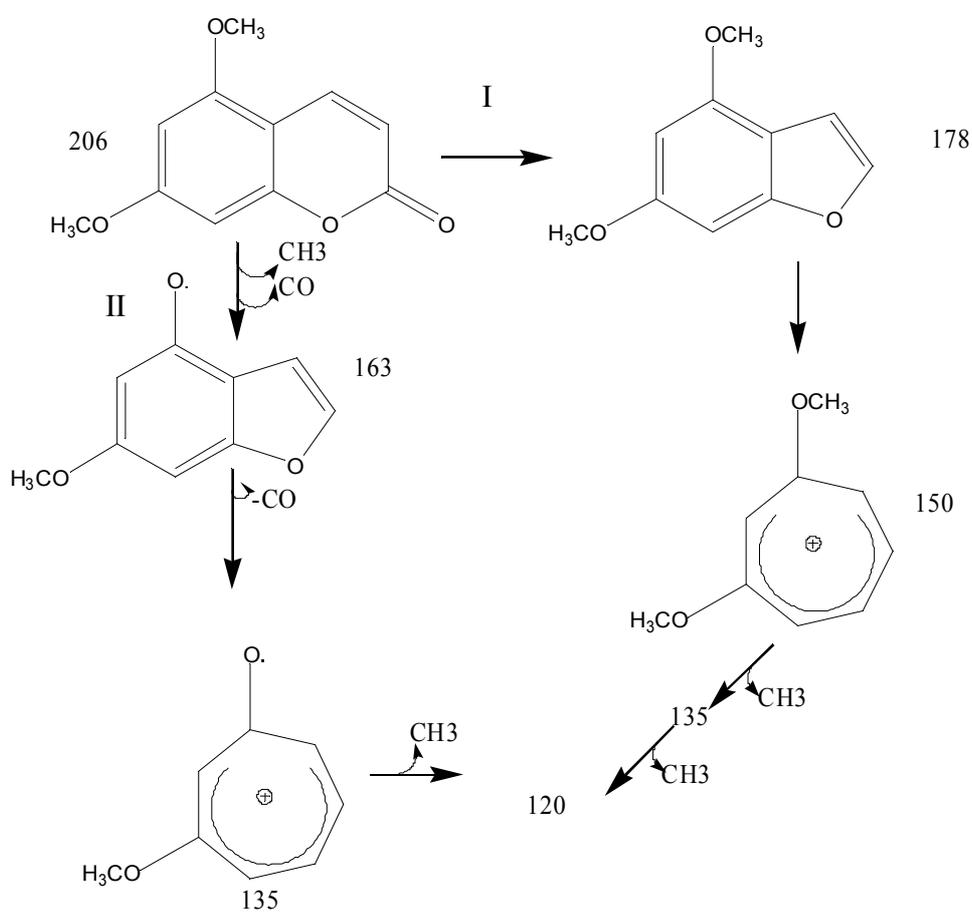


Figura 17. Possível rota de fragmentação da 5,7-dimetoxicumarina.

O espectro de massa deste composto apresenta as fragmentações dos substituintes a partir do íon molecular 206 (Figura 17), fornecendo os íons de m/z 178, 163, 135 e 120, numa possível rota de fragmentação, sendo as possíveis perdas de massa dos íons moleculares apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5. Perda de massa características do composto 5,7-dimetoxicumarina.

| Rota de fragmentação | m/z (μ mas)* | Íon |
|----------------------|-------------------|------------------------------|
| I | 206 | M ⁺ |
| | 178 | M ⁺ - CO |
| | 150 | M ⁺ - 2CO |
| | 135 | M ⁺ - (2CO + Me) |
| | 120 | M ⁺ - (2CO + 2Me) |
| II | 206 | M ⁺ |
| | 163 | M ⁺ - (CO + Me) |
| | 135 | M ⁺ - (2CO + Me) |
| | 120 | M ⁺ - (2CO + 2Me) |

*massa/carga.

De acordo com Ugaz (1994), nas furanocumarinas a presença do anel furano não altera fundamentalmente o processo de fragmentação indicado para as cumarinas simples, sendo que o anel lactônico se degrada da mesma maneira em ambos os casos.

O pico com Tr = 22.7 corresponde, por comparação com a biblioteca comercial ao composto 5-metoxipsoraleno (Figura 18).

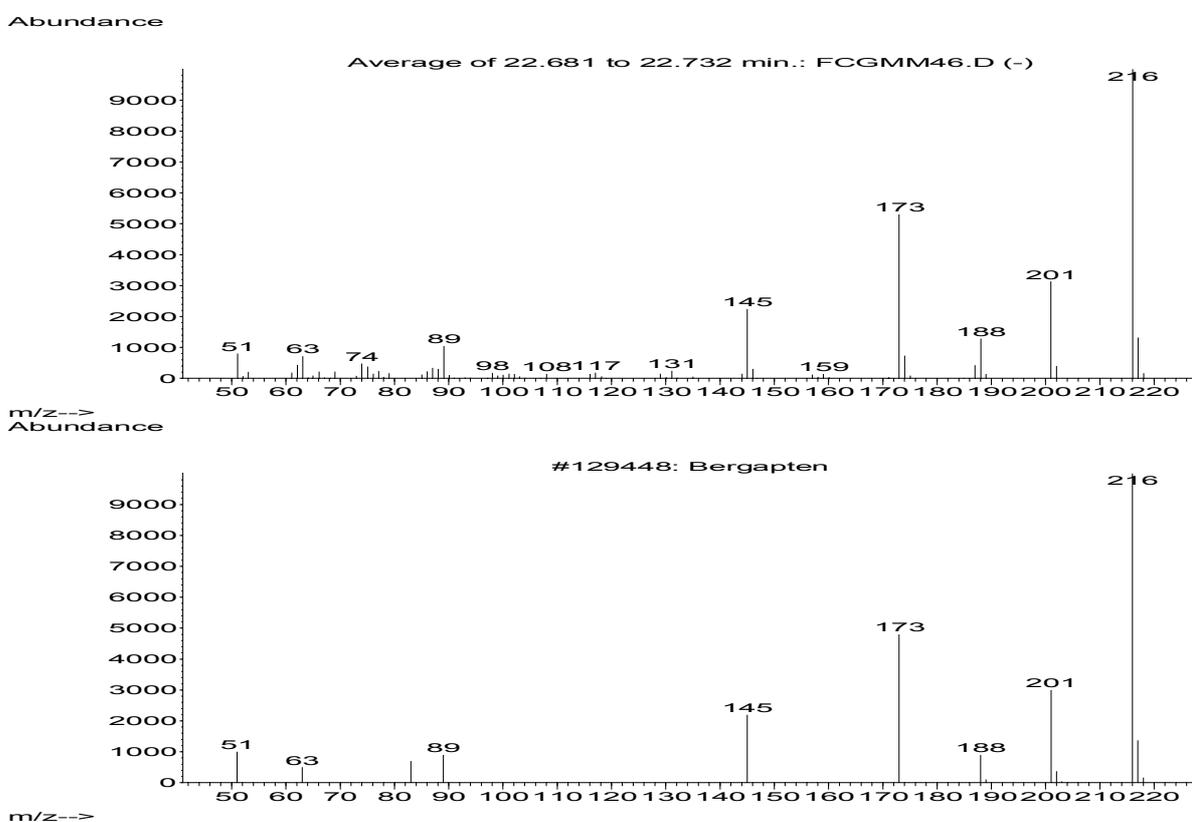


Figura 18. Espectro de massa do pico 22.7, identificado nas frações 2, 3 e 4 obtidas através da VLC (Vacuum Liquid Chromatography).

Uma possível rota de fragmentação que identifica os principais íons que se obtém pela espectrometria de massa para 5-metoxipsoraleno está esquematizada na Figura 19 e uma das rotas encontra-se resumida na Tabela 6.

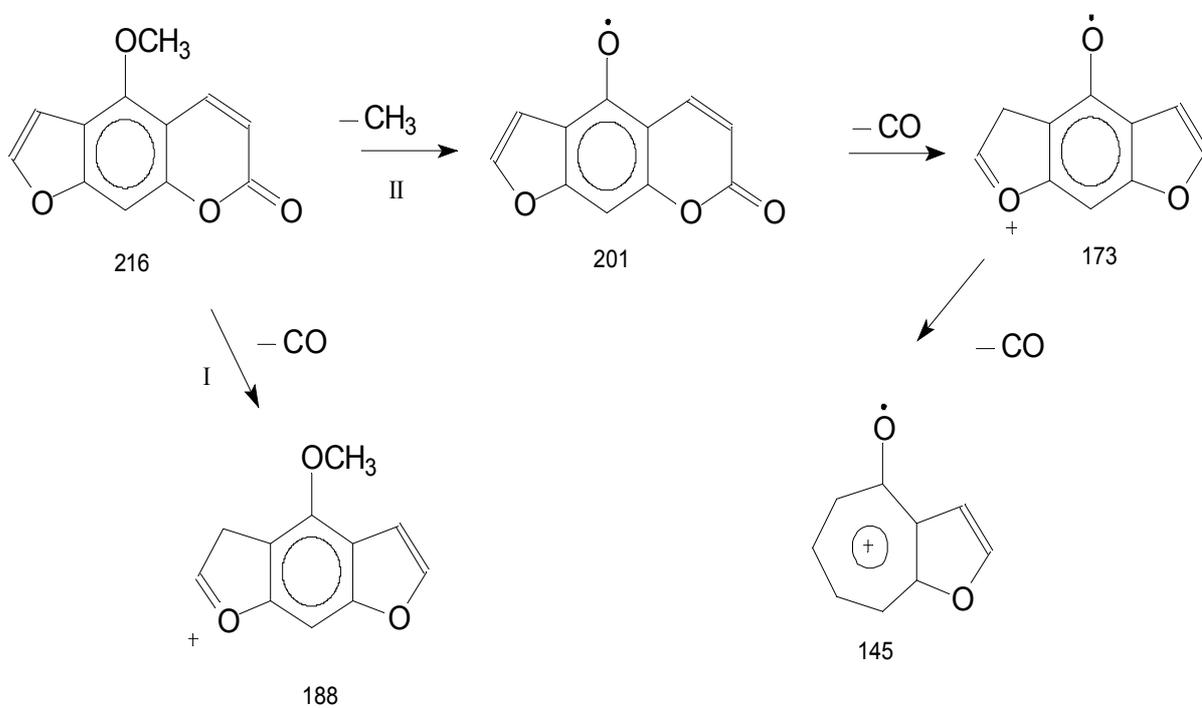


Figura 19. Possível rota de fragmentação do 5-metoxipsoraleno.

Tabela 6. Perda de massa características do composto 5-metoxipsoraleno.

| Rota de fragmentação | m/z (μmas)* | Íon |
|-----------------------------|-----------------------------------|-----------------------------|
| I | 216 | M ⁺ |
| | 188 | M ⁺ - CO |
| II | 216 | M ⁺ |
| | 201 | M ⁺ - Me |
| | 173 | M ⁺ - (Me + CO) |
| | 145 | M ⁺ - (Me + 2CO) |

*massa/carga

O espectro de massa do pico com Tr = 24.4 (Figura 20), comparado com a biblioteca comercial corresponde ao composto 5,8-dimetoxipsoraleno.

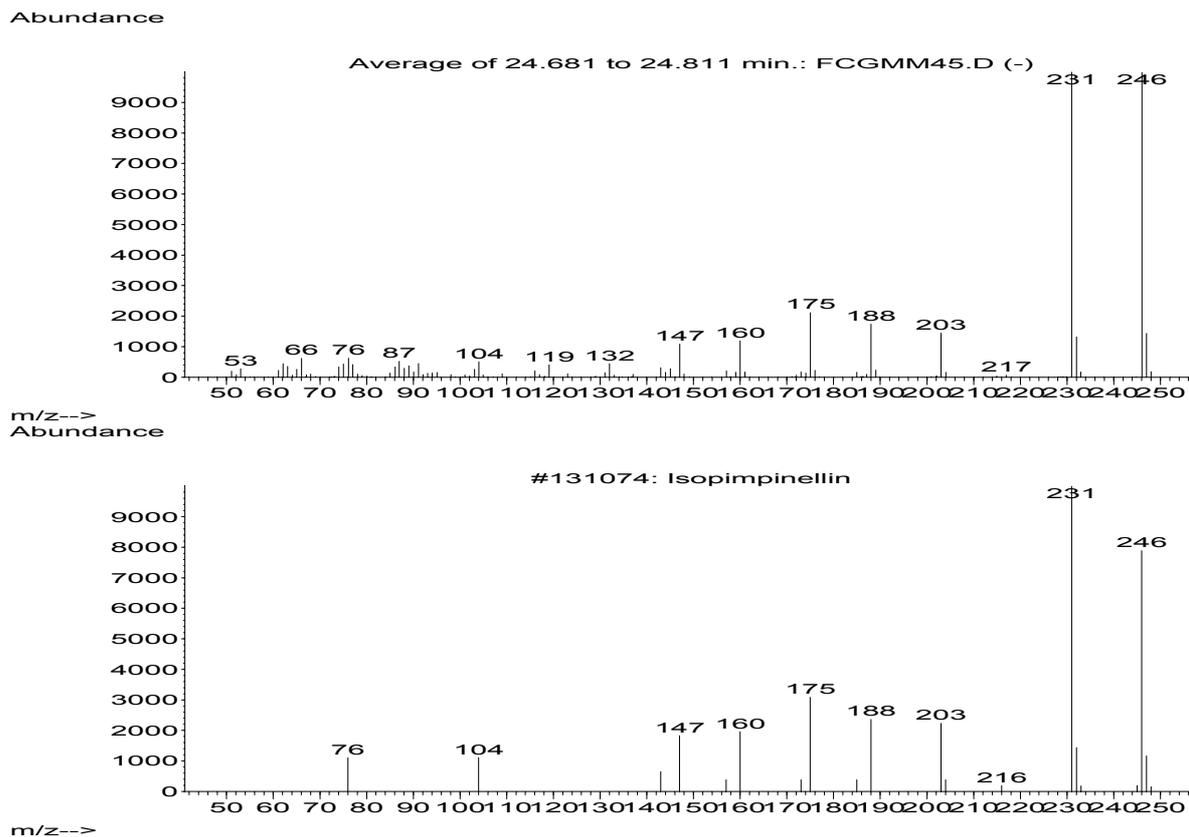


Figura 20. Espectro de massa do pico 24.4, identificado nas frações 2, 3 e 4 obtidas através da VLC (Vacuum Liquid Chromatography).

Uma possível rota de fragmentação que identifica os principais íons que se obtém pela espectrometria de massa para o composto 5,8-dimetoxipsoraleno está esquematizado na Figura 21 e resumido na Tabela 7.

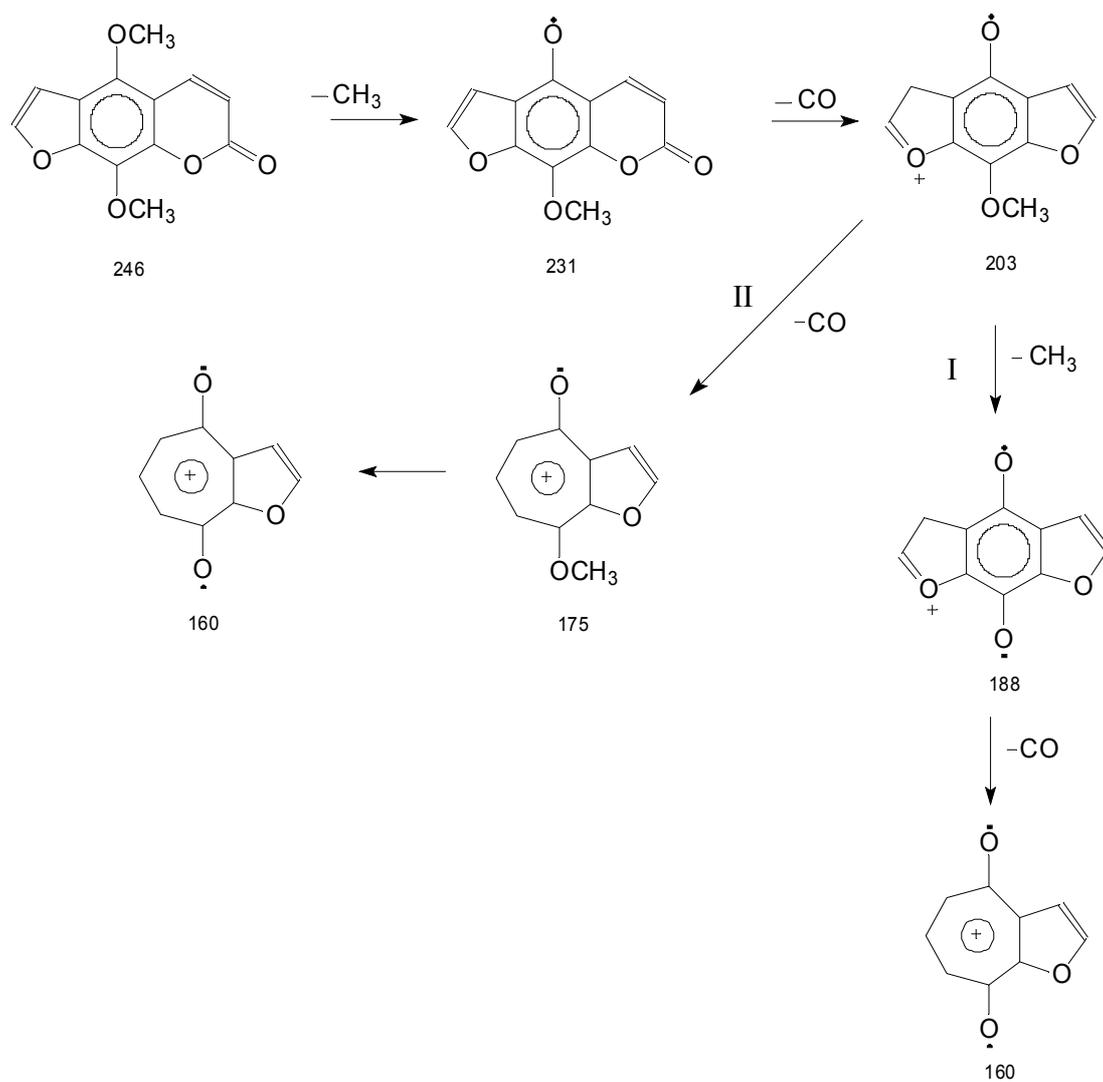


Figura 21. Possível rota de fragmentação do composto 5,8-dimetoxipsoraleno.

Tabela 7. Perda de massa características do composto 5,8-dimetoxipsoraleno.

| Rota de fragmentação | m/z (μ mas)* | Íon |
|----------------------|-------------------|----------------------|
| I | 246 | M^+ |
| | 231 | $M^+ - Me$ |
| | 203 | $M^+ - (Me + CO)$ |
| | 188 | $M^+ - (2Me + CO)$ |
| | 160 | $M^+ - (2 Me + 2CO)$ |
| II | 246 | M^+ |
| | 231 | $M^+ - Me$ |
| | 203 | $M^+ - (Me + CO)$ |
| | 175 | $M^+ - (Me + 2CO)$ |
| | 160 | $M^+ - (2Me + 2CO)$ |

*massa molecular.

A análise química por CCD, GC e GC/MS das frações obtidas por VLC da cera industrial de lima-ácida, possibilitou a identificação de duas cumarinas (7-metoxicumarina e 5,7-dimetoxicumarina) e duas furanocumarinas (5-metoxipsoraleno e 5,8-dimetoxipsoraleno)

nas frações 2 e 3, porém em proporções diferenciadas como observado no perfil cromatográfico (Figuras 10 e 11). Na fração 4 somente não foi identificado o composto 7-metoxicumarina, presente nas frações 2 e 3 (Figura 12). A cumarina 5,7-dimetoxicumarina foi o composto majoritário identificado nas frações 2 e 4. Na fração 3 a furanocumarina 5,8-dimetoxipsoraleno foi o composto majoritário.

4.2 Retenção da cera industrial de lima-ácida na madeira de *Pinus* sp.

Neste trabalho, dois importantes aspectos foram considerados: o substrato utilizado para os bioensaios, blocos de madeira de *Pinus* sp., madeira muito suscetível ao ataque de cupins; e a forma de aplicação da cera nos blocos durante os bioensaios. Este último aspecto é de real significância, pois determina em grande parte a eficácia e qualidade do tratamento, podendo ser medido através da retenção do produto na madeira.

A retenção de um preservante na madeira é significativamente afetada pela concentração do produto aplicado, método de impregnação e espécie da madeira (Humar *et al.*, 2007).

A retenção foi considerada satisfatória em todos os tratamentos realizados com a cera e suas frações, sendo o aumento dos valores diretamente relacionado com o aumento da concentração (Figura 22, 23 e 24).

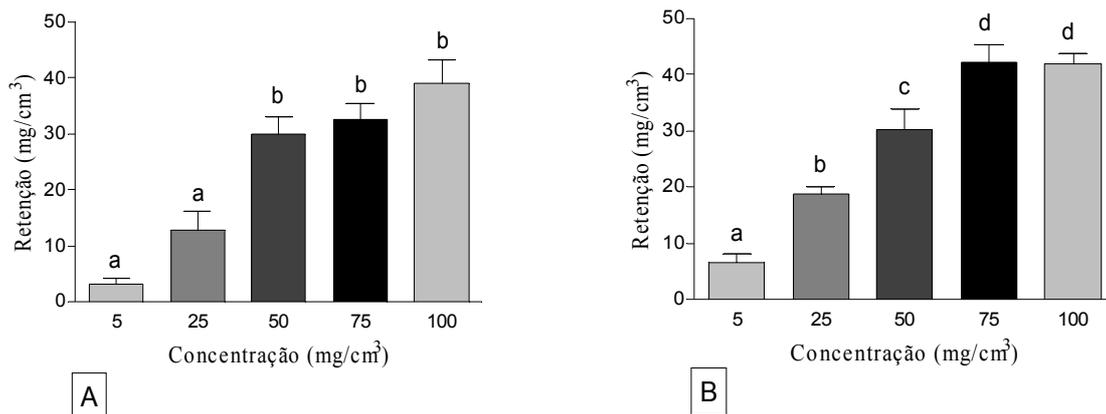


Figura 22. Retenção da cera industrial de lima-ácida em corpos-de-prova (CP) de madeira de *Pinus* sp. após imersão em soluções com diferentes concentrações. A= retenção avaliada imediatamente após tratamento dos CP; B= retenção avaliada após 6 meses de tratamento dos CP. Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($P < 0.05$).

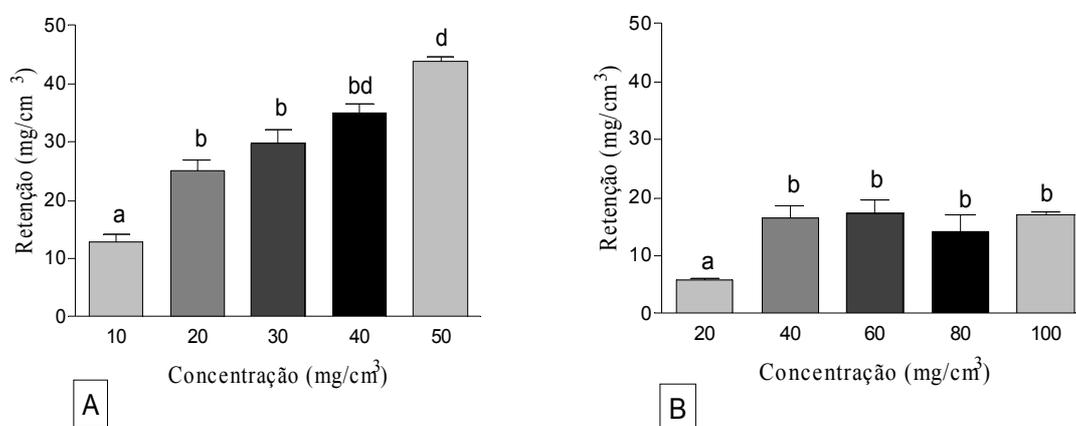


Figura 23. Retenção da fração não volátil (A) e óleo essencial de lima-ácida (B) em corpos-de-prova (CP) de madeira de *Pinus* sp. após imersão em soluções com diferentes concentrações. Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($P < 0.05$).

Na Figura 22, verificou-se que a retenção da cera nas concentrações testadas, após 6 meses de armazenamento dos CP (B), seguiu a mesma tendência dos CP imediatamente tratados (A), porém os valores obtidos foram mais altos. Este fato provavelmente ocorreu devido a umidade retida nos CP durante o período de armazenamento, visto que os mesmos foram armazenados em temperatura ambiente.

Os valores de retenção obtidos com o óleo essencial (B) foram menores quando comparados com a fração não volátil (A). Também pode-se verificar que os valores para o óleo não diferem significativamente a partir da concentração de 40 mg/cm³ (Figura 23). É provável que esta relação retenção x óleo essencial tenha sido menor devido a presença dos compostos presentes no óleo, que caracterizam-se pela sua volatilidade, sendo uma certa porcentagem perdida durante o processo de evaporação do solvente.

Os resultados de retenção obtidos com as frações 2, 3 e 4 (VLC) foram também relevantes (Figura 24), variando os valores quando comparadas as três frações entre si, porém fica evidente que a retenção aumenta com o aumento da concentração, como observado nas Figuras 22 e 23.

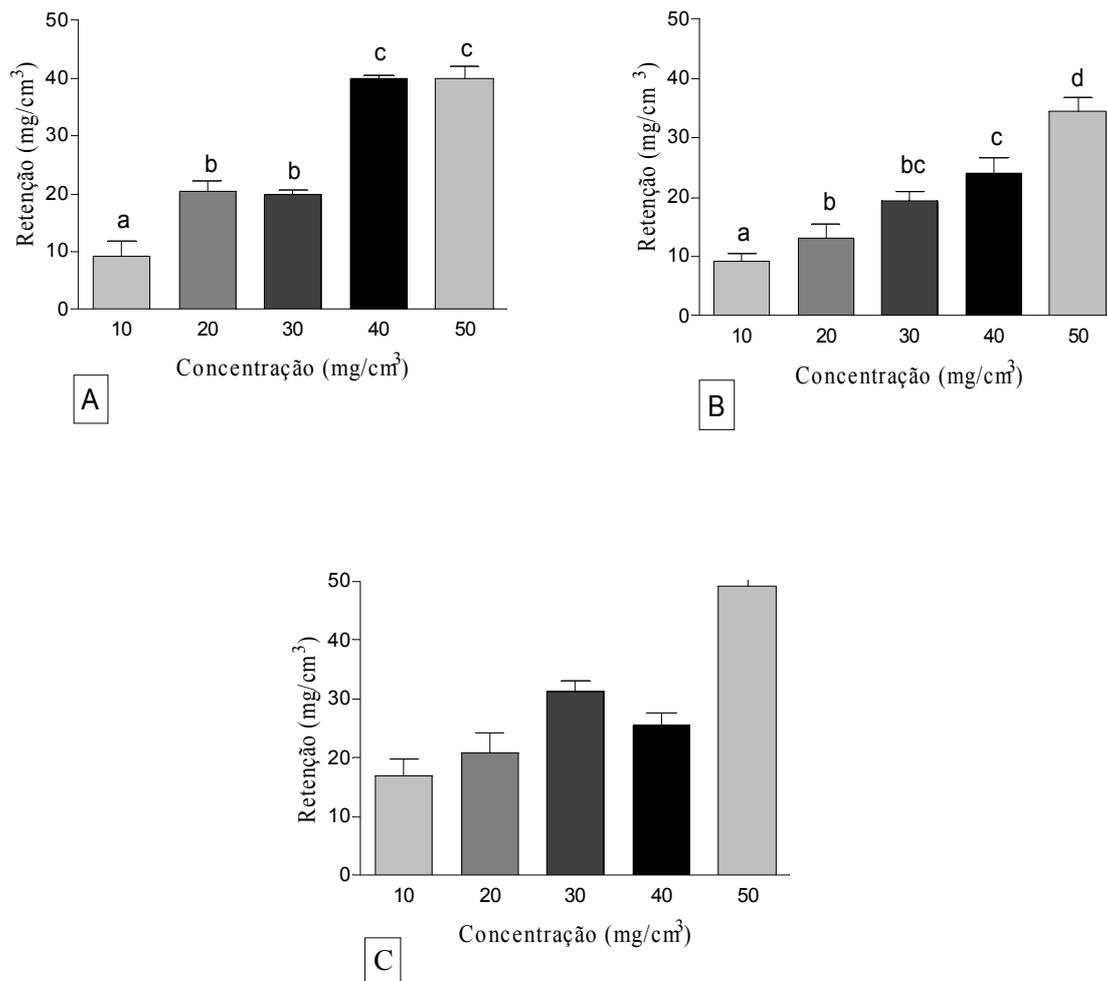


Figura 24. Retenção das frações obtidas através da VLC (Vacuum Liquid Chromatography) em corpos-de-prova (CP) de madeira de *Pinus* sp. após imersão em soluções com diferentes concentrações. A = Fração 2; B = Fração 3; C = Fração 4. Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($P < 0.05$).

Apesar de não ter sido avaliado no presente trabalho outros métodos de aplicação de produtos preservantes na madeira além da imersão, o trabalho realizado por Humar *et al.* (2007), utilizando diferentes métodos e concentrações de biocidas como preservantes de

madeiras, os autores observaram que o método de imersão teve uma grande influência no processo de retenção dos produtos, sendo o método por pincelamento o menos eficaz. Também foi observado pelos autores que a composição da solução preservante não influenciou significativamente na retenção, entretanto a concentração da solução afetou no processo de impregnação do produto na madeira.

Após a análise da Tabela 8 pode-se verificar que existe uma forte correlação positiva entre a retenção dos tratamentos nos CP e as concentrações testadas (Tabela 8), corroborando com o observado por Humar *et al.* (2007). Pode-se verificar que a correlação foi altamente significativa em todos os tratamentos ($< 0,800$), embora o valor obtido com o óleo essencial tenha sido menor (0,696).

Tabela 8. Coeficiente de Correlação (Pearson) entre retenção e concentração dos diferentes tratamentos da cera industrial de lima-ácida.

| Tratamento | Índice de Correlação |
|----------------------------|-----------------------------|
| Cera industrial (Teste 1)* | 0,885** |
| Cera industrial (Teste 2)* | 0,882** |
| Fração não volátil | 0,892** |
| Óleo essencial | 0,696** |
| VLC*** | |
| Fração 2 | 0,872** |
| Fração 3 | 0,908** |
| Fração 4 | 0,866** |

*Teste 1 = ensaio imediatamente após tratamento dos CP. Teste 2 = ensaio após 6 meses de tratamento dos CP.

**Significativo (1%)

***Cromatografia em Coluna à Vácuo

É importante considerar que os CP utilizados nesse trabalho pertencem a espécie *Pinus* sp. Segundo Burger & Richter (1991) e Gonzaga (2006), a estrutura anatômica das coníferas se compõe basicamente de traqueídeos e apresentam pouco parênquima. Sendo assim, os traqueídeos, por serem mais permeáveis, permitem passagem livre dos preservantes na madeira. Este fato poderia justificar a retenção satisfatória dos tratamentos com a cera industrial de lima-ácida.

Através do ensaio qualitativo realizado para comprovar a permanência dos compostos da fração não volátil da cera nos CP após sua impregnação, confirmou-se que os mesmos permaneceram na madeira após o seu tratamento, conforme pode-se visualizar nos perfis cromatográficos da Figura 25.

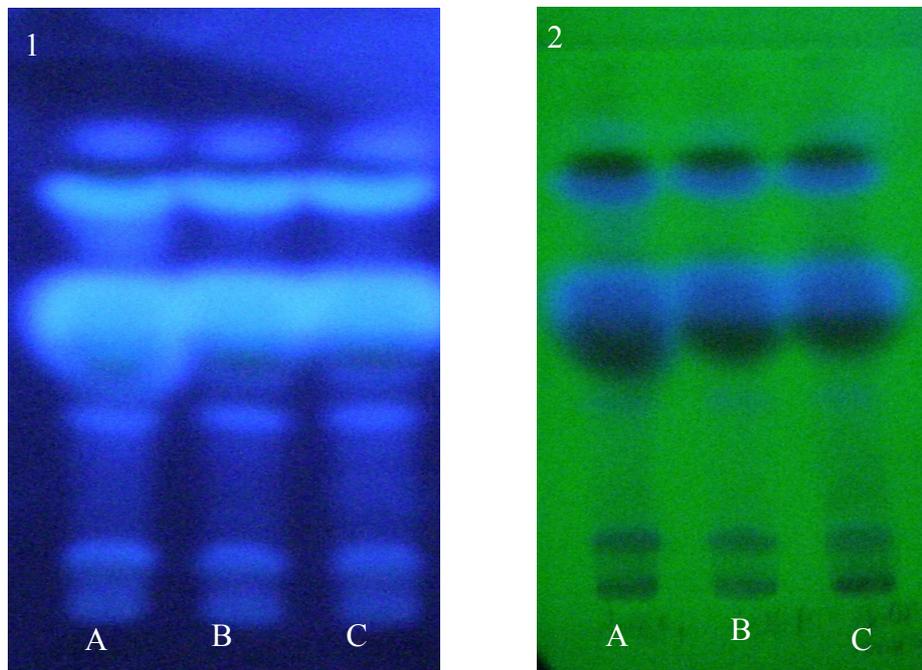


Figura 25. Cromatograma de Camada Delgada. (1) revelação em lâmpada UV 365nm; (2) revelação em lâmpada UV 254nm. (A) Fração não volátil; (B) Extrato obtido dos corpos-de-prova (serragem) tratados com a fração não volátil; (C) Fração não volátil (solução não absorvida nos CP após 24 horas do tratamento).

4.3 Bioatividade da cera industrial de lima-ácida e suas frações contra *C. brevis*

A avaliação da bioatividade de produtos naturais contra insetos-praga depende da determinação das várias estratégias utilizadas.

4.3.1 Cera industrial de lima-ácida

A atividade da cera industrial de lima-ácida no ensaio imediatamente após tratamento dos CP (Teste 1) e no ensaio após 6 meses de tratamento dos CP (Teste 2) pode ser observada nas Figuras 26 e 27, respectivamente, através da curva de mortalidade de *C. brevis*. Os resultados apresentados na Figura 26, mostram que nas concentrações de solução de 5 e 25 mg/cm³, houve respectivamente $34 \pm 13,41\%$ e $37,32 \pm 18,78\%$ de mortalidade dos cupins ao final de 60 dias, não diferindo significativamente do controle, cuja mortalidade foi de $33,32 \pm 4,7\%$. A mortalidade foi significativamente maior do que no controle nas concentrações de solução igual e superiores a 50 mg/cm³ (Tukey $P < 0,05$). Na concentração mais elevada, 100 mg/cm³, a mortalidade ao final do experimento foi de $82 \pm 14,83\%$.

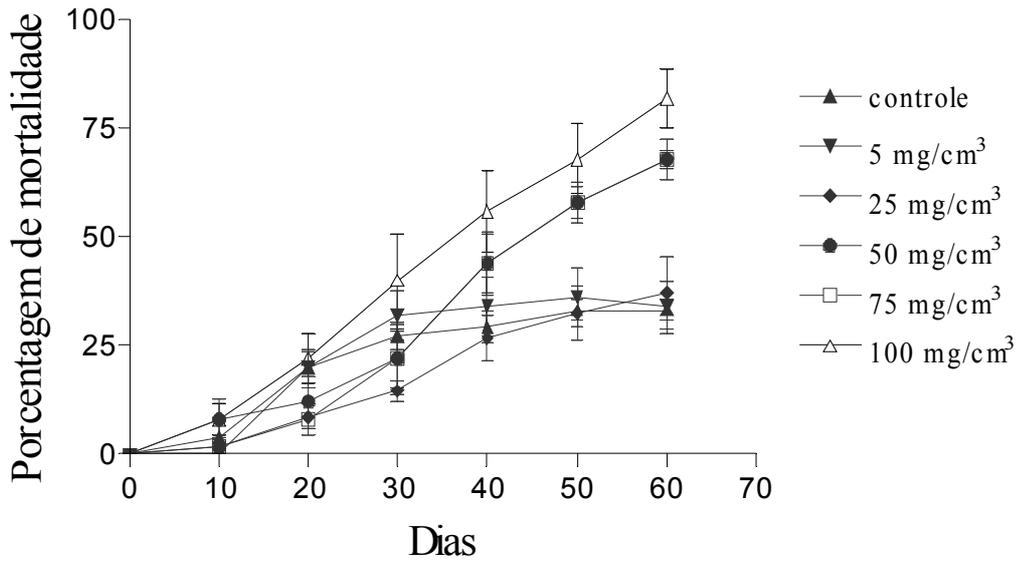


Figura 26. Atividade antitermítica da cera industrial de lima-ácida contra *Cryptotermes brevis* no Teste 1 = ensaio imediatamente após tratamento dos corpos-de-prova. Cera industrial de lima-ácida (mg)/corpo-de-prova (cm³).

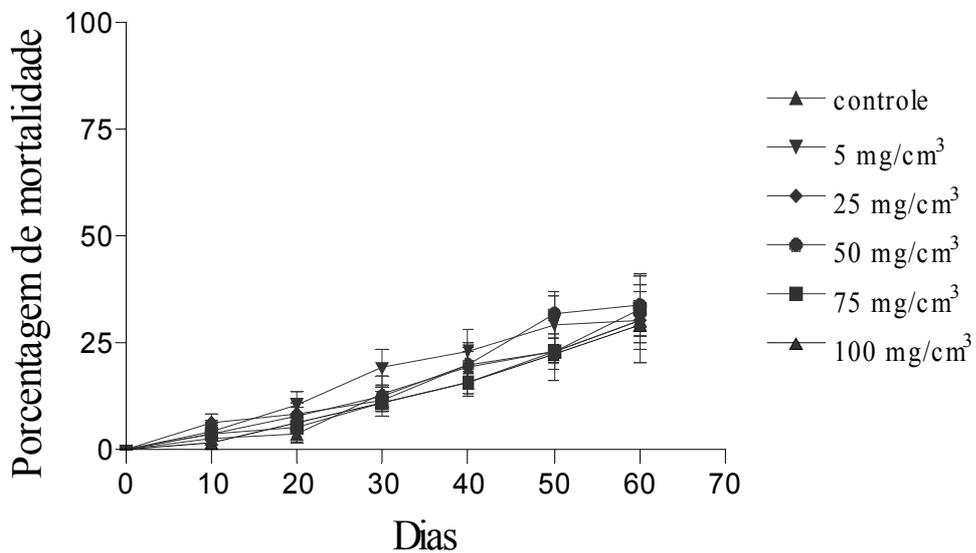


Figura 27. Atividade antitermítica da cera industrial de lima-ácida contra *Cryptotermes brevis* no Teste 2 = ensaio após 6 meses de tratamento dos corpos-de-prova. Cera industrial de lima-ácida (mg)/corpo-de-prova (cm³).

Após um período de 6 meses, verificou-se significativa diminuição da ação da cera sobre os cupins. O valor de mortalidade não diferiu significativamente entre as concentrações da cera industrial de lima-ácida (5 a 100 mg/cm³), nem entre estas e o controle (Figura 27).

A média de mortalidade no controle foi relativamente alta, $33,32 \pm 4,7\%$ em ambos ensaios realizados, porém vários trabalhos da literatura apresentaram um valor de mortalidade no controle entre 10 a 20%, sendo que estes dados foram analisados por um período de até 14 dias (Gutiérrez *et al.*, 1999; Chang *et al.*, 2001; Maistrello *et al.*, 2002; Cheng *et al.*, 2004). Quando o período de exposição dos cupins nos ensaios foi superior a 20 dias a porcentagem de mortalidade no controle foi maior, ficando em torno de 50% (Reyes-Chilpa *et al.*, 1995; Maistrello *et al.*, 2002; Lewis, 2003).

Considerando-se o comportamento alimentar de *C. brevis* no ensaio imediatamente após tratamento dos CP (Teste 1) (Figura 28) e no ensaio após 6 meses de tratamento dos CP (Teste 2) (Figura 29), ao final de 60 dias de tratamento, observou-se que o consumo foi significativamente afetado, evidenciando a persistência do efeito anti-alimentar da cera. Através do Coeficiente de Correlação de Pearson, pôde-se verificar uma correlação inversa ($r = -0,848$, $p < 0,001$) entre consumo de substrato e concentração de solução testada.

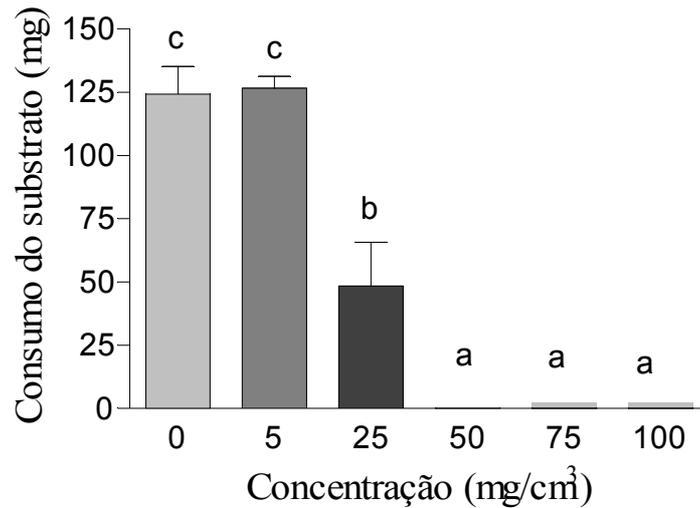


Figura 28. Consumo do corpo-de-prova (madeira de *Pinus* sp.) por *Cryptotermes brevis* em diferentes concentrações de solução da cera industrial de lima-ácida no ensaio imediatamente após tratamento dos corpos-de-prova (Teste 1). Valores seguidos pela mesma letra não diferem significativamente pelo Teste de Tukey ($P < 0.05$); Cera industrial de lima-ácida (mg)/corpo-de-prova (cm³).

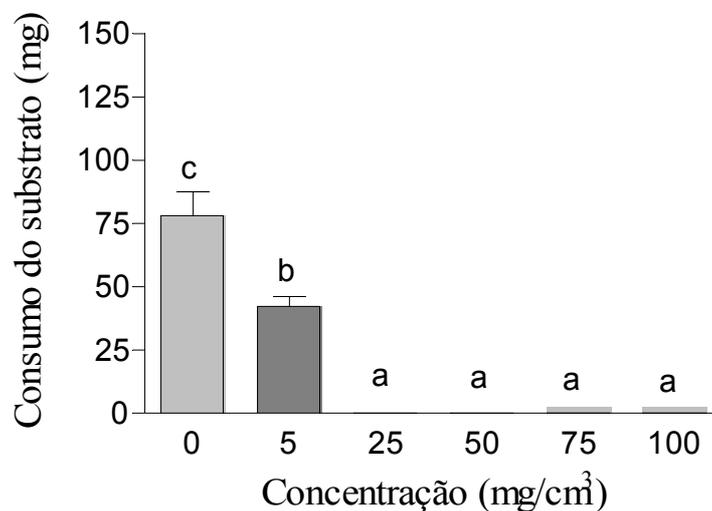


Figura 29. Consumo do corpo-de-prova (madeira de *Pinus* sp.) por *Cryptotermes brevis* em diferentes concentrações de solução da cera industrial de lima-ácida no ensaio após 6 meses de tratamento dos corpos-de-prova (Teste 2). Valores seguidos pela mesma letra não diferem significativamente pelo Teste de Tukey ($P < 0.05$); Cera industrial de lima-ácida (mg)/corpo-de-prova (cm³).

Considerando estes resultados e seguindo os critérios apresentados na metodologia, a cera industrial no Teste 1 (ensaio imediatamente após tratamento dos CP) apresentou um efeito na mortalidade dos insetos. Porém, para o Teste 2 (ensaio após 6 meses de tratamento dos CP), este efeito aparentemente não persistiu, porém a alimentação foi significativamente reduzida. Estes dados indicam que o efeito da cera sobre *C. brevis* foi devido preferencialmente a sua ação anti-alimentar.

4.3.2 Óleo essencial

A mortalidade de *C. brevis* ao final de 60 dias foi baixa, não havendo diferença significativa entre os valores obtidos no controle e nas concentrações de solução entre 20 a 40 mg/cm³. Nas concentrações de 60, 80 e 100 mg/cm³ o valor de mortalidade foi de $41,32 \pm 1,80$, $58,62 \pm 12,62$ e $59,96 \pm 10,26\%$, respectivamente, diferindo significativamente do controle (Figura 30).

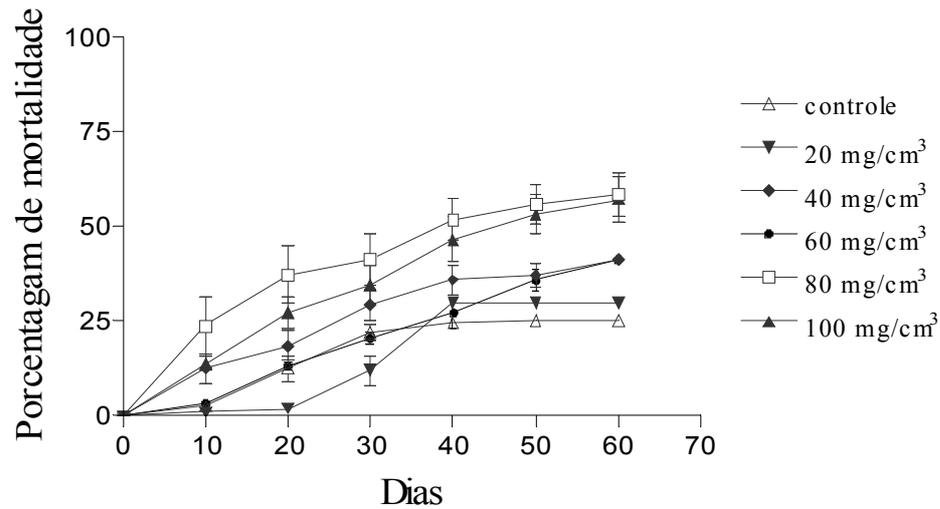


Figura 30. Atividade antitermítica do óleo essencial de lima-ácida contra *Cryptotermes brevis*. C1 = cupins sem alimentação; C2 = acetona. Cera industrial de lima-ácida (mg)/corpo-de-prova (cm³).

Como pode ser observado na Figura 31, os cupins alimentaram-se dos CP tratados com óleo essencial nas concentrações de solução entre 20 e 40 mg/cm³, sendo que a partir da concentração de 40 mg/cm³ houve uma diminuição drástica do consumo de substrato. Na concentração de 100 mg/cm³ o consumo de substrato foi nulo no período do ensaio (60 dias). Provavelmente o aumento da mortalidade nestas concentrações mais elevadas, 60, 80 e 100 mg/cm³ (Figura 30), tenha sido devido ao não consumo do substrato pelos cupins.

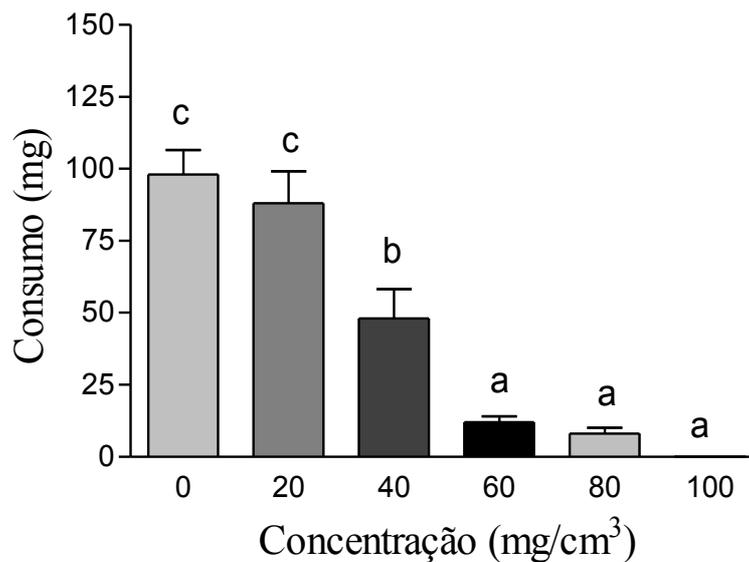


Figura 31. Consumo do corpo-de-prova (madeira de *Pinus* sp.) por *Cryptotermes brevis* em diferentes concentrações de óleo essencial de lima-ácida. Valores seguidos pela mesma letra não diferem significativamente pelo Teste de Tukey ($P < 0.05$); Cera industrial de lima-ácida (mg)/corpo-de-prova (cm^3).

Observando-se as Figuras 30 e 31, vê-se que a mortalidade aumentou nas concentrações de solução mais elevadas, onde também foi observado diminuição da alimentação, ou seja, para um efeito significativo da mortalidade foi necessário uma alta concentração de solução de óleo essencial.

Provavelmente este efeito observado nas concentrações mais elevadas, tenha sido devido a uma ação repelente dos compostos presentes no óleo essencial. Segundo Smith (1989), os hidrocarbonetos voláteis emitidos por plantas resistentes podem atuar como repelentes de insetos.

Vários estudos têm demonstrado a ação de terpenóides contra insetos-praga. Os limonóides representam o nível máximo na seqüência de produção de terpenóides em plantas que normalmente não são atacadas por insetos e as plantas do gênero *Citrus* caracterizam-se pela presença marcante deste grupo de compostos.

O óleo essencial de lima-ácida apresenta como composto majoritário o limoneno, citado na literatura como tóxico e deterrente alimentar para muitas espécies de pragas (Cheng *et al.*, 2004, Hollingsworth, 2005; Raina *et al.*, 2007).

Embora tenha sido reportada na literatura a bioatividade do óleo de citrus contra insetos-praga, sendo o limoneno o composto majoritário, no presente trabalho os resultados obtidos não evidenciaram uma satisfatória ação, quando comparado os valores de concentração x resposta biológica. Não há muitos registros da ação deste composto contra cupins, embora no trabalho de Cheng *et al.* (2004) foi verificada ação do limoneno extraído de *Calocedrus* sp contra *C. formosanus*, um cupim subterrâneo, o que pode ser explicado pelos hábitos muito distintos de *C. brevis*.

Na preparação do ensaio, onde houve um período para evaporação do solvente após a aplicação do óleo essencial nos CP, e mesmo durante o tempo de observação (60 dias), provavelmente houve perda de compostos importantes presentes no óleo devido a volatilidade, o que também pode ter ocasionado a baixa retenção do óleo nos CP (Figura 23B), resultando numa perda de concentração de solução. Observando o consumo dos CP (Figura 31), verificou-se que mesmo quando a mortalidade acumulada não foi maior do que 50%, ou seja, nas concentrações de solução de 40 e 60 mg/cm³, o consumo foi baixo. Numa análise residual de substrato tratado com 0,5% de óleo essencial de laranja, Raina *et al.* (2007), verificaram que em três semanas houve um declínio significativo na quantidade de limoneno presente no óleo,

sendo praticamente negligenciado ao final de oito semanas. Entretanto, um odor característico do óleo essencial ainda foi detectado ao final do experimento, permanecendo, provavelmente, a ação repelente contra os insetos.

Considerando os resultados obtidos com o óleo essencial de lima-ácida, é possível apontá-lo como sendo um dos prováveis agentes da bioatividade observada contra *C. brevis*.

4.3.3 Fração não volátil

No ensaio com a fração não volátil, pode-se observar que a mortalidade dos cupins aumentou gradativamente com o aumento da concentração de solução testada, sendo que o controle não diferiu significativamente das concentrações de 10 e 20 mg/cm³. A mortalidade na maior concentração (50 mg/cm³) foi de $54 \pm 5,47\%$ (Figura 32). Os resultados obtidos possibilitam supor uma ação biológica dos compostos presentes na fração não volátil da cera industrial contra *C. brevis*.

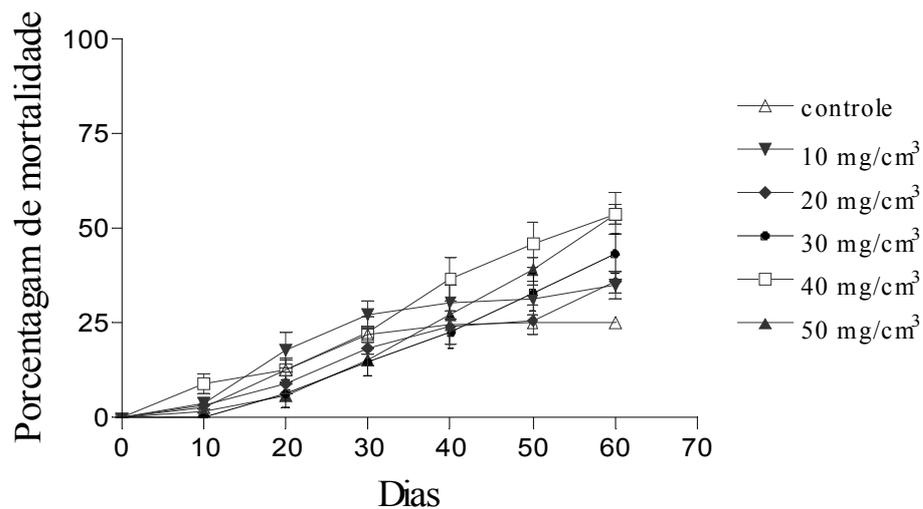


Figura 32. Atividade antitermítica da fração não volátil de lima-ácida contra *Cryptotermes brevis*. Cera industrial de lima-ácida (mg)/corpo-de-prova (cm³). C1 = cupins sem alimentação; C2 = acetona.

Na Figura 33, observou-se que o consumo dos CP foi significativamente menor do que o controle em todas as concentrações, sendo nulo nas concentrações de 40 e 50 mg/cm³, o que sugere uma possível causa da morte dos cupins nesta concentrações devido a inanição.

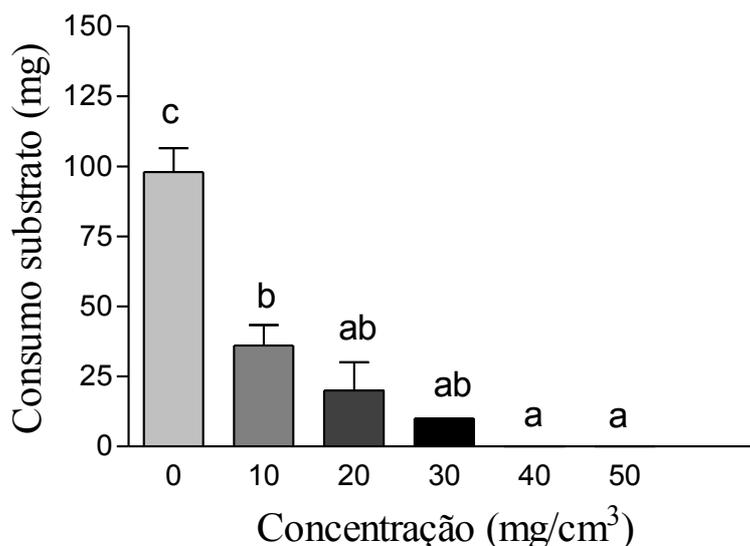


Figura 33. Consumo do corpo-de-prova (madeira de *Pinus* sp.) por *Cryptotermes brevis* em diferentes concentrações de solução da fração não volátil de lima-ácida. Valores seguidos pela mesma letra não diferem significativamente pelo Teste de Tukey ($P < 0.05$); Cera industrial de lima-ácida (mg)/corpo-de-prova (cm³).

Os resultados obtidos com a fração não volátil de lima-ácida, tanto quanto o efeito sobre a mortalidade dos insetos e diminuição da alimentação, possibilitaram a continuidade do fracionamento cromatográfico da cera, sendo este realizado através da VLC.

Em teoria, a atividade observada em uma mistura, como um óleo, ou extrato, pode ocorrer devido à soma das atividades individuais dos constituintes. Assim, o seu fracionamento, cujo objetivo seria isolar os compostos, pode resultar em alíquotas que possuem uma maior atividade do que o extrato original. Em alguns casos, a atividade do extrato ou fração total pode ser menor do que a atividade de seus principais componentes, entretanto, não é incomum que o extrato original tenha uma atividade maior que algumas frações (Houghton *et al.*, 2007).

4.3.4 Frações obtidas por VLC (Vacuum Liquid Chromatography)

As frações 2, 3 e 4 mostraram-se ativas contra *C. brevis*, como pode ser observado através dos resultados de mortalidade (Figuras 34, 35 e 36). As concentrações de 10, 20 e 30 mg/cm³ não diferiram estatisticamente do controle.

Comparando estes resultados aos obtidos com a fração não volátil (Figura 32), percebe-se que os resultados de mortalidade são bastante similares e a mortalidade acumulada segue a mesma tendência.

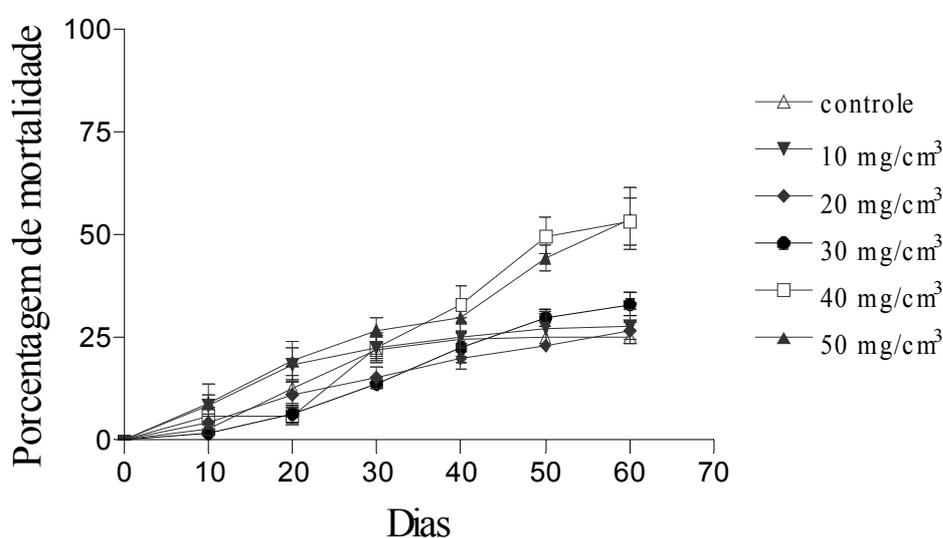


Figura 34. Atividade antitermítica da fração 2 obtida da VLC (Vacuum Liquid Chromatography) contra *Cryptotermes brevis*. Cera industrial de lima-ácida (mg)/corpo-de-prova (cm³); Cera industrial de lima-ácida (mg)/corpo-de-prova (cm³).

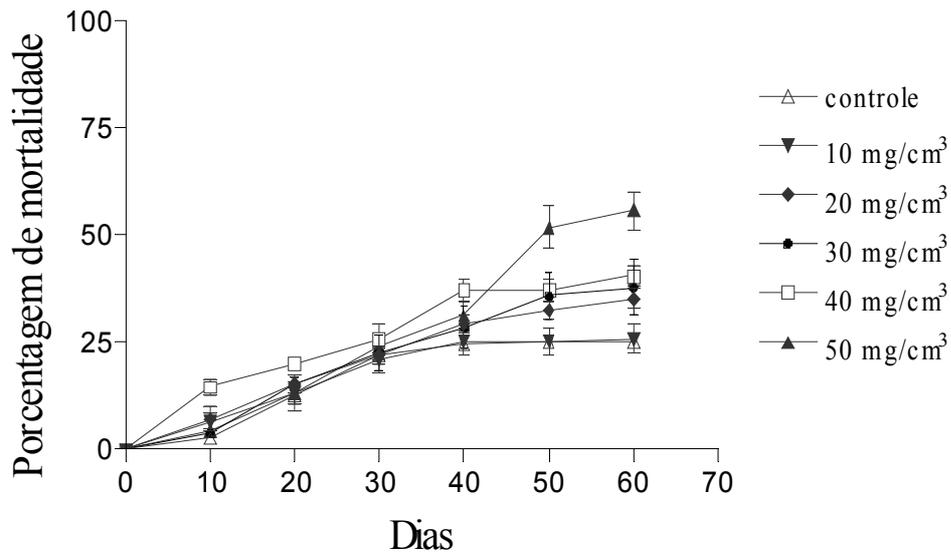


Figura 35. Atividade antitermítica da fração 3 obtida da VLC (Vacuum Liquid Chromatography) contra *Cryptotermes brevis*. Cera industrial de lima-ácida (mg)/corpo-de-prova (cm³).

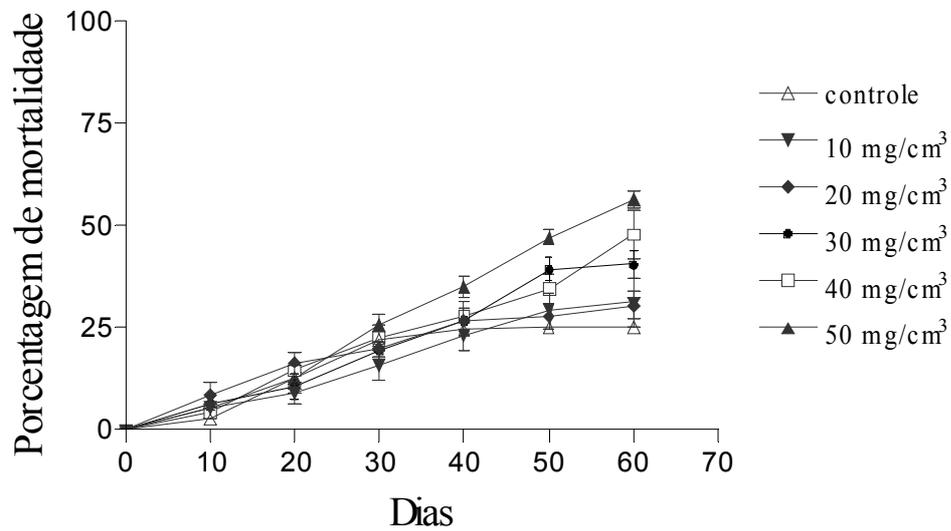


Figura 36. Atividade antitermítica da fração 4 obtida da VLC (Vacuum Liquid Chromatography) contra *Cryptotermes brevis*. Cera industrial de lima-ácida (mg)/corpo-de-prova (cm³).

O sinergismo, ação conjunta de mais de um constituinte, pode resultar em melhor atividade no extrato total do que em seus constituintes isolados. Os resultados de mortalidade obtidos com a fração não volátil (Figura 32), não diferiram significativamente dos resultados obtidos com as frações 2, 3 e 4 (Figuras 34, 35 e 36). Provavelmente, os resultados tenham sido significativamente semelhantes entre as frações visto a presença de compostos químicos em comum, identificados por GC/MS.

Observou-se diminuição do consumo dos CP pelos cupins com o aumento da concentração de solução. Nas concentrações de 40 e 50 mg/cm³ obteve-se o menor consumo, sendo este nulo em todas as frações na concentração de 50 mg/cm³ (Figuras 37, 38 e 39). Os CP tratados com a fração 3 foram os mais consumidos, não diferindo estatisticamente do controle até a concentração de 30 mg/cm³ (Figura 38). Os CP tratados com a fração 2 e 4 foram os menos consumidos (Figura 37 e 39). As frações 2 e 4 caracterizam-se quimicamente pela maior quantidade do composto 5,7-dimetoxicumarina presente na sua composição.

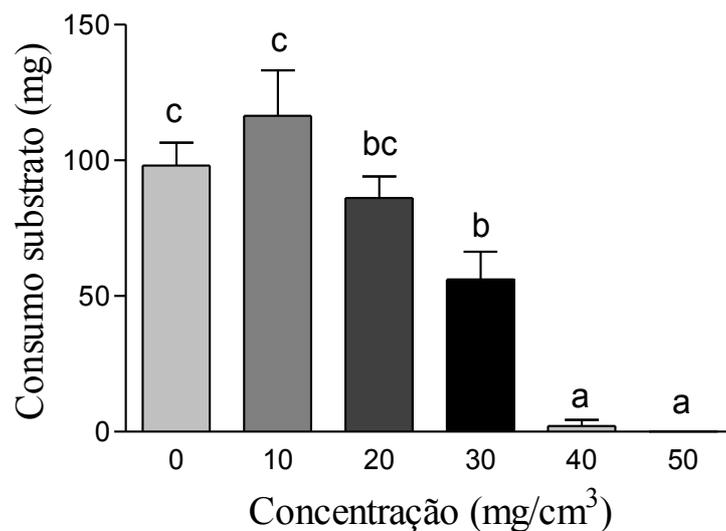


Figura 37. Consumo do corpo-de-prova (madeira de *Pinus* sp) por *Cryptotermes brevis* em diferentes concentrações da fração 2 obtida através da VLC (Vacuum Liquid Chromatography). Valores seguidos pela mesma letra não diferem significativamente pelo Teste de Tukey ($P < 0.05$); Cera industrial de lima-ácida (mg)/corpo-de-prova (cm³).

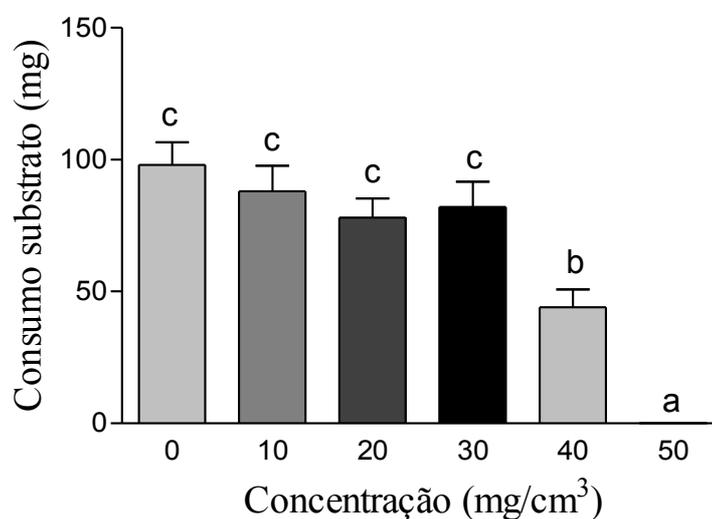


Figura 38. Consumo do corpo-de-prova (madeira de *Pinus* sp) por *Cryptotermes brevis* em diferentes concentrações da fração 3 obtida através da VLC (Vacuum Liquid Chromatography). Valores seguidos pela mesma letra não diferem significativamente pelo Teste de Tukey ($P < 0.05$); Cera industrial de lima-ácida (mg)/corpo-de-prova (cm³).

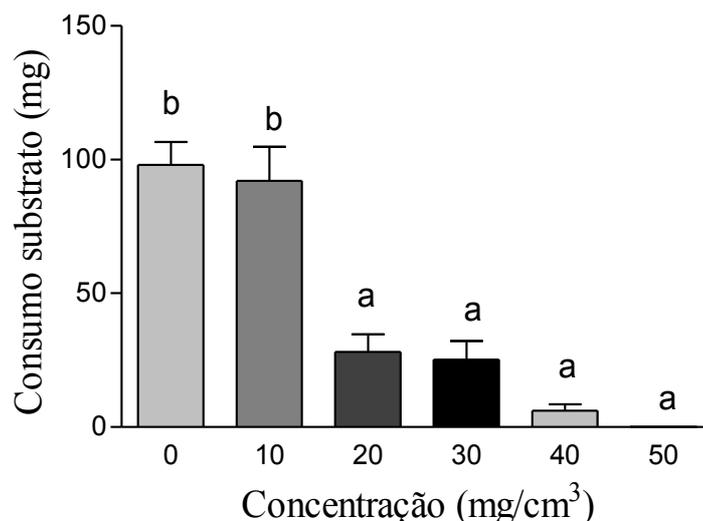


Figura 39. Consumo do corpo-de-prova (madeira de *Pinus* sp) por *Cryptotermes brevis* em diferentes concentrações da fração 4 obtida através da VLC (Vacuum Liquid Chromatography). Valores seguidos pela mesma letra não diferem significativamente pelo Teste de Tukey ($P < 0.05$); Cera industrial de lima-ácida (mg)/corpo-de-prova (cm³).

Somente as frações 2, 3 e 4 obtidas através da VLC foram testadas biologicamente, em virtude do baixo rendimento de material obtido com a fração 1.

4.3.5 Concentração letal mediana (CL₅₀) e Tempo letal mediano (TL₅₀)

Através dos valores obtidos com a curva de mortalidade de *C. brevis* em todos os ensaios realizados com a cera industrial de lima-ácida, óleo essencial, fração não volátil e frações 2, 3 e 4 (VLC), foi calculado o valor da CL₅₀ e do TL₅₀ (Tabela 9). Os resultados da CL₅₀ sugerem uma alta homogeneidade de resposta dos cupins estudados entre a cera, fração não volátil e frações 2, 3 e 4, ressaltando que os resultados não diferiram significativamente

considerando os intervalos de confiança. O valor da CL_{50} obtido com o óleo essencial foi superior (71,99 mg/cm³). Na Tabela 9, também verificou-se que o ensaio utilizando a cera industrial de lima-ácida resultou num tempo necessariamente menor para matar 50% dos cupins (TL_{50} = 38 dias (IC 95% - 35,5 a 40,64 dias), quando comparado aos demais resultados.

Um parâmetro como concentração letal mediana pode ser determinado para comparar a atividade dos extratos, frações ou isolados (Houghton & Raman, 1998). De acordo com os autores, a CL_{50} das frações ativas deveria diminuir em cada estágio do fracionamento, visto que as frações tornam-se mais concentradas com os constituintes ativos. Desta forma espera-se que a CL_{50} dos componentes ou frações mais ativos correspondam aproximadamente à quantidade equivalente presente no extrato original. Entretanto, o valor da CL_{50} dos constituintes isolados ou frações pode ser mais alto do que o esperado se os efeitos de sinergismo ou aditivos dos compostos presentes ocorrer no extrato não purificado, o que pode ter acontecido no presente estudo.

Tabela 9. Valores de Concentração Letal Mediana (CL₅₀) e Tempo Letal Mediano (TL₅₀) obtidos para cada tratamento realizado com a cera industrial de lima-ácida.

| Tratamento | CL ₅₀ (IC95%)* | TL ₅₀ (IC95%)# |
|--------------------|---------------------------|---------------------------|
| Cera industrial | 32,76 (20,73 – 43,35) | 38 (35,5 - 40,64) |
| Óleo essencial | 71,99 (62,45 – 84,74) | 47,03 (42,62 – 52,70) |
| Fração não volátil | 40,13 (34,27 – 49,03) | 56,69 (53,71 – 60,37) |
| Fração 2 | 45,14 (37,82 – 57,99) | 54,49 (49,36 – 61,65) |
| Fração 3 | 44,15 (37,97 – 53,89) | 51,91 (49,09 – 55,27) |
| Fração 4 | 42,57 (36,87 – 51,17) | 52,05 (49,09 – 55,61) |

*Cálculo realizado com a maior concentração de solução testada. Valores em mg/cm³.

Cálculo realizado com a maior concentração de solução testada. Valores em dias.

De acordo com Sheets *et al.* (2000), num estudo com cupins subterrâneos submetidos ao produto químico hexaflumuron, os autores observaram que o TL₅₀ ficou em torno de 27 dias. Os autores sugeriram que o início da toxicidade para os cupins submetidos a diferentes tratamentos de âmbito alimentar não ocorre antes de 15 a 20 dias. No presente trabalho, o TL₅₀ foi maior do que o tempo observado por Sheets *et al.* (2000), porém, em escala de tempo, comparável aos agroquímicos testados por eles. Por outro lado, também é importante considerar que os cupins testados neste trabalho são de espécie diferente daquela testada pelos autores referenciados e o produto testado de origens distintas.

4.3.6 Atividade anti-alimentar

Substâncias com efeito anti-alimentar não necessariamente são repelentes, mas podem cancelar algum sinal num órgão específico no inseto, evitando o início da alimentação. A maioria dos compostos com ação anti-alimentar não matam diretamente o inseto (Cremlyn, 1990).

Os resultados do índice anti-alimentar (IA) obtidos com a cera industrial de lima-ácida e suas frações contra *C. brevis* pode ser observado nas Tabelas 10 e 11, respectivamente. Nenhum dos tratamentos mostrou efeito fagoestimulante, visto serem todos os valores de IA positivos.

Tabela 10. Índice anti-alimentar (IA) e concentração efetiva mediana (CE₅₀) dos tratamentos utilizando a cera industrial de lima-ácida sobre *Cryptotermes brevis*.

| Tratamento/Concentração (mg/cm ³) | IA (média ± DP) | CE ₅₀ (mg/cm ³) | 95% Limite Confiança |
|-----------------------------------------------|----------------------------|----------------------------------------|----------------------|
| Cera industrial | | | |
| Teste 1* | | 24,69 | (21,74 – 27,82) |
| 5 | 0,00 ± 4,42 ^a | | |
| 25 | 49,60 ± 30,00 ^b | | |
| 50 | 100,00 ± 0,00 ^c | | |
| 75 | 100,00 ± 0,00 ^c | | |
| 100 | 100,00 ± 0,00 ^c | | |
| Teste 2* | | 7,35 | - |
| 5 | 29,01 ± 8,92 ^a | | |
| 25 | 100,00 ± 0,00 ^b | | |
| 50 | 100,00 ± 0,00 ^b | | |
| 75 | 100,00 ± 0,00 ^b | | |
| 100 | 100,00 ± 0,00 ^b | | |

*Teste 1 = ensaio imediatamente após tratamento dos corpos-de-prova; Teste 2 = ensaio após 6 meses de tratamento dos corpos-de-prova

Tabela 11. Índice anti-alimentar (IA) e concentração efetiva mediana (CE₅₀) dos tratamentos utilizando frações da cera industrial de lima-ácida sobre *Cryptotermes brevis*.

| Tratamento/Concentração (mg/cm ³) | IA (média ± DP) | CE ₅₀ (mg/cm ³) | 95% Limite Confiança |
|--------------------------------------------------|-----------------------------|----------------------------------------|-------------------------|
| Óleo essencial | | 44,43 | (38,26 – 49,58) |
| 20 | 7,62 ± 13,90 ^a | | |
| 40 | 42,00 ± 22,61 ^b | | |
| 60 | 78,00 ± 6,70 ^c | | |
| 80 | 84,80 ± 8,49 ^c | | |
| 100 | 100,00 ± 0,00 ^c | | |
| Fração não volátil | | 11,68 | (4,48 – 16,07) |
| 10 | 48,17 ± 20,11 ^a | | |
| 20 | 69,60 ± 25,49 ^{ab} | | |
| 30 | 81,00 ± 0,00 ^{bc} | | |
| 40 | 96,20 ± 8,49 ^{bc} | | |
| 50 | 100,00 ± 0,00 ^c | | |
| Fração 2 (VLC) | | 29,74 | (23,73 – 35,53) |
| 10 | 0,00 ± 19,00 ^a | | |
| 20 | 6,99 ± 9,28 ^{ab} | | |
| 30 | 28,70 ± 18,00 ^b | | |
| 40 | 100,00 ± 0,00 ^c | | |
| 50 | 100,00 ± 0,00 ^c | | |
| Fração 3 (VLC) | | 37,27 | (31,19 – 44,98) |
| 10 | 6,73 ± 14,50 ^a | | |
| 20 | 12,09 ± 10,18 ^a | | |
| 30 | 10,38 ± 13,78 ^a | | |
| 40 | 37,00 ± 12,73 ^b | | |
| 50 | 100,00 ± 0,00 ^c | | |
| Fração 4 (VLC) | | 21,91 | (17,58 – 25,26) |
| 10 | 5,17 ± 15,46 ^a | | |
| 20 | 57,00 ± 17,98 ^b | | |
| 30 | 60,78 ± 19,03 ^b | | |
| 40 | 88,60 ± 10,40 ^c | | |
| 50 | 100,00 ± 0,00 ^c | | |

VLC (Vacuum Liquid Chromatography)

Através dos valores de IA obtidos nos tratamentos com a cera no Teste 1 e 2, pode-se sugerir que a mesma proporciona proteção à madeira, até 6 meses após tratamento. No Teste 2, verifica-se um IA de 100% nas concentração de 25 mg/cm³ (Tabela 10).

Entre as frações testadas, a fração não volátil da cera foi a mais ativa contra *C. brevis*, apresentando um alto índice anti-alimentar (IA = 48,17 ± 20,11) na menor concentração testada (10 mg/cm³). Entre as frações obtidas através da VLC, os melhores resultados de IA foram com a fração 4, seguido da fração 2. Na concentração de 50 mg/cm³, tanto no ensaio com a cera industrial, fração não volátil, frações 2, 3 e 4 (VLC), obteve-se um valor de IA = 100, ou seja, com um total efeito anti-alimentar. O óleo essencial foi a fração que apresentou o menor efeito anti-alimentar, porém nas concentrações de solução mais elevadas o resultado foi significativo (Tabela 11).

As Tabelas 10 e 11, também apresentam o valor da concentração efetiva (CE₅₀) calculado através da análise de Probit, ou seja, àquela que diminui em 50% o consumo alimentar de *C. brevis*, seja por uma ação deterrente ou supressora do apetite. No tratamento com a fração não volátil, a CE₅₀ de solução foi de 11,68 mg/cm³ (com IA ≥ 50), ou seja, a concentração efetiva para 50% dos cupins. Valores muito significativos quanto ao efeito também foram obtidos com a cera industrial e a fração 4, com valores de CE₅₀ de 24,69 e 21,91 mg/cm³, respectivamente. Quanto a persistência do efeito anti-alimentar após 6 meses de tratamento dos CP (Teste 2), verifica-se na Tabela 10 que o valor da CE₅₀ foi de 7,35 mg/cm³, sugerindo que a cera aumenta a proteção na madeira com o tempo de exposição ao tratamento, provavelmente por algum tipo de interação da cera com um componente da madeira ou alguma modificação dos compostos, o que deveria ser estudado posteriormente buscando determinar estas possíveis modificações estruturais e o mecanismo de ação.

Os ensaios de toxicidade e atividade anti-alimentar realizados neste trabalho permitiram determinar um efeito tóxico e anti-alimentar contra *C. brevis*. Como pôde ser observado anteriormente, todas os tratamentos com a cera industrial, fração não volátil e frações 2, 3 e 4, apresentaram um perfil de atividade bastante similar e dependente da concentração de solução utilizada, tanto para o efeito de mortalidade aos insetos quanto para o efeito anti-alimentar.

A composição química da fração não volátil, caracterizada nas frações 2, 3 e 4 (VLC), foi similar, porém as proporções dos compostos identificados foram distintas. As frações 2 e 4, que apresentaram um efeito anti-alimentar mais significativo do que a fração 3, com valores de $CE_{50} = 29,74$ e $21,91$, respectivamente, têm como componente majoritário, identificado por GC/MS, a cumarina 5,7-dimetoxicumarina. A fração 3, com uma $CE_{50} = 37,27$ mg/cm³, tem como seu composto majoritário 5,8-dimetoxipsoraleno.

4.3.7 Ação da cera industrial de lima-ácida sobre *Foaina* sp.

Os protistas que habitam o intestino posterior dos chamados "cupins inferiores" têm um importante papel simbiótico na sobrevivência destes insetos, estando diretamente relacionados com a digestão da celulose.

A quantificação da comunidade protista de várias espécies de cupins tem sido conduzida usando uma variedade de técnicas de contagem de células. Estas incluem diferentes soluções salinas e métodos de contagem (Lewis, 2003).

De acordo com Lewis (2003) a maioria das informações sobre protozoários de cupins foram obtidas em experimentos *in situ*. Apesar de ser comprovado que a comunidade de protozoários está envolvida em vários estágios da digestão da celulose, estudos mais detalhados

precisam ser realizados para elucidar como cada espécie de simbiote contribui para a saúde do inseto e como isto os afeta.

O gênero *Foaina* é pertencente à ordem Trichomonadida, um dos 174 gêneros que são simbioses obrigatórios do intestino de cupins-de-madeira-seca (Dolan & Kirby, 2002) (Figura 40).

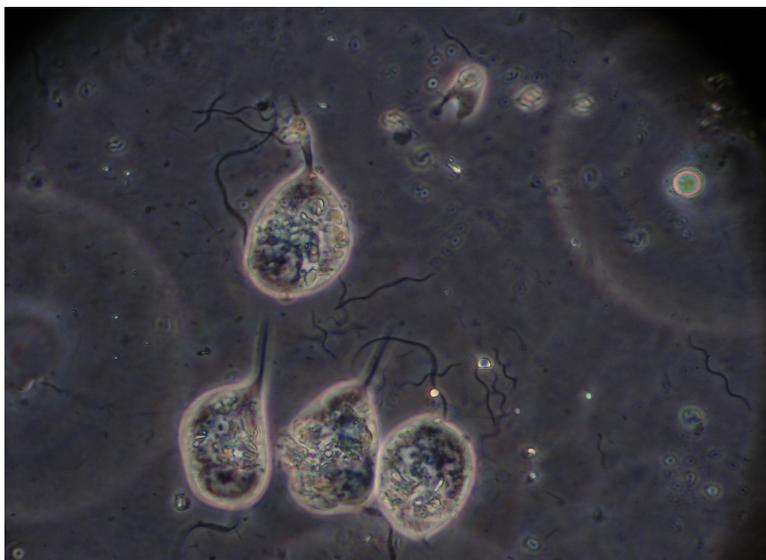


Figura 40. Protozoários do gênero *Foaina* presentes no intestino de *Cryptotermes brevis* (Fonte: autor 2007).

Neste experimento, além da análise dos protozoários, foram avaliados os parâmetros de mortalidade dos cupins e o consumo do substrato. Ao final do período do teste (60 dias), os cupins sobreviventes apresentaram aspecto saudável, porém com motilidade diminuída. Como pode ser observado na Tabela 12, em 60 dias, a mortalidade foi significativamente maior nos

cupins não alimentados (C1) do que no grupo controle (C2) e nos tratamentos com a cera nas concentrações de solução testadas.

A média de consumo (mg) do substrato (Tabela 12) em relação ao controle acetona (C2), foi significativamente menor nas concentrações de 10 e 15 mg/cm³ (60 dias). Os resultados sugerem que os CP tratados com a cera industrial de lima-ácida em concentrações menores pode ser tão palatáveis quanto a dieta controle, não causando efeito anti-alimentar.

Tabela 12. Mortalidade e consumo de substrato pelo cupim-de-madeira-seca *Cryptotermes brevis* em 30 e 60 dias de ensaio.

| Concentração da solução | 30 dias | | 60 dias | |
|-------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | Mortalidade (%)* | Consumo (mg)* | Mortalidade (%)* | Consumo (mg)* |
| C1** | 10,62 ± 7,20 ^a | - | 67,32 ± 6,8 ^a | |
| C2** | 12,62 ± 4,33 ^a | 198 ± 27,74 ^a | 13,98 ± 5,98 ^b | 288 ± 103,05 ^a |
| 0,5 mg/cm ³ | 11,98 ± 1,80 ^a | 162 ± 10,95 ^{ab} | 35,3 ± 8,02 ^c | 206 ± 99,39 ^{ab} |
| 1,0 mg/cm ³ | 8,64 ± 8,0 ^a | 160 ± 14,14 ^{ab} | 27,96 ± 5,05 ^c | 210 ± 15,81 ^{ab} |
| 5,0 mg/cm ³ | 13,98 ± 7,19 ^a | 148 ± 14,83 ^{ab} | 29,96 ± 3,35 ^c | 200 ± 14,14 ^{ab} |
| 10 mg/cm ³ | 13,98 ± 3,65 ^a | 172 ± 29,49 ^{ab} | 27,98 ± 7,64 ^c | 170 ± 15,81 ^b |
| 15 mg/cm ³ | 7,32 ± 5,47 ^a | 118 ± 56,74 ^b | 29,97 ± 8,44 ^c | 164 ± 23,02 ^b |

*As médias seguidas pelas mesmas letras em cada coluna não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey (P<0,05). **C1=cupins sem alimentação; C2=solvente (acetona)

Compostos químicos introduzidos no intestino de cupins pode reduzir a população de protozoários. Conforme Mauldin *et al.* (1981) o tipo de madeira consumida pelos cupins pode afetar a composição de protozoários presentes no seu intestino. No estudo realizado por Maistrello *et al.* (2002), os autores observaram que no grupo controle houve uma variação no número e espécies de protozoários presentes no intestino dos cupins durante o ano. De acordo com os autores, provavelmente, este fato tenha ocorrido devido a várias influências, tais como temperatura e condições nutricionais.

Com relação ao aspecto nutricional, além dos efeitos diretos observados, há efeitos secundários aos cupins e seus simbioses intestinais que poderiam ser provocados pela dieta.

Os cupins alimentados somente com a dieta controle (C2) foram avaliados para quantificar a variação natural que ocorre no número de protozoários do gênero *Foaina* no intestino de *C. brevis*. Os resultados obtidos após 30 e 60 dias de bioensaio (Figuras 41 e 42, respectivamente), indicaram que o número de protozoários teve um declínio significativo quando comparado ao controle acetona (C2). Os cupins mantidos sem alimentação (C1) tiveram o número de protozoários diminuído drasticamente, não sendo quantificados ao final de 60 dias. Porém, como a mortalidade dos cupins foi baixa nas concentrações testadas, esta não parece ser a causa da diminuição observada dos protozoários. Por outro lado, a diminuição significativa do consumo nas concentrações de 10 e 15 mg/cm³ em relação ao controle e o declínio significativo dos protozoários nestas mesmas concentrações pode sugerir que esta seja a causa da diminuição dos simbioses. É possível que, enquanto a concentração dos compostos químicos presentes na cera nas concentrações de solução testadas são suficientemente ativas para remover ou diminuir o número de protozoários do gênero *Foaina* presente no intestino de *C. brevis*, sua concentração nas condições testadas, não foi capaz de

causar alta mortalidade dos cupins.

Maistrello *et al.* (2002), observaram diminuição na população total de protozoários intestinais na presença do óleo de vetiver, conseqüência da não alimentação dos cupins devido a atividade arresistente/deterrente alimentar do óleo. Alfazairy (2004), observou diminuição do número e do vigor de três espécies de protozoários, simbiontes presentes no intestino de *K. flavicollis*, quando estes cupins foram expostos ao óleo essencial de *Casuarina* sp., *T. distichum* e *E. citriodora*. De acordo com o autor, o efeito dos óleos testados pareceu, em geral, ser devido a variedade do óleo, período pós-tratamento e dose-dependente. Nas altas concentrações, os protozoários morreram em poucos dias, enquanto em dosagens menores o número foi significativamente reduzido.

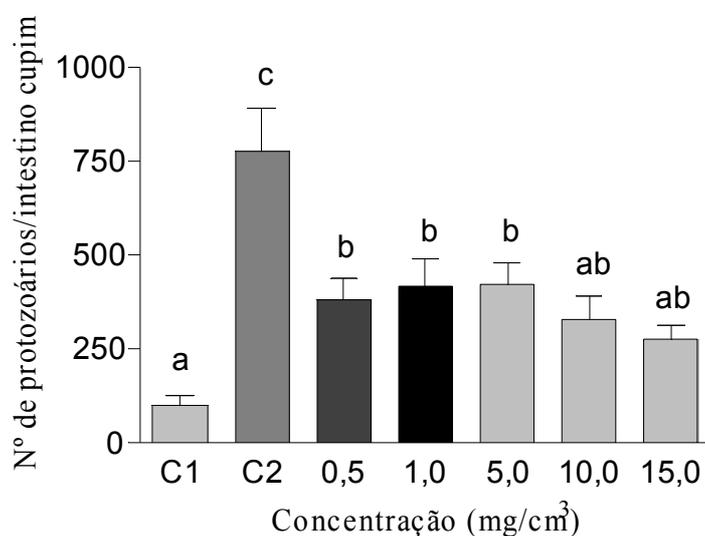


Figura 41. Número médio de protozoários do gênero *Foaina* quantificados no intestino de cupins da espécie *Cryptotermes brevis*, alimentados com corpos-de-prova de madeira de *Pinus* sp. em diferentes concentrações de cera industrial de lima-ácida. Ensaio de 30 dias. C1 = cupins sem alimentação; C2 = controle (acetona). Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($P < 0.05$).

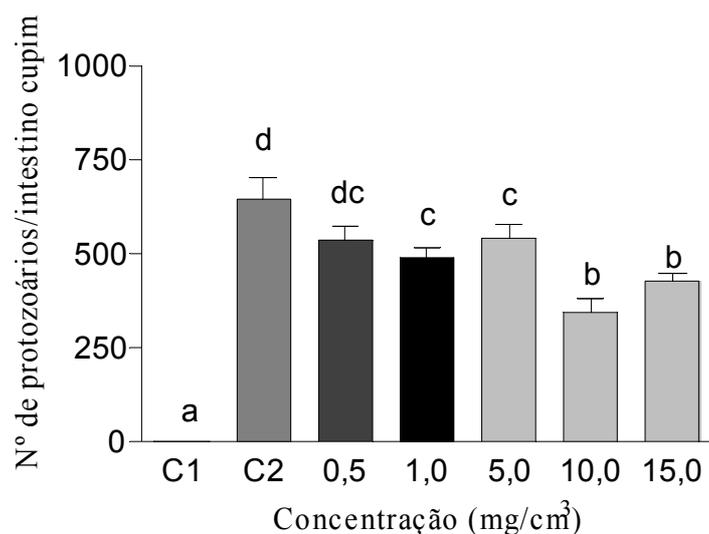


Figura 42. Número médio de protozoários do gênero *Foaina* quantificados no intestino de cupins da espécie *Cryptotermes brevis*, alimentados com corpos-de-prova de madeira de *Pinus* sp. em diferentes concentrações de cera industrial de lima-ácida. Ensaio de 60 dias. C1 = cupins sem alimentação; C2 = controle (acetona). Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($P < 0.05$).

Diferentes gêneros de cupins podem ter uma variação na composição das espécies de protozoários, sendo que nem todos os protozoários presentes no intestino contribuem igualmente na sobrevivência do cupim hospedeiro (Cleveland, 1925a, 1926 *apud* Perrot (2003). No presente estudo, através do Coeficiente de Correlação de Pearson não verificou-se correlação significativa entre mortalidade e número de protozoários do gênero *Foaina* presentes no intestino dos cupins ($r = -0,244$). No estudo realizado por Messer *et al.* (1990), os autores observaram que os cupins da espécie *Neotermes* spp. alimentados com a resina bruta de *Dipterocarpus* sp. morreram na mesma razão, ou mais rapidamente, do que os cupins onde houve defaunação provocada pelo tratamento com oxigênio hiperbárico. Através dos resultados, os autores concluíram que as substâncias tóxicas influenciaram diretamente na

mortalidade dos cupins, sendo que a redução do número de protozoários não foi o principal fator, apesar de poder contribuir para a mortalidade dos insetos.

Outro fator importante a ser destacado é que foram quantificados menor número de simbioses intestinais no ensaio de 30 dias (Figura 41) do que ao final de 60 dias (Figura 42). Este fato sugere que os protozoários poderiam desenvolver alguma resistência para as condições testadas, aumentando o seu número. No estudo de Alfazairy (2004), resultados similares foram observados num dos experimentos realizados, sendo que o autor não encontrou nenhuma razão clara para o fato, mas ele sugere que as condições do teste poderiam ter influenciado no aumento da reprodução dos simbioses intestinais.

No ambiente natural muitos fatores contribuem para a composição das espécies de protozoários presentes no intestino de cupins. A sobrevivência dos protozoários e a habilidade para metabolizar a celulose são dependentes das condições encontradas na colônia e o ambiente externo em que ela está inserida (Belitz & Waller, 1998). Por exemplo, localização geográfica, estação do ano, idade da colônia e tipo de madeira pode influenciar diretamente no número de protozoários. Cook & Gold (1998) encontraram diferenças significativas no número médio de protozoários de diferentes espécies de *Reticulitermes flavipes*. As diferenças foram entre cupins de diferentes locais, castas e mesmo entre indivíduos da mesma população. Sendo assim, os autores sugeriram que a abundância das espécies de protozoários é proporcional ao número total de protozoários presentes, significando que uma única espécie de protozoário poderia ter uma representatividade maior ou menor dependendo do total de protozoários presentes no intestino do cupim.

5. DISCUSSÃO GERAL

Como observado nas curvas de mortalidade, a cera industrial apresentou-se mais ativa quanto ao efeito de mortalidade, sugerindo que a mistura das cumarinas (7-metoxicumarina e 5,7-dimetoxicumarina) e das furanocumarinas (5-metoxipsoraleno e 5,8-dimetoxipsoraleno) presentes na cera é mais ativa do que estes compostos fracionados em proporções distintas.

É importante ressaltar que como a atividade biológica parece estar diretamente associada a família das cumarinas e furanocumarinas, eles poderiam ser ativos em associação com os demais compostos presentes na fração não volátil da cera. Entre estes pode-se citar os componentes da cera epicuticular: hidrocarbonetos, ésteres e alcoóis, assim como flavanonas e flavonóis, presentes habitualmente nos cítricos.

A diminuição do efeito de mortalidade da cera sobre *C. brevis* após 6 meses de estocagem dos CP, poderia ter ocorrido devido à diminuição na concentração dos compostos ativos presentes na cera.

As cumarinas e furanocumarinas têm sido referenciadas na literatura como tendo ação tóxica e anti-alimentar contra insetos-praga. Ballesta-Acosta *et al.* (2008) reportaram uma atividade anti-alimentar significativa de furanocumarinas contra *S. littoralis*. Os compostos bergapteno e xantotoxina mostraram um efeito anti-alimentar positivo contra os insetos avaliados, com valores de $2,72 \pm 17,99$ e $43,99 \pm 11,79$, respectivamente, obtidos a partir da maior concentração testada. Calcagno *et al.* (2002), também registraram o efeito deterrente da xantotoxina contra *S. littoralis*, com efeito sinérgico em mistura com imperatorina.

De acordo com Ballesta-Acosta *et al.* (2008), quando a estrutura química das cumarinas ativas e inativas, tais como isoimperatorina e imperatorina ou xantotoxina e bergapteno são comparadas, o grupo de substituição nas diferentes posições (C-4 ou C-9), ocasiona diferenças na atividade antialimentar. Porém, no estudo com a cera industrial de lima-ácida, não é possível conclusões deste gênero, visto não ter sido obtido nenhum composto isolado nas frações testadas.

Calcagno *et al.* (2002), sugeriram que não somente a presença, mas também a concentração e, mais importante, as proporções de compostos furanocumarínicos, parece ser essencial na bioatividade, no entanto, seria necessária a determinação quantitativa destes compostos.

Moreira *et al.* (2007), verificaram a ação tóxica de uma cumarina natural contra vários insetos-praga, sendo sua atividade diferenciada dependendo da suscetibilidade do inseto ao composto. Segundo os autores, tal variação na bioatividade contra diferentes espécies de insetos é frequente e esperada.

Através dos resultados relativos a quantificação dos protozoários simbiotes intestinais do gênero *Foaina* no intestino de *C. brevis*, pode-se sugerir uma possível ação dos compostos presentes na cera industrial de lima-ácida sobre a fauna intestinal dos cupins, porém outra possibilidade de ação poderia ser proposta, sendo um tema para a continuação deste trabalho.

Muitos estudos têm sugerido o modo de ação de cumarinas e compostos derivados. Cumarinas e muitas furanocumarinas inibem as enzimas de detoxicação do citocromo P450, destruindo a capacidade de detoxicação do inseto (Letteron *et al.*, 1986; Neal & Wu, 1994). Cumarinas possuem uma ação de inibição reversível do citocromo P450, e as furanocumarinas

mostram inibição reversível e irreversível (Neal & Wu, 1994). A inibição do citocromo P450 por aleloquímicos de plantas é um importante componente de defesa das plantas. Em mamíferos, o citocromo P450 primeiramente oxida a furanocumarina xantotoxina no anel furano, provavelmente resultando num epóxido instável. Letteron *et al.* (1986), sugeriram que a xantotoxina é metabolicamente ativada na dupla ligação externa no anel furano formando uma espécie de radicalóide extremamente instável. O citocromo P450, mediado pela formação do radicalóide requer oxidação da xantotoxina. O radicalóide instável pode ligar-se covalentemente ao sítio ativo da P450 ou ser liberado do sítio ativo. De acordo com Neal & Wu (1994), o mecanismo de inibição do citocromo P450 de insetos pela xantotoxina não tem sido estabelecido, mas é provável que seja similar ao modelo proposto por Letteron *et al.* (1986).

Durante o período dos bioensaios realizados para avaliar mortalidade, efeito anti-alimentar e anti-simbiótico da cera industrial de lima-ácida e suas frações, foram observadas qualitativamente, várias respostas fisiológicas dos pseudergates de *C. brevis*: fezes úmidas e escuras em contraste com fezes secas e claras no controle; diminuição dos movimentos e formação de brotos alares em alguns indivíduos. Estas observações sugerem que os pseudergates de *C. brevis* têm mudanças nas suas características fisiológicas quando em contato com os compostos químicos presentes na cera de lima-ácida. O aparecimento de brotos alares em alguns cupins poderia ter ocorrido por causa da mudança nas condições ambientais para o seu desenvolvimento, funcionando como uma estratégia de dispersão para salvar a colônia. Fato similar foi observado por Pessoa (2002), onde avaliou a resistência da madeira termorretrificada de *Eucalyptus grandis* ao ataque de *C. brevis*.

Os distintos ensaios realizados permitiram determinar um efeito anti-alimentar da fração não volátil e das frações 2, 3 e 4 obtidas através da VLC e descrever uma influência negativa

aos simbioses intestinais de *C. brevis* nas concentrações sub-tóxicas da cera. Os resultados obtidos no trabalho permitiram verificar uma correlação entre a bioatividade e a concentração de solução testada. A mortalidade de *C. brevis* ocasionada pela cera industrial e suas frações foi significativa, porém não foi possível sugerir um efeito tóxico, visto a alta taxa de mortalidade observada no controle. Esta pode ter ocorrido pelo fato de que em todos os bioensaios foram utilizados pseudergates de *C. brevis* escolhidos aleatoriamente, provavelmente de diferentes ínstaes. Estes dados corroboram com os obtidos por Haifig *et al.* (2008), em estudo de preferência alimentar realizado com a espécie *Heterotermes tenuis*, os quais consideraram a possibilidade da mortalidade ser ocasionada pelo uso de cupins de ínstaes mais avançados, que apresentam um tempo limitado de vida.

Em relação ao efeito anti-alimentar, verificou-se que os cupins consumiram muito mais lentamente os CP tratados com baixas concentrações da cera industrial e suas frações e praticamente não ocorreu consumo em concentrações mais elevadas. Quando analisados qualitativamente os resultados de mortalidade de *C. brevis* no controle sem alimentação (C1) nos bioensaios realizados os valores observados foram maiores que os verificados para os cupins nos tratamentos onde ocorreu atividade anti-alimentar. Sabendo-se que os insetos, incluindo os cupins, possuem um exoesqueleto de quitina, um material permeável a água, eles são particularmente susceptíveis à dessecação (Blomquist *et al.*, 1987). De fato, a cutícula representa a mais potente fonte de perda de água que afeta a sobrevivência dos artrópodes terrestres (Edney, 1977 *apud* Woodrow *et al.*, 2000). Apesar da extrema tolerância de *C. brevis* à dessecação (Minnick *et al.*, 1973; Rudolph *et al.*, 1990), uma possível explicação para as taxas mais elevadas de mortalidade no C1, quando comparadas aos tratamentos com a cera, poderia ser pelo fato de que os cupins, por estarem em ambiente com umidade extremamente reduzida pela falta de substrato, estivessem mais susceptíveis à dessecação, enquanto que, apesar dos

cupins não se alimentarem dos CP tratados, a presença destes reduz a dessecação.

Considerando o volume significativo de resíduos gerados no processamento da lima-ácida em escala industrial, em especial da cera industrial obtida a partir da extração do óleo essencial, e o potencial bioativo que apresentou contra *C. brevis*, como comprovado neste trabalho, torna-se interessante o uso deste resíduo agroindustrial como uma alternativa para o controle de cupins-de-madeira-seca da espécie *C. brevis*. Estudos futuros são necessários para isolamento dos compostos presentes nas frações bioativas, avaliando a relação estrutura química/atividade biológica, bem como a avaliação de métodos adequados para a aplicação da cera na madeira.

6. CONCLUSÕES

Todas as metodologias desenvolvidas neste trabalho foram realizadas com o objetivo de avaliar a potencialidade de utilização da cera industrial de lima-ácida como preservante de madeira para o controle do cupim-de-madeira seca *C. brevis*, conseqüentemente podemos concluir que:

-As três frações obtidas por VLC e analisadas por GC-MS apresentaram composição química muito similar, porém com proporções distintas dos compostos.

-Foram identificados nas frações obtidas por VLC os compostos: 7-metoxicumarina, 5,7-dimetoxicumarina, 5-metoxipsoraleno e 5,8-dimetoxipsoraleno, entre outros compostos presentes minoritariamente.

-O óleo essencial extraído da cera industrial por hidrodestilação se caracterizou pela presença majoritária do limoneno, seguido de γ -terpineno, β -pineno, entre outros compostos minoritários.

-A retenção nos corpos-de-prova de *Pinus* sp. da cera industrial de lima-ácida e frações em todos os tratamentos ficou dentro dos padrões exigidos.

-A cera industrial de lima-ácida mostrou ser efetiva contra cupins-de-madeira-seca da espécie *C. brevis*, reduzindo sua atividade alimentar em baixas concentrações e também reduzindo a sobrevivência dos cupins nas concentrações mais elevadas ($> 25 \text{ mg/cm}^3$).

-Os CP de madeira de *Pinus* sp. impregnados com a cera industrial de lima-ácida mantiveram sua ação anti-alimentar após 6 meses de tratamento.

-O óleo essencial foi pouco efetivo quando comparado a cera industrial de lima-ácida e suas frações.

-Constatou-se redução do número de protozoários simbioss do gênero *Foaina* no intestino de *C. brevis* nos bioensaios com a cera industrial de lima-ácida.

-A cera industrial de lima-ácida apresenta potencial para ser utilizada na proteção de madeira contra *C. brevis*, fornecendo, desta forma, um novo valor agregado a um subproduto da indústria cítrica.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdelgaliel, S.; Abassy, M.; Belal, A.S. & Rasoul, M. (2008). Bioactivity of two major constituents isolated from the essential oil of *Artemisia judaica* L. **Bioresource Technol**, 99: 5947-5950.
- Ahmed, S.; Riaz, M & Shahid, M. (2006). Response of *Microtermes obesi* (Isoptera, Termitidae) and its gut bacteria towards some plant extracts. **J. Food Agri. Environ**, 4: 317-320.
- Ahmed, S.; Riaz, M.A.; Malik, A.H. & Shahid, M. (2007). Effect of seed extracts of *Withania somnifera*, *Croton tiglium* and *Hygrophyla auriculata* on behavior and physiology of *Odontotermes obesus* (Isoptera: Termitidae). **Biol. Bratislava**, 62: 770-773.
- Alfazairy, A.M. (2004). Antimicrobial activity of certain essential oils against hindgut symbionts of the drywood termite *Kaloterms flavicollis* Fabr. And prevalent fungi on termite-infested wood. Blackwell Verlag, Berlin, **JEN**, 128: 554-560.
- Amaral, R.D.A.M. (1998). Efeitos do análogo do hormônio juveni – metoprene, na diferenciação de soldados em cupins da espécie *Cryptotermes brevis* (Isoptera, Kalotermitidae). **Ar. Inst. Biol**, 65: 1-7.
- Amaral, R.; Neves, G.; Farias, F. & Eifler-Lima, V.L. (2003). Química Combinatória: moderna ferramenta para a obtenção de candidatos a protótipos de novos fármacos. **Rev. Bras. Ciên. Farm**, 39: 351-363.
- Arruda, W.; Oliveira, G.M.C. & Silva, I.G. (2003). Toxicidade do extrato etanólico de

Magonia pubescens sobre larvas de *Aedes aegypti*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**, 36: 17-25.

ASTM (American Society for Testing and Materials) D3345-74 (1999). Standard Test Method for Laboratory Evaluation of Wood and Other Cellulosic Materials for Resistance to Termites. In: **Annual Book of Standards, vol. 4**. American Society for Testing and Materials, West Conshohocken, Pennsylvania, USA.

Atti-Santos, A.C.; Rossato, M.; Atti Serafini, L.; Cassel, E. & Moyna, P. (2005). Extraction of essential oils from lime (*Citrus latifolia* Tanaka) by hydrodistillation and supercritical carbon dioxide. **Braz. Arch. Biol. Technol**, 48: 155-160.

Bacchus, S. (1987). A taxonomic and biometric study of the genus *Cryptotermes* (Isoptera: Kalotermitidae). **Trop Pest Bull**, 7: 1-91.

Ballesta-Acosta, M.C.; Pascual-Villalobos, M.J. & Rodriguez, B. (2008). The antifeedant activity of natural plant products towards the larva of *Spodoptera littoralis*. **Spanish J. Agr. Res**, 6: 85-91.

Barros, N.M.; Heinzen, H.; Cesio, M.V.; Acosta, S.; Mato, M.; Sbeghen-Loss, A.C.; Rech, V. & Frizzo, C. (2008). The use of residues from the citrus industry to control dry-wood termites *Cryptotermes brevis* (Isoptera-Kalotermitidae). **Sociobiology**, 51: 283-293.

Baas, W.J. (1989). Secondary plant compounds, their ecological significance and consequences for the carbon budget. In: **Causes and consequences of variation in growth rare and productivity of higher plants**. H. Lumbers. La Haya, Holanda, SPB Academic Publishing Inc.

- Belitz, L.A. & Waller, D.A. (1998). Effect of temperature and termite starvation on phagocytosis by protozoan symbionts of the eastern subterranean termite *Reticulitermes flavipes* Kollar. **Microb Ecol**, 36: 175-180.
- Berenbaum, M.R. (1981). Patterns of furanocoumarins distribution and insect herbivory in the Umbelliferae: plant chemistry and community structure. **Ecology**, 62: 1254-1266.
- Berenbaum, M.R. (1986). Postingestive effects of phytochemicals on insects: on Paracelsus and plant products. In: **Insect-Plant Interactions**. J. R. Miller and T. A. Miller (eds). Springer, New York, pp. 121-154.
- Berenbaum, M.R. (1995). The chemistry of defense: theory and practice. In: **Chemical ecology: the chemistry of biotic interaction**. T. Eisner and J. Meinwald. Washington D.C., National Academy of Sciences: 1-17.
- Berti Filho, E. (1993). **Cupins ou térmitas**. Piracicaba: IPEF; SIF: Manual de Pragas em Florestas, 56p.
- Blonquist, G.J.; Nelson, D.R. & deRenobales, M. (1987). Chemistry, biochemistry, and physiology of insect cuticular lipids. **Arch. Insect Biochem. Physiol**, 6: 227-265.
- Boué, S. & Raina, A. (2003). Effects of plant flavonoids on fecundity, survival and feeding of the formosan subterranean termite. **J. Chem. Ecol**, 11: 2575-2584.
- Braddock, R.J. (1999). **Handboock of citrus by products and processing technology**. John Wiley & Sons. Toronto.
- Brand, M.; Anzaldo, J. & Moreschi, J. (2006). Novos produtos para o tratamento preservante da madeira. “Perspectivas da pesquisa e utilização”. **Floresta**, 36: 129-138.

- Breznak, J. & Brune, A. (1994). Role of microorganisms in the digestion of lignocellulose by termites. **Annu Rev. Entomol**, 39: 453-487.
- Brugerolle, G. (2000). Microscopical investigation of the genus *Foaina*, a parabasalid protist symbiotic in termites and phylogenetic considerations. **Europ. J. Protistol**, 36: 20-28.
- Brugerolle, G. (2005a). The flagellates of the termite *Hodotermopsis sjoistedti*: Immunological and ultrastructural characterization of four new species in the genera *Spirotrichonympha*, *Spirotrichonympha* and *Microjoenia*. **Europ. J. Protistol**, 41: 299-311.
- Brugerolle, G. (2005b). The amoeboid parabasalid flagellate *Gigantomonas herculea* of the African termite *Hodotermes mossambicus* reinvestigated using immunological and ultrastructural techniques. **Acta Protozool**, 44: 89-99.
- Bruneton, J. (1995). **Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal plants**. Paris, Lavoisier Publishing, Inc.
- Bueno, O.C. (2005). Plantas inseticidas no controle de formigas cortadeiras. **Rev. Agroecologia Hoje**, 28: 20-22.
- Burger, L. & Richter, H.G. (1991). **Anatomia da madeira**. Sociedade Alemã pela cooperação Tecnológica, pp. 13-123.
- Calcagno, M.P.; Coll, J.; Lloria, J.; Faini, F. & Alonso-Amelot, M. (2002). Evaluation of synergism in the feeding deterrence of some furanocoumarins on *Spodoptera littoralis*. **J. Chem. Ecol**, 1: 175-191.
- Carter, F.L.; Jones, S.C.; Mauldin, J.K. & Camargo, C.R.R. (1983). Responses of *Coptotermes formosanus* Shiraki to extracts from five Brazilian hardwoods. **Z. Angew**

Entomol, 95: 5.14.

Chang, S.; Cheng, S. & Wang, S. (2001). Antitermitic activity of essential oils and components from *Taiwania* (*Taiwania cryptomerioides*). **J. Chem. Ecol**, 4: 717-724.

Cheng, S.S., Wu, C. L.; Chang, H.; Kao, Y.T. & Chang, S. (2004). Antitermitic and antifungal activities of essential oil of *Calocedrus formosana* leaf and its composition. **J. Chem Ecol**, 30: 1957-1967.

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

Coelho, J. (1993). **Lima-ácida “Tahiti” para exportação e aspectos técnicos da produção**. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária, Secretaria de Desenvolvimento Rural. Programa de Apoio à Produção e Exportação de Frutas, Hortaliças, Flores e Plantas Ornamentais, Brasília: Embrapa-SPI, 35p. (Série publicações técnicas).

Constantino, R. (1998). Catalog of the living termites of the New World (Insecta: Isoptera). **Arq. Zool**, 35: 135-231.

Constantino, R. (2002). The pest termites of South America: taxonomy, distribution and status. **J. Appl. Ent**, 126: 355-365.

Cook, T.J. & Gold, R.E. (1998). Organization of the symbiotic flagellate community in three castes of eastern subterranean termites, *Reticulitermes flavipes* (Isoptera:Rhinotermitidae). **Sociobiology**, 31: 25-39.

- Cook, T.J. & Gold, R.E. (2000). Effects of different cellulose sources on the structure to the hindgut flagellate community in *Reticulitermes virginicus* (Isoptera: Rhinotermitidae). **Sociobiology**, 35: 119-130.
- Cornelius, M.L.; Grace, J.K. & Yates, J.R. (1997). Toxicity of monoterpenoids and other natural products to the Formosan subterranean termite (Isoptera: Rhinotermitidae). **J. Econ. Entomol**, 90: 320-325.
- Costa, A.F. (1994). **Farmacognosia**. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 5ª ed., 530p.
- Costa-Leonardo, A.M. & Thorne, B. (1995). Iscas e outras metodologias alternativas para o controle de cupins. In: **Alguns aspectos atuais da biologia e controle de cupins**, Berti-Filho, E. & Fontes, L.R. FEALQ, pp. 89-94.
- Costa - Leonardo, A.M. (2002). **Cupins-praga: morfologia, biologia e controle**. 1 ed. Rio Claro, São Paulo, 1: 128p.
- Cremllyn, R.J. (1990). Some novel methods of insect control. In: **Agrochemicals: preparation and mode of action**. Ed. Wiley, 396p.
- Dolan, M. F. & H. Kirby. 2002. *Gyronympha*, *Criconympha* and *Prosnyderella*, three new genera of calonymphids (Parabasalia: Trichomonadida) from dry-wood eating termites (Isoptera: Kalotermitidae). **Europ. J. Protistol**, 38: 73-81.
- Dominguez, X.A. (1973). Coumarins. In: **Métodos de Investigación Fitoquímica**. 1a ed. Editorial Limusa. 281p.
- Dugo, G.; Bartec, K.; Bonaccorsi, I; Catalfamo, M. & Cotronio, A. (1999a). Advanced Analytical Techniques for the Analysis fo Citrus Essential Oils. Part 1. Volatile fraction:

- HRGC/MS Analysis. **Essence Derivat. Agrumari**, 69: 251-283.
- Dugo, G.; Bartec, K.; Bonaccorsi, I; Catalfamo, M. & Cotronio, A. (1999b). Advanced Analytical Techniques for the Analysis fo Citrus Essential Oils. Part 3. Oxygen heterocyclic compounds: HPLC, HPLC/MS, OPLC, SFC, Fast HPLC Analysis. **Essence Derivat. Agrumari**, 69: 251-283.
- Edwards, R. & Mill, A.E. (1986). **Termites in buildings: their biology and control**. Felcourt: Rentokil, 231 p.
- Eisner, T. & Meinwald, J. (1995). **Chemical ecology. The chemistry of biotic interaction**. Washington D.C., National Academy of Sciences.
- Escoubas, P.; Fukushi, Y.; Lajide, L. & Mizutani, J. (1992). A new method for fast isolation of insect antiffedant compounds from complex mixtures. **J. Chem Ecol**, 18: 1819-1832.
- Fernandes, P.M. & Alves, S.B. (1991). Controle de *Cornitermes cumulans* (KOLAR) (Isoptera: Termitidae), com *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok. em condições de campo. **An. Soc. Entomol. Bras**, 20: 45-49.
- Fernandes, J.; David, V.; Facchini, P.; Silva, F.; Filho, E. & Vieira, P. (2002). Extrações de óleos de sementes de citros e suas atividades sobre a formiga cortadeira *Atta sexdens* e seu fungo simbionte. **Quim. Nova**, 6: 1091-1095.
- Finney, D.J. (1971). **Probit analysis**, trird ed., Cambridge University Press, Cambridge, Great Britain, 333 p.
- Fokialakis, N.; Osbrink, W.; Mamonov, L.; Gemejjeva, N.; Mims, A; Skaltsounis, A.; Lax, A. & Cantrell, C. (2006). Antiffedant and toxicity effects of thiophenes from four *Echinops*

- species against the Formosan subterranean termite, *Coptotermes formosanus*. **Pest. Manag. Sci**, 62: 832-838.
- Fontes, L.R. & Araújo, R.F. (1999). Os cupins. In: **Insetos e outros invasores de residências**. Mariconi, F.A.M.. FEALQ: Piracicaba, pp. 35-90
- Gallo, D.; Nakano, O.; Silveira Neto, O.; Carvalho, R.P.L.; Batista, G.C.; Berti Filho, E.; Parra, J.R.P.; Zucchi, R. A.; Alves, S.B.; Vendramin, J.D.; Marchini, L.C.; Lopes, J.R.S. & Omoto, C. (2002). **Entomologia Agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 920 p.
- Ganapaty, S.; Pannakal, S.T.; Fotso, S. & Laatsch, H. (2004). Antitermitic quinones from *Diospyros sylvatica*. **Phytochemistry**, 65: 1265-1271.
- Georges, K.; Jayaprakasan, B.; Dalavoy, S. & Nair, M. (2008). Pest-managing activities of plant extracts and anthraquinones from *Cassia nigricans* from Burkina Faso. **Bioresource Technol**, 99: 2037-2045.
- Gonzaga, A.L. (2006). Botânica e anatomia da madeira. In: **Madeira: Uso e conservação**. Cadernos Técnicos, 6, IPHAN/MONUMENTO, 246p.
- Grace, J.K. (1997). Biological control strategies for supression of termites. **J. Agri. Entomol**. 14: 281-289.
- Gutiérrez, C.; Gonzalez-Coloma, A & Hoffmann, J. (1999). Antifeedant properties of natural products from *Parthenium argentatum*, *P. Argentatum* x *P. Tomentosum* (Asteraceae) and *Castela emoryi* (Simaroubeaceae) against *Reticulitermes flavipes*. **Ind. Crops Prod**, 10: 35-40.
- Green, S. B.; N. J. Salkind. 2004. **Using SPSS for Windows and macintosh-analysing and**

understanding data, 4 ed. New Jersey: Printice Hall. 457p.

Hadacek, F.; Müller, C.; Werner, A.; Greger, H. & Proksch, P. (1994). Analysis, isolation and insecticidal activity of linear furanocoumarins and other coumarin derivatives from *Peucedanum* (Apiaceae: Apioideae). **J. Chem. Ecol**, 8: 2035-2054.

Haifig, I.; Costa-Leonardo, A.M. & Marchetti, F.F. (2008). Effects of nutrients on feeding activities of the pest termite *Heterotermes tenuis* (Isoptera: Rhinotermitidae). **J. Appl. Entomol.** 132: 497-501.

Harborne, J.B. (1993). Advances in chemical ecology. **Nat. Prod. Rep**, 6: 327-348.

Hegnauer, R. (1969). Chemical evidence for the classification of some Plant Taxa. In: **Perspectives in Phytochemistry**. Harborne, J.B and Swain, T. Londres, Academic Press, pp. 121-123.

Hildeberg, W. & Bladt, S. (1996). **Analysis: a thin layer chromatography atlas**. 2ed. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg. 384 p.

Hollingsworth, R.G. (2005). Limonene, a citrus extract, for control of mealybugs and scale insects. **J. Econ. Entomol**, 98: 772-779.

Hostettmann, K. Hostettman, M. & Marston, A. (1986). **Preparative Chromatography Techniques: applications in natural product isolation**. Spring-Verlag Berlim Heideberg, 139p.

Hostettmann, K. (1999). Strategy for the biological and chemical evaluation of plant extracts. **Disponível (online)**. <http://www.iupac.org/symposia/proceedings/phuket97/hostettmann>.

- Houghton, P.J. & Raman, A. (1998). Analysis of crude extracts, fractions and isolated compounds. In: **Laboratory Handbook for the fractionation of natural extracts**. 1a ed., 199p.
- Houghton, P.J.; Howes, M.J.; Lee, C.C. & Steventon, G. (2007). Uses and abuses of in vitro tests in ethnopharmacology: usualizing an elephant. **J. Ethnopharmacol**, 110: 391-400.
- Huet, R. (1991). Les huiles essentielles d'agrumes. **Fruits**, 4: 501-513.
- Humar, M.; Zlindra, D. & Pohleven, F. (2007). Influence of wood species, treatment method and biocides concentration on leaching of copper-ethanolamine preservatives. **Build. Environ**, 42: 578-583.
- Kovats, E. (1958). Gas chromatographic characterization of organic compounds. I. Retention indexes of aliphatic halides, alcohols, aldehydes and ketones. **Helv. Chim. Acta**, 41: 1915.
- Laffont, E.R. & Berti-Filho, E. (2000). Detecção, danos e controle do cupim-de-madeira-seca em móveis históricos do Museu Luiz de Queiroz. **Scientia Agri**, 57: 173-175.
- Lanças, F.M. & Cavicchioli, M. (1990). Analysis of the essential oils of Brazilian citrus fruits by capillary gas chromatography. **J. High Resolut. Chrom**, 13: 207-209.
- Leite, A.C.; Bueno, F.; Oliveira, C.; Fernandes, J.B.; Vieira, P.; Silva, F.; Bueno, O. (2005). Limonoids from *Cipadessa fruticosa* and *Cedrela fissilis* and their insecticidal activity. **J. Braz. Chem. Soc**, 6: 1391-1395.
- Lelis, A. (1992). The loss of intestinal flagellates in termites exposed to the juvenile hormone analogue (JHA) - methoprene. **Mater. Org**, 27:171-178.

- Letteron, P.; Descatoire, V.; Larrey, D.; Tinel, M.; Geneve, J. & Pessayre, D. (1986). Inactivation and induction of cytochrome P-450 by various psoralen derivatives in rats. **J. Pharmacol. Experim. Ther (JPET)**, 238: 685-692.
- Lewis, J.L. (2003). Examination of protest communities in three species of *Reticulitermes* subterranean termites (Isoptera: Rinoitermitidae). **Thesis Master of Science**. University of Georgia, 128p.
- Li, F.; Frohlich, J.; Pfeiffer, P. & Koning, H. (2003). Termite gut symbiotic archezoa are becoming living metabolic fossils. **Eukaryotic Cell**, 2: 1091-1098.
- Lima, J.T. & Costa-Leonardo, A.M. (2007). Recursos alimentares explorados pelos cupins (Insecta: Isoptera). **Biota Neotropica**, 7: 243-250.
- Maistrello, L; Henderson, G. & Laine, R. (2002). Comparative effects of vetiver oil, nootkatone and disodium octaborate tetrahydrate on *Coptotermes formosanus* and its symbiotic fauna. **Pest. Manag. Sci**, 59: 58-68.
- Marer, P. (2002). Residential industrial pest control. **Disponível (online)** <http://www.ipm.ucdavis.edu>.
- Matsumura, F. (1987). Advances in understanding insecticide mode of action. **Pest. Sci. Biotechnol**, Alden Press: 151-161.
- Mauldin, J.K.; Carter, F. & Rich, N.M. (1981). Protozoan populations of *Reticulitermes flavipes* and *Coptotermes formosanus*. **Insect Biochem**, 12: 193-199.
- Mechkovski, A. & Akerele, C.O. (1992). **Quality control methods for medicinal plant materials**. WHO/PHARM/92.559. Switzerland: World Health Organization.

- Mendonça, L.; Conceição, A.; Piedade, J.; Cavallo, V. & Teodoro, V. (2006). Caracterização da composição química e do rendimento dos resíduos industriais do limão Tahiti (*Citrus latifolia* Tanaka). **Cienc. Tecnol. Aliment**, 26: 870-874.
- Messer, A.; McCormick, K.; Sunjaya, H.; Tumbel, F. & Meinwald, J. (1990). Defensive role of tropical tree resins: antitermitic sesquiterpenes from southeast asian dipterocarpaceae. **J. Chem. Ecol**, 16: 3333-3352.
- Messiano, G.; Vieira, L.; Machado, M.; Lopes, L.; Bortoli, S. & Zuchrman-Schpector, J. (2008). Evaluation of insecticidal activity of diterpenes and lignans from *Aristolochia malmeana* against *Anticarsia gemmatalis*. **J. Agric. Food Chem**, 56: 2655-2659.
- Minnick, D.R.; Kerr, S.H. & Wilkinson, R.C. (1973). Humidity behavior of the drywood termite *Cryptotermes brevis*. **Envir. Entomol**, 2: 597-601.
- Moreira, M.; Picanço, M., Barbosa, L.C.; Guedes, R.; Barros, E. & Campos, M. (2007). Compounds from *Ageratum conyzoides*: isolation, structural elucidation and insecticidal activity. **Pest. Manag. Sci**, 63: 615-621.
- Müller J. R. 2003. **GraphPad Prism for Windows, version 4.00**. Step-by-step Examples, GraphPad Software Inc., San Diego CA.
- Nakashima, K.; Watanabe, H. & Saitoh, H. (2002). Dual cellulose digesting system of the wood-feeding termite, *Coptotermes formosanus* (Shiraki). **Insect Biochem. Mol. Biol**, 32: 777-784.
- Nakanishi, K. (1992). Bioactive compounds from nature. **Acta Pharm. Nord**, 4: 319-328.
- Nakanishi, K. (1994). Natural products sources of pest management agents. In: **Natural and**

- engineered pest management agents**. P. A. Hedin, J.J. Menn and R.M. Hollingworth. Washington D.C., A.C.S.
- Neal, J.J & Wu, D. (1994). Inhibition of insect cytochromes P450 by furanocoumarins. **Pest. Biochem. Physiol**, 50: 43-50.
- Oketch-Rabah, H.; Mwangi, J.; Lisgarten, J. & Mberu, E. (2000). A new antiplasmodial coumarin from *Toddalia asiatica* roots. **Fitoterapia**, 71: 636-640.
- Ohkuma, M. (2008). Symbioses of flagellates and prokaryotes in the gut of lower termites. **Trends in Microbiology**, 16: 345-352.
- Oldham, N.J. & Boland, W. (1996). Chemical ecology: multifunctional compounds and multitrophic interactions. **Naturwissenschaften**, 83: 248-254.
- Oliveira, A.M.F.; Lelis, A.T.; Lepage, E.S.; Lopez, G.A.C.; Oliveira, L.C.S; Canedo, M.D. & Milano, S. (1986). Agentes destruidores da madeira. In: **Manual de Preservação de Madeiras**, Lepage, E.S. São Paulo: IPT/SICCT, pp. 99-256.
- Perrot, R. (2003). Hexaflumuron efficiency and impact on subterranean termite *Reticulitermes* spp. (Isoptera: Rhinotermitidae) gut protozoa. **Thesis Master of Science**, Blacksburg, VA, 106p.
- Pessoa, A.M. (2002). Termorreificação da madeira de *Eucalyptus grandis* Ex Maiden (Myrtaceae) submetida ao cupim de madeira seca *Cryptotermes brevis* (Walker, 1853) (Isoptera: Kalotermitidae) para teste de resistência. **Dissertação de Mestrado**, Piracicaba, SP, 39p.
- Pickett, J.A.; Wadhams, L.J. & Woodcock, C.M. (1997). Developing sustainable pest control

- from chemical ecology. **Agric. Eco. Environ**, 64: 149-156.
- Pragnell, M. (2003). Crop protection in the New Millenium. In: **Chemistry of crop protection**. J. Voss and G. Ramos. Basel, Wiley-VCH, Verlag, pp. 7-17.
- Pupo, M.T.; Gallo, M. & Vieira, P. (2007). Biologia química: uma estratégia moderna para a pesquisa em produtos naturais. **Quim. Nova**, 30: 1-17.
- Raina, A.; Bland, J.; Doolittle, M.; Lax, A; Boopathy, R. & Folkis, M. (2007). Effect of orange oil extract on the Formosan subterranean termite (Isoptera: Rhinotermitidae). **J. Econ. Entomol**, 100: 880-885.
- Reyes-Chilpa, R.; Viveros-Rodríguez, N. Gómez-Garibay, F. & Alanez-Solano, D. (1995). Antitermitic activity of *Lonchocarpus castilloi* flavonoids and heartwood extracts. **J. Chem. Ecol**, 4: 455-463.
- Robinson, W.H. (1996). **Urban entomology: insect and mite pests in the human environment**. London: Chapman & Hall, 430p.
- Roel, A.R. (2001). Utilização de plantas com propriedades inseticidas: uma combinação para o desenvolvimento rural sustentável. **Rev. Intern. Desenvol. Local**, 1: 43-50.
- Rudolph, D.; Glocke, B. & Rathenow, S. (1990). On the role of different humidity parameters for the survival, distribution and ecology of various termite species. **Sociobiology**, 17: 129-140.
- Rust, M.K.; Paine, E.O. & Reiersen, D. (1997). Evaluation of freezing to control wood destroying insects (Isoptera: Coleoptera). **J. Econ. Entomol**, 90: 1213-1221.

- Salvatore, A.; Borkosky, E.; Willink, E. & Bardón, A. (2004). Toxic effects of lemon peel constituents on *Ceratitis capitata*. **J. Chem. Ecol**, 2: 323-333.
- Santos, R.I. (2000). Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Ed. UFSC (da Universidade)/UFRGS, pp.333-364.
- Sato, M.; Goto, M. & Hirose, T. (1996). Supercritical fluid extraction on semibatch for the removal of terpenes in citrus oil. **Ind. Eng. Chem. Res**, 35: 1906-1911.
- Scheffrahn, R.H. & Su, N.Y. (1999). West indian powderpost drywood termite- *Cryptotermes brevis* (Walker). **Disponível (online)** <http://www.ifas.ufl.edu>.
- Scheffrahn, R.; Krecek, J.; Ripa, R. & Luppichini, P. (2008). Endemic origin and vast anthropogenic dispersal of the west Indian drywood termite. **Biol Invasions**, 1-13.
- Serit, M.; Ishida, M.; Kim, M.; Yamamoto, T. & Takahasi, S. (1991). Antifeedants from *Citrus natsudaidai* HAYATA against Termite *Reticulitermes speratus* Kolbe. **Agric. Biol. Chem**, 55: 2381-2385.
- Serit, M.; Ishida, M.; Kim, M.; Yamamoto, T. & Takahasi, S. (1992). Meliaceae and Rutaceae limonoids as termite antifeedants evaluated using *Reticulitermes speratus* Kolbe (Isoptera: Rhinotermitidae). **J. Chem. Ecol**, 18: 593:603.
- Shalaby, A.A.; Allan, A.; Mostafa, A.A. & Fahmy, M.E. (1998). Inseticidal properties of citrus oils against *Culex pipiens* and *Musca domestica*. **J. Egypt. Soc. Parasitol**, 28: 595-606.
- Shapiro J. P. (1991). Phytochemicals at the plant-insect interphase. **Arch. Insect Biochem. Physiol**, 17: 191-200.

- Sharma, R.; Negi, D.; Shiu, W. & Gibbons, S. (2006). Characterization of an insecticidal coumarin from *Boenninghausenia albiflora*. **Phytother. Res**, 20: 607-609.
- Sheets, J.J.; Karr, L.L. & Dripps, J.E. (2000). Kinetics of uptake, clearance, transfer, and metabolism of hexaflumuron by eastern subterranean termites (Isoptera: Rhinotermitidae). **J. Econ. Entomol**, 93: 871-877.
- Silva, H.H.; Silva, I.G.; Santos, R.M.G. Rodrigues Filho, E.; & Elias, C.N. (2004). Atividade larvicida de taninos isolados de *Magonia pubescens* St. Hil. (Sapindaceae) sobre *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**, 37: 396-399.
- Simmonds, M.S.J.; Blaney, W.M.; Ley, S.V.; Savona, G.; Bruno, M. & Marini-Bettolo, G.B. (1990). Insect antifeedant activity associated with compounds isolated from species of *Lonchocarpus* and *Tephrosia*. **J. Chem. Ecol**, 16: 365-380.
- Siskos, E.; Mazomenos, B. & Konstantopoulou, M.A. (2008). Isolation and identification of insecticidal components from *Citrus aurantium* fruit peel extract. **J. Agric. Food. Chem**, 1-5.
- Sivagnaname, N. & Kalyanasundaram, M. (2004). Laboratory evaluation of methanolic extract of *Atlantia monophylla* (family: Rutaceae) against immature stages of mosquitoes and non-target organisms. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 99: 115-118.
- Smith, M. (1989). The effect of plant resistance on insect behavior. In: **Plant resistance to insects: a fundamental approach**, 266p.
- Stansly, P. A.; Liu, T. X. (1995). Activity of some biorationals on whitefly. Proceedings of the Florida State. **Hort. Soc**, 107: 167-172.

- Stevenson, P.; Simmonds, M.; Yule, M. Veitch, N.; Kite, G. Irwin, D. & Legg, M. (2003). Insect antifeedant furanocoumarins from *Tetradium danielli*. **Phytochemistry**, 63: 41-46.
- Su, N.Y.; Ban, P.M. & Scheffrahn, R.H. (1999). Longevity and efficacy of pyrethroid and organophosphate termiticides in field degradation studies using miniature slabs. **J. Econ. Entomol**, 92: 890-898.
- Su, N.Y. & Scheffrahn, R.H. (2000). Termites as pests of buildings. In: **Termites: evolution, sociality, symbioses, ecology**. (Abe, T.; Bignell, D.E. & Higashi, M.) Dordrecht, Kluwer Ac. Publ.), pp. 437-453.
- Tokuda, G.; Loo, N.; Watanabe, H.; Arakawa, G.; Matsumoto, T. & Noda, H. (2004). Major alteration of the expression site of endogenous cellulases in members of an apical termite lineage. **Mol. Ecol**, 13: 3219-3228.
- Tokuda, G.; Loo, N. & Watanabe, H. (2005). Marked variations in patterns of cellulase activity against crystalline-vs. Carboxymethyl-cellulose in the digestive systems of diverse, wood-feeding termites. **Physiol. Entomol**, 30: 372-380.
- Torsell, K.B.G. (1983). **Natural Product Chemistry**. Stockholm, Sweden., Swedish Pharmaceutical Press.
- Uenojo, M. & Pastore, G.M. (2007). Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. **Quim. Nova**, 30: 1-10.
- Ugaz, O.L. (1994). **Investigación Fitoquímica: Métodos el estudio de productos naturales**. 2a ed. Pontificia Universidad Católica del Perú. Fonte Editorial. 301p.
- Viegas Júnior, C. (2003). Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle

- químico de insetos. **Quím. Nova**, 26: 390-400.
- Vieira, P.C. & Fernandes, J.B. (1999). Plantas inseticidas. In: **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mentz, L.A. & Petrovick, P., 1a ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS/Editora da UFSC, pp. 739-754.
- Wagner, H. & Bladt, S. (1996). **Plant Drug Analysis: a thin layer chromatography atlas**. 2ed. Springer-Verlag, Berlin, 384p.
- Wandshcheer, C.B.; Duque, J.E.; Silva, M.A.N.; Fukuyama, Y.; Wohlke, J.L.; Adelman, J. & Fontana, J.D. (2004). Larvicidal action of ethanolic extracts from fruit endocarps of *Melia azedarach* and *Azadirachta indica* against the dengue mosquito *Aedes aegypti*. **Toxicon**, 44: 829-835.
- Waterman, P.G. (1999). The chemical systematics of alkaloids: a review emphasizing the contribution of Robert Hegnauer. **Biochem. Syst. and Ecol**, 27: 395-406.
- Wipke, K.J.; Heller, S.R.; Feldman, R.J. & Hyde, E. (1974). **Computer representation and manipulation of chemical information**. J. Wiley and Sons, New York.
- Woodrow, R.J.; Grace, J.K.; Nelson, J. & Haverty, M.I. (2000). Modification of cuticular hydrocarbons of *Cryptotermes brevis* (Isoptera: Kalotermitidae) in response to temperature and relative humidity. **Physiol. Chem. Ecol**, 29: 1100-1107.
- Yamanaka, H.T. (2005). Sucos cítricos. São Paulo: CETESB, 45p. **Disponível (online)** <http://cetesb.sp.gov.br>.
- Yamin, M.A. (1979). Flagellates of the Orders Trichomonadida Kirby, Oxymonadida Grassé,

and *Hypermastigida* Grassi & Foá reported from termites (Isoptera families Mastotermitidae, Kalotermitidae, Hodotermitidae, Termopsidae, Rhinotermitidae, and Serritermitidae) and from the wood-feeding roach *Cryptocercus* (Dictyoptera: Cryptocercidae). **Sociobiol**, 4: 1-120.

ANEXO

Artigo enviado ao Journal of Applied Entomology

Lime wax influence on the feeding behaviour of *Cryptotermes brevis* and the viability of its *Foaina* sp. symbionts

Corresponding author and address: Neiva Monteiro de Barros, University of Caxias do Sul, Biotechnology Institute, 95001-970 Caxias do Sul, RS-Brazil, Phone and Fax: 54 - 3218 – 2149, email: nmbarros@ucs.br

Ana C. Sbeghen-Loss¹, Elton G. G. Barbosa¹, Mauricio Mato², Maria V. Cesio², Caren Frizzo³, Horacio Heinzen² & Neiva M. de Barros¹

¹University of Caxias do Sul, Biotechnology Institute, 95001-970 Caxias do Sul, RS-Brazil.

²University of the Republic, Faculty of Chemistry, Box 1157, 11800 Montevideo, Uruguay.

³Aripê Citrus Ltda, BIO CITRUS, 95780-000 Montenegro, RS-Brazil.

Abstract

Based on the already described property of “Tahiti” lime wax, *Citrus latifolia* Tanaka to protect wood against powderpost termites, *Cryptotermes brevis* Walker, a detailed study of its antiinsect effects on termites and its influence on the number of protozoa of genus *Foaina* present in insect intestines is presented in this work. The mortality of *C. brevis* was significantly higher than in untreated controls at concentrations above 50 mg/cm³ and similar to controls with starved termites. The value of LC₅₀ was calculated as 32.76 mg/cm³. Also a residual action was evaluated six months after the blocks were treated. A deterrent but sub-lethal effect on termites was observed. The number of protozoa in termite intestines decreased significantly compared to control. The lime wax was effective against *C. brevis*, reducing the feeding activity and the survival of termites, and appears to have the potential to be used in the treatment of wood for its protection against powderpost termites.

Keywords: termites; citrus waste; feeding deterrent; protozoa;

Introduction

Drywood termites are social insects that feed mainly on cellulose, one of the main components of wood. Termites are responsible for the destruction of anatomical structures in wood from forest species that have low resistance. Particularly, the powderpost termite *Cryptotermes brevis* Walker accounts for losses of over \$120 million in the US and untold costs worldwide (Scheffrahn and Su 2007). Drywood termite chemical control costs are estimated to exceed \$300 million annually in the United States, but the appearance of resistance phenomena is a major concern. Natural products can offer an alternative to this contaminating, fairly effective and environmentally unfriendly practice. In previous reports, we described a noticeable effect of lime and orange wax on *C. brevis* which prompted us to characterize in depth the observed bioactivity in order to develop a possible antitermitic natural wax.

To achieve the first objective, the alterations in feeding behaviour and the influence the wax has in the general fitness of termites were evaluated. Like other animals, termites are unable to digest cellulose themselves. Thus, species that use cellulose as a food source have bacteria and/or protozoa in their hindgut as an indirect way to digest nutrients (Bresnak and Brune 1994). The number of protozoa in the hindgut in termites of the same caste is relatively constant. Individuals that have recently moulted or developed wing sprouts in preparation for the final moulting state have few or no protozoa (Lelis 1992). Several kinds of protozoans were described for *C. brevis* by Yamin (1979), *Foaina* genus is one. Due to the dependence of termites on intestinal symbionts for wood digestion, a correlation has been suggested between the mortality of one or more components of the intestinal fauna and the mortality of these insects (Perrot 2003). Studies showing the changes in the protozoan population in termites as a consequence of the ingestion of different types of wood and the decrease or total loss of

intestinal fauna due to chemical compounds of wood, have been recorded (Mauldin et al. 1981; Carter et al. 1983; Cook and Gold 2000; Cabrera et al. 2001).

"Citrus wax" is a cheap and abundant "natural" waste suitable for preparing an antitermitic wax for wood and furniture protection. Previously, we evaluated (Barros et al. 2008) the toxic and repellent activities of fractions of "Tahiti" lime (*Citrus latifolia* Tanaka) wax against powderpost termites (*C. brevis*), painted over wood blocks. This was a qualitative study as no precise relationship between wax concentration in the wood block and toxic effect on termites could be reported. The compounds identified in the most active fractions were coumarins and furanocoumarins such as bergapten, isopimpinellin and xantotoxin, but the toxic effect of the whole wax could not be impaired by the isolated fractions.

The present study relates quantitatively the relation between the concentration of citrus wax and the deterrent antiinsect effects on *C. brevis* tested on wood blocks immersed in acetic solution of the "Tahiti" lime wax, and its effect on the number of symbiotic protozoa of the *Foaina* genus present in the termite hindgut. The wax-treated wood was also tested six months later, to assess the persistence of the effect of the wax on feeding activity and survival of the termites.

Materials and Methods

Insects

Termites of the species *C. brevis* were collected in residences of Porto Alegre - RS, Brazil. The termites were identified by Dr. Luiz Roberto Fontes (São Paulo, SP, Brazil). The wood was collected and stored in plastic containers covered with cloth, to be used during the experiment. In the laboratory the wood pieces were stored under appropriate conditions of temperature and humidity for the termites ($24 \pm 1^\circ\text{C}$ and $70 \pm 5\%$, respectively).

Citrus wax

Industrial wax samples of *Citrus latifolia* Tanaka were collected from the semisolid precipitate resulting from the winterizing of citrus essential oils. The samples were supplied by Aripê Citrus Ltda, BIO CITRUS (Montenegro, RS, Brazil).

Treatment of wood test and bioassays

Pinus sp wood blocks measuring 2.54 x 2.54 x 0.64 cm, according to ASTM D3345 (1999) were used. The blocks were dried in an oven at $103 \pm 2^\circ\text{C}$ for 4 hours and individually weighed to an accuracy of 0,1 mg. The wood blocks were then immersed in acetic solutions with different concentrations of lime wax (5, 25, 50, 75, 100 mg/cm³), for 24 hours. After treatment the blocks were placed in a laminar flow hood for 24 hours, to eliminate the solvent. The retention of wax was calculated as the weight difference of the wood block before and after wax treatment, with the formula $[(M_f - M_0) / \text{volume of wood blocks (cm}^3\text{)}]$, where M_f (g) = final mass after 24 hours of evaporation of the solvent; M_0 (g) = initial dry mass.

The retention was considered satisfactory in the concentrations of solutions tested, with values varying of 34 to 100%.

Two sets of experiments were conducted with the treated wood blocks: The first was performed immediately after treatment (Test 1) and the second one six months later (Test 2). To perform Test 2 the treated wood blocks were stored in plastic boxes, under appropriate conditions of temperature and humidity ($24 \pm 1^\circ\text{C}$ and $70 \pm 5\%$, respectively) for six months. The feeding experiment was performed in Petri plates of 9.1cm diameter, with one wood block per plate. Thirty termites (pseudergates) were introduced on each plate. Five replicates were performed for each different wax concentration used for wood block treatment and simultaneously, two control experiments were conducted; in the first one the termites were placed in a Petri dish without diet (C1) and in the second one, the diet was a test block that had been treated only with acetone (C2). To determine the toxicity at the different concentrations of the lime wax tested, mortality was recorded every 48 hours for 60 days. LC_{50} was calculated by the method of Probit (Finney 1971). Substrate consumption was determined by the loss of weight of wood blocks [(initial mass = after impregnation with the product) - (final mass = after exposure with termites)] x 100.

Quantification of protozoan symbionts

Acetonic wax solutions at lower concentrations (0.5 mg/cm^3 to 15 mg/cm^3) were used to impregnate the wood blocks. These concentrations of the immersion solutions were selected to ensure that the termites would not die from feeding on the treated wood blocks, therefore allowing the evaluation of symbionts survival. The methodology adopted to verify the effect of the wax on intestinal symbionts of *C. brevis*, was as described by Lewis (2003) and Alfazairy (2004), with modifications. To perform the test, five replicates and two controls were performed for each treatment as in the toxicity studies: C1 (termites without diet); and C2 (wood block impregnated with acetone). Six surviving termites were removed from each

Petri dish at 30 days post-treatment, to verify the presence and number of viable protozoans of the genus *Foaina* present in the hindgut of the termites. Only termites with dark abdomens were evaluated, as this indicates no emptying of the digestive tract by the process of moulting. This evaluation was performed by examination of the intestinal content of termites. The hindgut was cut and placed in 50 ml of 0.9% saline (NaCl) and stirred for 10 seconds. 5 µl of the suspension were placed in a Neubauer chamber and moving *Foaina* symbionts were counted as viable specimens. The identification of protozoans belonging to *Foaina* genus was made according to Brugerolle (2000). They are characterized by three anterior flagella and a long cord-like trailing flagellum partially adhering to a fibrous structure of the cresta situated along the adhering zone of the cell body. The observations were made in a phase contrast microscope (Zeiss, 400x). The number of symbionts counted was transformed to evaluate the number of symbionts in each termite using the following formula: $NS \times v \text{ (NaCl)} / v \text{ (measured)} \times NT \times 5$, where NS = number of symbionts counted, NT = number of termites and v = volum.

Statistical analysis

Statistical analyses on the experiments were performed by parametric tests with the computer program SPSS for Windows (Green and Salkind 2004) and the graphs were performed by program GraphPadPrism, version 4.0 (Müller 2003). Wood consumption, mortality, and total number of protozoa/gut in the different treatments were analysed using a two-way ANOVA followed by Tukey test.

Results

Bioactivity of “Tahiti” lime wax on *C. brevis*

The mortality effect of lime wax against powderpost termite *C. brevis* in Test 1 and Test 2 is shown in figs. 1 and 2, respectively.

Fig. 1 shows that when the concentrations of the immersion solutions were 5 and 25 mg/cm³, the observed termite mortality at the end of 60 days resulted in $34 \pm 13.41\%$ and $37.32 \pm 18.78\%$, which did not differ significantly from control (C2).

Mortality was significantly higher than C2 at concentrations of the immersion solution above 50 mg/cm³, and it was similar to the mortality of termites without diet (C1). The calculated value of LC₅₀ was 32.76 mg/cm³ (IC 95% - 20.73 to 43.35 mg/cm³), and the value of TC₅₀ was 38 days (IC 95% - 35.5 to 40.64 days). Lime wax-treated wood blocks showed a significant decrease in mortality effect to termites after six months (Test 2), when compared to Test 1 (fig. 2).

Considering feeding behavior of *C. brevis* in Test 1 (fig. 3) and Test 2 (fig. 4), it was observed that the consumption of wood blocks was significantly affected, showing a persistent feed deterrent action of lime wax. There was a strong inverse correlation between consumption of substrate and wax concentration, as verified by the Pearson correlation Test ($r = -0.848$, $p < 0.001$).

Intestinal symbionts

Table 1 shows that at the end of the testing period (30 days), it didn't have significant difference between the controls (C1 and C2) and the treatments with the lime wax in the tested concentrations. Nevertheless, average consumption (mg) of substrate (Table 1) showed a concentration dependent effect, being significantly lower at immersion concentrations of 15

mg/cm³ than in the control (C2). Therefore a deterrent effect can be assumed. At concentrations of the immersion solutions below 15 mg/cm³ , the wood blocks were as palatable as C2 diet, resulting in no feeding deterrence

The number of *Foaina* individuals in the hindgut of termites feeding on lime wax treated wood declined significantly after 30 days when compared with the control (C2). Starved termites (C1) had a dramatically reduced number of protozoa. In the case of termites feeding on treated wood blocks, the number of *Foaina* symbionts was significant lower than in the control (C2), as shown in fig. 5.

Discussion

The retention of wood preservatives is affected by the concentration of the product applied, the method of impregnation and the wood species considered (Humar et al. 2007). When using different methods and concentrations of biocides as wood preservatives, Humar et al. (2007) observed that immersion of the wood block in solutions containing the chemicals to be tested showed on average the greatest product retention within the wood, with brushing being the least effective method. The authors also observed that the composition of the preservative solution did not significantly influence the retention, although the concentration of the solution did affect the process of impregnation. For that reason, in the present study the impregnation of the wood blocks was standardized through immersion.

It is also important to consider that the wood blocks were of *Pinus* sp. According to Burger and Richter (1991) and Gonzaga (2006), the anatomical structure of conifers consists basically of tracheids with little parenchyma. The tracheids, being more permeable, allow free passage of to the preservatives into the wood blocks, which may explain the satisfactory retention of chemicals.

Fig. 1 shows that the mortality of termites gradually increased during the period of observation. According to Sheets et al. (2000), in a study with subterranean termites treated with hexaflumuron, the LT_{50} was near 27 days. The authors suggested that onset of toxicity to termites subjected to different treatments in scope food does not occur before 15 to 20 days. In the present paper, LT_{50} was 38 days (IC 95% - 35.5 to 40.64 days), longer than that observed by Sheets et al. (2000) but in a time-scale comparable to the agrochemical. To compare the results, however, it must be kept in mind that the termite species are different and the products under study had different origin: one was a synthetic agrochemical and in our case, the substance tested was a natural extract.

Mortality evaluation showed that, six months after treatment of the wood blocks with lime wax, they seemed to cause a sub-lethal effect on termites. They still continued to act as feeding deterrents, but did not cause significant mortality. In a similar study with other termite species and vetiver oil, Maistrello et al. (2002) verified that wood treated with the oil was significantly less consumed than the control after six months of storage. When compared to some synthetic treatments the bioactivity of vetiver oil was lower, probably due to evaporation of its components. As the extracts assayed also have a small proportion of volatile compounds it is possible that after six months the decrease in mortality is due to variation in the extract composition.

Intestinal Symbionts

Protozoa that inhabit the hindgut of the so-called "lower termites" have an important and symbiotic role in the survival of these insects, being directly related to the digestion of cellulose. According to Lewis (2003), most of the information about the protozoa of termites has been obtained by *in situ* experiments. Genus *Foaina* belongs to the order Trichomonadida,

one of the 174 genera that are required symbionts of the intestines of drywood termites (Dolan and Kirby, 2002). The morphological peculiarities of the genus, make them easily identifiable under the phase microscope. *Foaina* genus is characterized by three anterior flagella and a long cord-like trailing flagellum partially adhering to a fibrous structure of the cresta situated along the adhering zone of the cell body (Brugerolle, 2000).

The reduction of protozoans number in termites hindgut can not be directly related with termites mortality. The total number of *Foaina* symbionts decreased to 50%-60% relative to control, at all concentrations tested, whereas termite mortality in the assayed concentrations is similar to C2 experiment. It is possible that the effect of the diminution on the number of symbionts will be noticeable on further stages of termite development .

Symbionts number in C1 experiment dropped down dramatically, and therefore the feeding reduction of termites observed in the experiments could be responsible for the decrease on the number of viable protozoans in *C. brevis* hindgut. At all the concentrations of the immersion solutions tested, the termites ate less wood relative to the control (although not significant differences could be determined due to high SD values) and there was a significant decline in the number of protozoa in their hindgut. A similar situation was described by Maistrello et al. (2002), who observed a decrease in the total population of protozoa in termites hindgut in presence of vetiver oil, as a consequence of termites not feeding due to the arrest or deterrence of feeding produced by the oil.

. In addition to the direct effects observed, there are side effects to termites and their intestinal symbionts that can be caused by the diet.

During the bioassays various physiological and behavioral responses of pseudergates of *C. brevis* were observed. There were stools and dark feces in contrast with dry and clear feces in controls, decreased mobility, and outbreaks of winged individuals were observed.

These facts suggest that pseudergates of *C. brevis* undergo physiological changes when they fed on treated wood blocks. Feeding was also significantly reduced, and a immediate mortality was not observed. These facts suggest that compounds present in lime wax act, as feeding deterrents, reducing or inhibiting food intake but not directly killing termites.

In the present study, “Tahiti” lime wax was shown to be effective against *C. brevis*, reducing their feeding activity at low concentration and also reducing termite survival at higher concentrations. The wax-impregnated blocks retained feeding deterrent effect after six months. The number of *Foaina* sp. symbionts in the hindgut was affected but the consequences of this phenomenon in terms of termite biology could not be unambiguously established. Nevertheless, on the results of the bioassays, we suggest that lime wax, a waste product of the citrus industry, has the potential to be used for the protection of wood against powderpost termites.

Acknowledgements

The authors acknowledge the financial help of CNPq-DINACYT, CAPES, UCS and UdelaR. We thank Biocitrus Ltda for the wax samples, and Prof. Dr. Patrick Moyna and Dr. Valery Dee for the dedicated revision of the English language throughout the whole manuscript.

References

- Alfazairy AM. 2004, Antimicrobial activity of certain essential oils against hindgut symbionts of the drywood termite *Kaloterme flavicollis* Fabr. and prevalent fungi on termite-infested wood. JEN 128, 554-560.
- ASTM D3345-74 (American Society for Testing and Materials), 1999. Standard Test Method for Laboratory Evaluation of Wood and Other Cellulosic Materials for Resistance to Termites.
- Barros NM., Heinzen H, Cesio MV, Acosta S, Mato M, Sbeghen-Loss AC, Rech V and Frizzo C, 2008. The use of residues from the citrus industry to control dry-wood termites *Cryptotermes brevis* (Isoptera-Kalotermitidae). Sociobiology 51, 283-293.
- Breznak J., Brune A. 1994. Role of microorganisms in the digestion of lignocellulose by termites. Annu Rev. Entomol 39, 453-487.
- Brugerolle GA, 2000. Microscopical investigation of the genus *Foaina*, a parabasalid protist symbiotic in termites and phylogenetic considerations. Europ. J. Protistol 36, 20-28.
- Burger L., Richter HG, 1991. Anatomia da madeira. Sociedade Alemã pela cooperação Tecnológica. 13-123.
- Cabrera RR, Lelis AT, Berti-Filho E, 2001. Ação de extratos das madeiras de Ipê e de Itaúba sobre o cupim de madeira seca *Cryptotermes brevis*. Arq Inst Biol. 68: 103-106.
- Carter FL., Jones SC, Mauldin JK, Camargo CRR, 1983. Responses fo *Coptotermes formosanus* Shiraki to extracts from five Brazilian hardwoods. Z. Angew Entomol 95, 5-14.
- Cook TJ, Gold RE, 2000. Effects of different cellulose sources on the structure fo the hindgut flagellate community in *Reticulitermes virginicus* (Isoptera: Rhinotermitidae). Sociobiology 35, 119-130.

- Dolan, MF, Kirby H, 2002. *Gyronympha*, *Criconympha* and *Prosnyderella*, three new genera of calonymphids (Parabasalia: Trichomonadida) from dry-wood eating termites (Isoptera: Kalotermitidae). *Europ. J. Protistol* 38, 73-81.
- Finney DJ, 1971. *Probit analysis*, third ed., Cambridge University Press, Cambridge, Great Britain.
- Gonzaga AL, 2006. Botânica e anatomia da madeira. In: *Madeira: Uso e conservação. Cadernos Técnicos*, 6, IPHAN/MONUMENTO.
- Green, SB, Salkind NJ, 2004. *Using SPSS for Windows and macintosh-analysing and understanding data*, 4 ed. New Jersey: Printice Hall. 457p.
- Humar M, Zlindra D, Pohleven F, 2007. Influence of wood species, treatment method and biocides concentration on leaching of copper-ethanolamine preservatives. *Build and Environ* 42, 578-583.
- Lelis A, 1992. The loss of intestinal flagellates in termites exposed to the juvenile hormone analogue (JHA) - methoprene. *Mater und Organism* 27,171-178.
- Lewis J. L. 2003. Examination of protest communities in three species of *Reticulitermes* subterranean termites (Isoptera: Rinoitermitidae). M. S. Thesis. University of Georgia.
- Maistrello L, Henderson G, Laine R, 2002. Comparative effects of vetiver oil, nootkatone and disodium octaborate tetrahydrate on *Coptotermes formosanus* and its symbiotic fauna. *Pest Manag Sci* 59, 58-68.
- Mauldin JK, Carter F, Rich NM, 1981. Protozoan populations of *Reticulitermes flavipes* and *Coptotermes formosanus*. *Insect Biochem* 12, 193-199.
- Müller JR, 2003. *GraphPad Prism for Windows*, version 4.00. Step-by-step Examples, GraphPad Software Inc., San Diego CA..
- Perrot R, 2003. Hexaflumuron efficiency and impact on subterranean termite *Reticulitermes*

- spp. (Isoptera: Rhinotermitidae) gut protozoa. M. S. Thesis, Blacksburg, VA.
- Scheffrahn, R, Su N, 2007. West Indian drywood termite.
http://creatures.ifas.ufl.edu/urban/termites/west_indian_drywood_termite.htm.
- Sheets, JJ, Karr LL, Dripps JE, 2000. Kinetics of uptake, clearance, transfer, and metabolism of hexaflumuron by eastern subterranean termites (Isoptera: Rhinotermitidae). J. Econ. Entomol. 93, 871-877.
- Yamin, MA, 1979. Flagellates of the Orders Trichomonadida Kirby, Oxymonadida Grassé, and Hypermastigida Grassi & Foá reported from termites (Isoptera families Mastotermitidae, Kalotermitidae, Hodotermitidae, Termopsidae, Rhinotermitidae, and Serritermitidae) and from the wood-feeding roach *Cryptocercus* (Dictyoptera: Cryptocercidae). Sociobiology 4, 1-120.

Table 1. Mortality and consumption of wood blocks (*Pinus* sp.) by powderpost termites *Cryptotermes brevis*, in 30 days of bioassay.

| Concentration of lime wax in the immersion solution (mg/cm ³) | Mortality (%) (Mean [§] ± S.D)* | Consumption (mg) (Mean [§] ± S.D)* |
|---------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|---------------------------------------------|
| C1 [#] | 10,62 ± 7,20a | |
| C2 [#] | 12,62 ± 4,33a | 198 ± 27,74a |
| 0.5 | 11,98 ± 1,80a | 162 ± 10,95ab |
| 1.0 | 8,64 ± 8,0a | 160 ± 14,14ab |
| 5.0 | 13,98 ± 7,19a | 148 ± 14,83ab |
| 10 | 13,98 ± 3,65a | 172 ± 29,49ab |
| 15 | 7,32 ± 5,47a | 118 ± 56,74b |

[§]Average of five replicates, 30 termites (pseudergates) per replicate.

*Values followed by the same letter in each column are not different from each other, Tukey test (P < 0.05).

[#]C1 = termites without diet; C2 = solvent (acetone)

Captions for Figures

Fig. 1 Antitermitic activity of "Tahiti" lime wax against *Cryptotermes brevis*. Test 1 = immediately after treatment for wood blocks; C1 = termites without diet; C2 = acetone.

Fig. 2 Antitermitic activity of "Tahiti" lime wax against *Cryptotermes brevis*. Test 2 = after six months of treatment for wood blocks; C1 = termites without diet; C2 = acetone.

Fig. 3 Consumption of wood blocks (*Pinus* sp) by *Cryptotermes brevis* in different concentrations of lime wax in the Test 1: bioassay immediately after treatment for wood blocks. Values followed by the same letter are not different from each other, Tukey test ($P < 0.05$).

Fig. 4 Consumption of wood blocks (*Pinus* sp) by *Cryptotermes brevis* in different concentrations of lime wax in the Test 2: bioassay after 6 months of treatment for wood blocks. Values followed by the same letter are not different from each other, Tukey test ($P < 0.05$).

Fig. 5 Average number of protozoa of genus *Foaina* quantified after 30 days bioassay in termite hindgut of *Cryptotermes brevis*, fed with different concentrations of lime wax. C1 = termite without diet; C2 = control (acetone). Values followed by the same letter are not different from each other, Tukey test ($P < 0.05$).

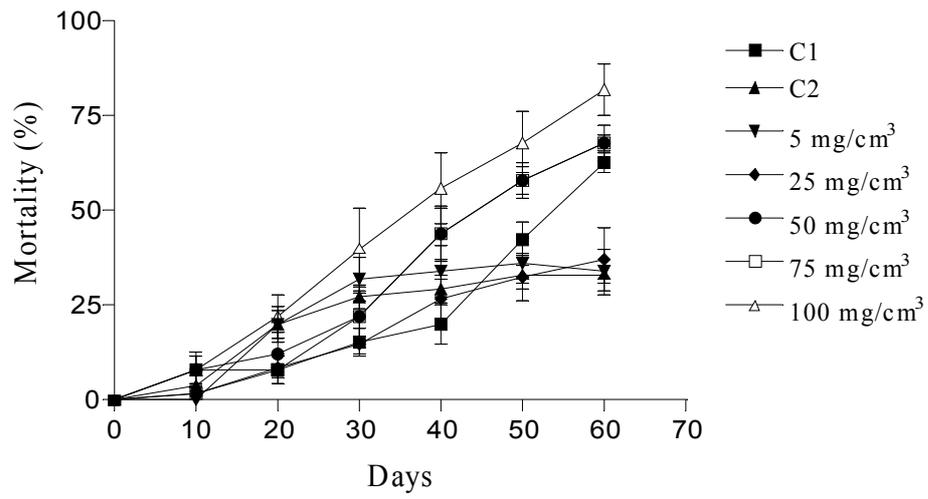


Fig. 1

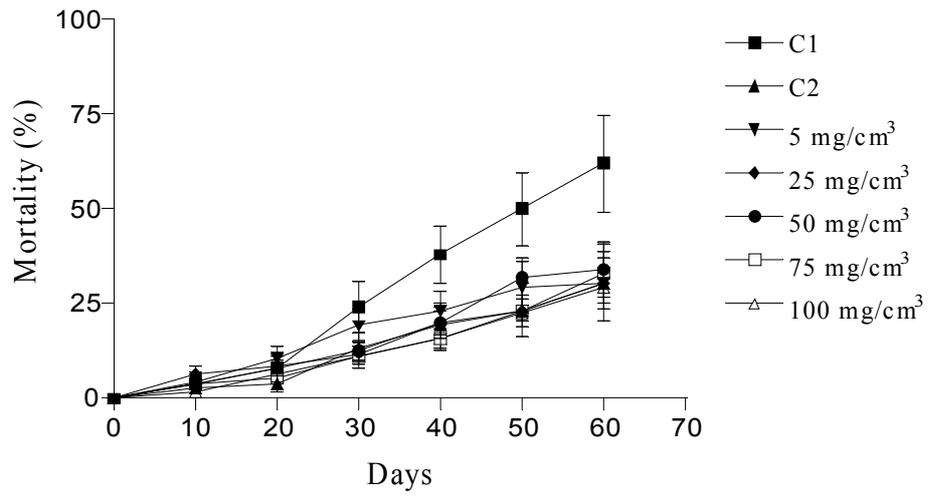


Fig. 2

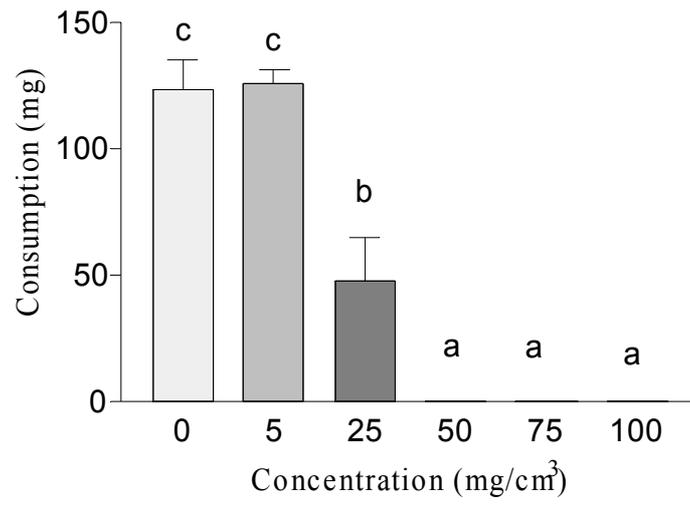


Fig. 3

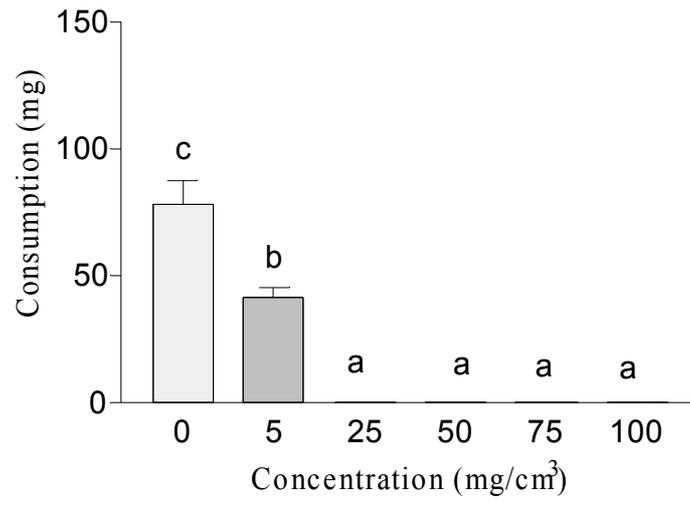


Fig. 4

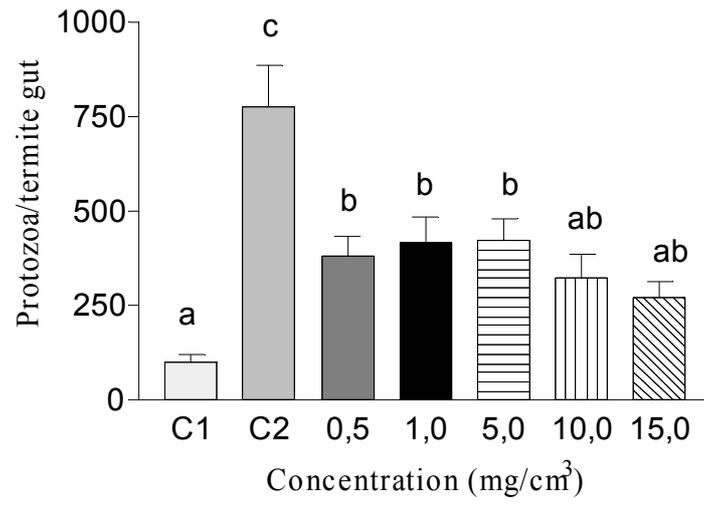


Fig. 5