



MINISTÉRIO DA  
CIÊNCIA, TECNOLOGIA,  
INOVAÇÕES E COMUNICAÇÕES



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA  
COORDENAÇÃO DE TECNOLOGIA E INOVAÇÃO  
LABORATÓRIO DE BIOPROSPECÇÃO E BIOTECNOLOGIA

**ESTUDO QUÍMICO E HISTOQUÍMICO DAS FOLHAS DE**  
***Duroia longiflora* Ducke (Rubiaceae)**

Fabiele Souza da Cruz

Manaus-AM

Maio, 2017

Fabiele Souza da Cruz

**ESTUDO QUÍMICO E HISTOQUÍMICO DAS FOLHAS DE**  
***Duroia longiflora* Ducke (Rubiaceae)**

Orientadora: Dra. Cecilia Veronica Nunez (INPA)

Co- Orientadora: Dra. Maria Gracimar Pacheco de Araújo (UFAM)

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa Integrado de Pós-Graduação em Botânica do INPA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Botânica.

Manaus-AM

Maio, 2017



## AULA DE QUALIFICAÇÃO

### PARECER

Aluna: **FABIELE SOUZA DA CRUZ**  
Curso: **BOTÂNICA**  
Nível: **Mestrado**  
Orientadora: **CECÍLIA VERONICA NUNEZ(INPA)**

#### Titulo:

“Estudo químico e anatômico de folhas e galhos de *Duroia longiflora* Ducke”

#### **BANCA JULGADORA**

##### TITULARES:

SERGIO MASSAYOSHI NUNOMURA (INPA)  
DAIANE MARTINS (UFAM)  
VALDELY FERREIRA KINUPP (IFAM)

##### SUPLENTES:

PATRICIA MELCHOMAR ALBUQUERQUE (UEA)  
POLIANA ROVERSI G. MARCOMINI (UFAM)

#### **EXAMINADORES**

#### **PARECER**

#### **ASSINATURA**

SERGIO MASSAYOSHI NUNOMURA	<input checked="" type="checkbox"/> Aprovado ( ) Reprovado	
DAIANE MARTINS	<input checked="" type="checkbox"/> Aprovado ( ) Reprovado	
VALDELY FERREIRA KINUPP	<input checked="" type="checkbox"/> Aprovado ( ) Reprovado	
PATRICIA MELCHOMAR ALBUQUERQUE	( ) Aprovado ( ) Reprovado	
POLIANA ROVERSI G. MARCOMINI	( ) Aprovado ( ) Reprovado	

Manaus(AM), 19 de abril de 2016.

OBS: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Dr. Michael John Gilbert Hopkins  
Coordenador do Programa de  
Pós Graduação em Botânica  
19/04/2016 - LA 111 - 11/16



**ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE Mestrado de Discente do Programa de Pós-Graduação em Botânica do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia**

Aos trinta e um dias do mês de maio de 2017 às 14:00h, na sala de Seminários da Biblioteca -INPA-Campus I, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Dr. Sérgio Massayoshi Nunomura, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Dra. Daiane Martins, da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Dra. Patrícia Melchionna Albuquerque, da Universidade do Estado do Amazonas, Escola Superior de Tecnologia (UEA) e, tendo como suplentes: Dr. Valdely Ferreira Kinupp, do Instituto Federal do Amazonas (IFAM), e Dra. Poliana Roversi Genovez Marcomini, da Universidade Federal (UFAM), sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da **DISSERTAÇÃO DE Mestrado**, intitulada: "Estudo químico e histoquímico das folhas de *Duroia longiflora* Ducke" discente: **Fabiele Souza da Cruz**, sob orientação: Cecília Verônica Nunez e Coorientação Dra. Maria Gracimar Pacheco de Araújo. Após a exposição, dentro do tempo regulamentar, a discente foi argüida oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo recebido o conceito final:

EXAMINADORES	PARECER	ASSINATURA
SERGIO MASSAYOSHI NUNOMURA	<input checked="" type="checkbox"/> APROVADO	<input type="checkbox"/> REPROVADO
DALANE MARTINS	<input checked="" type="checkbox"/> APROVADO	<input type="checkbox"/> REPROVADO
PATRICIA MELCHIONNA ALBUQUERQUE	<input checked="" type="checkbox"/> APROVADO	<input type="checkbox"/> REPROVADO
VALDELY FERREIRA KINUPP	<input type="checkbox"/> APROVADO	<input type="checkbox"/> REPROVADO
POLIANA ROVERSI G. MARCOMINI	<input type="checkbox"/> APROVADO	<input type="checkbox"/> REPROVADO

Manaus (AM), 31 de Maio de 2017.

OBS: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Nada mais havendo, foi lavrado a presente ata, que, após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

  
Dr. Michael John Gilbert Hopkins  
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Botânica  
PLA 256/2014 - EX-100/INPA

À minha incomparável família, minha mãe Edna e aos meus irmãos Fabiana e Laerte, e aos meus tios Marcelo, Izabel e Matilde por sempre me apoiarem e ajudarem muitas vezes sem compreender, os caminhos que escolhi, eu dedico esta dissertação com muito amor e carinho.

## AGRADECIMENTOS

Inicio meus agradecimentos primeiramente a Deus, porque permitiu que coisas boas e bons amigos fizessem parte da vida, e sou Grata.

À Minha Família, por sempre me apoiar em tudo, mesmo não compreendendo nada de produtos naturais e botânica, mas me incentivando a seguir em frente e acreditando no meu sucesso até mais que eu, um muito obrigado, mas que especial a minha idolatrada e amada Mãe Edna, meu porto seguro, por tornar meus sonhos seus sonhos e segui-los cegamente.

Aos meus irmãos Fabiana e Laerte por sempre me apoiarem e me ajudarem incondicionalmente na minha carreira, e acreditarem no meu trabalho. Obrigada pela confiança.

Aos meus tios, Marcelo, Matilde e Izabel que sempre torceram e me ajudaram e fizeram propaganda pelo meu trabalho. Obrigada pela força.

Às minhas amigas, Vanessa Ketlen e Fernanda Correia, por acreditarem em mim, torcerem, me tirarem da zona de estresse quando necessário. Vocês são maravilhosas, que venha mais 20 e tantos anos de amizade. Grata por todos os conselhos e risadas.

Ao meu Amado Yuri Pastor, por sempre estar ao meu lado me apoiando e ajudando, seja no dia a dia de bancada ou saída de campo, acreditando em um trabalho maravilhoso segundo ele, mais que eu, me fazendo dar o melhor de mim cada vez mais.

Aos meus amigos de laboratório, pelas inúmeras ajudas e conselhos, pelas amizades que se formaram aqui, vocês são irmãos disfarçados de amigos: Alan, David, Fabiana, Jaciara, Izabel, Leomara, Kissinara, Sabrina, Vanessa e Rafa.

Aos meus amigos do mestrado obrigado mais que especial a vocês: Alex Sandro, Carol, Edson, Fabiane, Tatiana, Laura, por todos os momentos divididos dentro e fora da sala de aula, vocês são um tesouro. Obrigada por tudo.

À Dra. Maria Silva e ao Manoel Vieira, técnico, pela colaboração e realização dos ensaios histoquímico e anatômico.

Às Minhas Orientadoras Dra. Cecilia Veronica Nunez e Maria Gracimar Pacheco de Araújo, por me receberem em seus laboratórios e me concederem a oportunidade de realizar este trabalho, pelos inúmeros ensinamentos e conselhos, seja na vida profissional e pessoal. Grata.

Aos Professores do PPG Botânica do INPA, pelos ensinamentos transmitidos e seu amor pelo que fazem.

Aos Técnicos da CALTQPN, pelas inúmeras análises de Ressonância Magnética Nuclear e Espectrometria de Massas.

A CAPES e FAPEAM, pelas concessões de bolsas e ao CNPq pelo apoio financeiro para o projeto.

Ao INPA, pela infraestrutura e amparo, e por possibilitar a realização deste sonho, de realizar um mestrado nesta instituição que tanto amo.

À todos os colegas de laboratório que contribuíram direta e indiretamente para este trabalho, meu muitíssimo obrigada.

“Senhor, logo que vi a natureza”.

As lágrimas secaram.

“Os meus olhos, na contemplação”.

**PURIFICAÇÃO** (1986) - Vinicius de Moraes

## RESUMO

A espécie *Duroia longiflora* Ducke, pertencente à família Rubiaceae, ocorre espontaneamente no Brasil e é encontrada na região Amazônica. Estudos do gênero mostraram importantes potenciais químicos e biológicos em suas espécies, contudo, não existe estudos prévios químicos e biológicos com *D. longiflora*. O objetivo deste trabalho foi realizar estudos fitoquímicos e biológicos com os extratos de folhas de *D. longiflora*, bem como estudos histoquímicos e anatômicos com as folhas da mesma. Os extratos foram avaliados quanto às atividades antioxidante, citotóxica e antimicrobiana, analisados por cromatografia em camada delgada comparativa e ressonância magnética nuclear e depois foram fracionados. As presenças de alcaloides, substâncias fenólicas, taninos, proteínas, lipídios e amido nos tecidos corados foram histolocalizados nas folhas e no estudo anatômico foram realizadas as descrições dos tecidos das folhas. Para os ensaios biológicos, observou-se que os extratos metanólicos das folhas e galhos apresentaram toxicidade alta frente à *Artemia salina* e ação antioxidante alta. O resultado do ensaio antibacteriano não foi conclusivo. Os extratos e as fases que apresentaram atividade positiva nos ensaios biológicos foram fracionados. Do fracionamento cromatográfico da fase diclorometânica do extrato metanólico das folhas foi possível identificar o biflavonoide  $2\alpha,3\alpha$ -epoxi-5,7,3',4'-tetrahidroxiflavan-(4 $\beta$ -8)-epicatequina e o  $\beta$ -sitosterol. Outros três alcaloides foram isolados, contudo, até o momento de fechamento da dissertação, não foi possível realizar a identificação estrutural.

**Palavras chaves:** anatomia foliar, atividade antioxidante, toxicidade sobre *Artemia salina*.

## ABSTRACT

*Duroia longiflora* Ducke species belongs to Rubiaceae family, it occurs spontaneously in Brazil and it is also found in the Amazon region. Studies of the genus *Duroia* have demonstrated important chemical and biological potentials of their species; however, there are no previous chemical and biological studies with *D. longiflora*. Therefore, the objective of this work was to carry out phytochemical and biological studies with the extracts of leaves of *D. longiflora*, as well as to perform histochemical and anatomical studies with its leaves. The extracts were evaluated for their antioxidant, cytotoxic and antimicrobial activities, analyzed by comparative thin layer chromatography, nuclear magnetic resonance and then fractionated. For the histochemical study of the leaves, the presence of alkaloids, phenolic compounds, tannins, proteins, lipids and starch in the stained tissues were histolocalized, and in the anatomical study the leaf tissue descriptions were performed. For the biological assays, it was observed that the methanolic extracts of leaves and branches showed high toxicity against *Artemia salina* and high antioxidant effect. The results for the antibacterial assay were not conclusive. The extracts and the phases that presented positive activity in the biological assays were fractionated until the isolation of the compounds. It was possible to identify one biflavonoid 2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ -epoxy-5,7,3',4'-tetrahydroxyflavan-(4 $\beta$ -8)-epicatechin and  $\beta$ -sitosterol from the chromatographic fractionation of the dichloromethane phase from the methanolic extract of the leaves. Other three alkaloids were isolated, but until the conclusion of this dissertation, it was not possible to carry out the structural identification.

**Keywords:** foliar anatomy, antioxidant activity, toxicity on *Artemia salina*.

# SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS .....	xv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xvi
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>3</b>
2.1 Estudos Fitoquímicos e Metabólitos Secundários .....	3
2.2 Estudos Histoquímicos .....	7
2.3 Estudos Anatômicos .....	7
2.4 Família Rubiaceae .....	8
2.5 <i>Duroia</i> L.F .....	10
2.6 A espécie <i>Duroia longiflora</i> Ducke .....	11
2.4 Ensaios Biológicos.....	13
2.4.1 Atividade Antioxidante.....	13
2.4.2 Atividade Antimicrobiana.....	13
2.4.3 Atividade Tóxica frente a <i>Artemia salina</i> .....	14
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>16</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	16
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>17</b>
4.1 Coleta .....	17
4.2 Preparo e Seleção dos Extratos .....	17
4.2 Fracionamentos Cromatográficos e Isolamento .....	18
4.2.1 Análise cromatográfica dos extratos.....	18
4.2.2 Partição Líquido-Líquido .....	20
4.2.3 Fracionamento dos Extratos.....	20
4.2.4 Fracionamento da fase DCM do Extrato Metanólico das Folhas de <i>Duroia longiflora</i> .....	21
4.3 Preparo e Fixação das Folhas para estudo anatômico e histoquímico. ....	26
4.3.1 Estudo histoquímico.....	26
4.3.1.1 Detecção de Amido.....	27
4.3.1.3 Detecção de Proteínas.....	27
4.3.1.4 Detecção de alcaloides.....	27

4.3.1.5 Detecção de Substâncias Fenólicas.....	27
4.3.1.6 Detecção de Taninos.....	28
4.4. Estudo anatômico .....	28
4.5 Ensaio Biológico.....	29
4.5.1 Atividade Antioxidante .....	29
4.5.2 Atividade Antimicrobiana .....	30
4.5.3 Teste de Toxicidade sobre à <i>Artemia salina</i> .....	31
5. Resultados e Discussão .....	32
5.1 Coleta e obtenção dos extratos .....	32
5.2 Análise por Cromatografia em Camada Delgada Comparativa e RMN. ....	33
5.3 Fracionamento do Extrato Metanólico das Folhas de <i>D. longiflora</i> .....	33
5.3.1 Análise e fracionamento das fases da partição líquido-líquido....	33
5.3.1.1 Isolamento e Elucidação Estrutural do FDCM. C10. f 31-32.....	34
5.3.1.2 Análise em CCDC e caracterização da FDCM. C15-f7.....	50
5.3.1.3 Substâncias em processo de caracterização e elucidação.....	51
5.3.1.4 Substâncias em processo de isolamento e purificação.....	51
5.2 Estudos Histoquímicos .....	53
5.2.1 Metabólitos Primários .....	53
5.2.2 Metabólitos Secundários.....	53
5.3 Estudos Anatômicos .....	56
5.3.1 Epiderme .....	56
5.3.2 Nervura Central.....	57
5.3.3 Mesofilo .....	57
5.4 Ensaio Biológico.....	59
5.4.1 Atividade Antioxidante .....	59
5.4.2 Atividade Antimicrobiana.....	61
5.4.3 Atividade Tóxica frente à <i>Artemia salina</i> .....	62
6. CONCLUSÃO.....	64
7. REFERÊNCIAS .....	67

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1-</b> Fatores que influenciam no teor de metabólitos secundários .....	p 3
<b>Figura 2-</b> Rota biosintética básica dos produtos naturais .....	p 4
<b>Figura 3-</b> Estrutura básica da morfina, estricnina e quinina.....	p 5
<b>Figura 4-</b> Alcaloide indólico.....	p 5
<b>Figura 5-</b> Principais classes de flavonoides.....	p 6
<b>Figura 6-</b> Mapa de distribuição global de Rubiaceae.....	p 9
<b>Figura 7-</b> Características das folhas e estípulas de <i>Duroia longiflora</i> .....	p12
<b>Figura 8-</b> Morfologia foliar e floral de <i>Duroia longiflora</i> Ducke.....	p12
<b>Figura 9-</b> Fluxograma de extração.....	p18
<b>Figura 10-</b> Fluxograma da partição do extrato metanólico das folhas de <i>Duroia longiflora</i> .....	p20
<b>Figura 11-</b> Fluxograma das substâncias isoladas da Fase DCM do extrato metanólico das folhas de <i>Duroia longiflora</i> .....	p25
<b>Figura 12-</b> (a) Folhas <i>Duroia longiflora</i> coletada no Reserva Florestal Adolpho Ducke, AM. (b) Indivíduo <i>Duroia longiflora</i> .....	p32
<b>Figura 13-</b> Análise em CCDC das frações FDCM. C10. Fr31 e 32 do extrato metanólico das folhas.....	p34
<b>Figura 14-</b> Principais correlações encontradas no mapa de contorno HMBC para a substância 2,3-epoxy-5,7,3',4'-tetrahydroxyflavan-(4-8)-epicatequina .....	p37

<b>Figura 15-</b> Principais correlações encontradas no mapa de contorno COSY para a substância 2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ -epoxi-5,7,3',4'-tetrahidroxiflavan-(4 $\alpha$ -8)-epicatequina .....	p37
<b>Figura 16-</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do biflavonoide .....	p 38
<b>Figura 17-</b> Mapa de contorno HMBC do biflavonoide .....	p 39
<b>Figura 18-</b> Expansão Mapa de contorno HMBC do biflavonoide .....	p 40
<b>Figura 19-</b> Mapa de contorno HSQC do biflavonoide .....	p 41
<b>Figura 20-</b> Expansão do Mapa de contorno HSQC do biflavonoide.....	p 42
<b>Figura 21-</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do biflavonoide .....	p 43
<b>Figura 22-</b> Expansão do espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do biflavonoide.....	p.44
<b>Figura 23-</b> Mapa de contorno COSY do biflavonoide.....	p 45
<b>Figura 24-</b> Expansão Mapa de contorno COSY do biflavonoide .....	p 46
<b>Figura 25-</b> Espectro de RMN de DEPT 135° do biflavonoide .....	p47
<b>Figura 26-</b> Expansão do Espectro de RMN de DEPT 135° do biflavonoide .....	p48
<b>Figura 27-</b> Espectro de RMN de J-RES do biflavonoide.....	p49
<b>Figura 28-</b> Análise em CCDC das Frações FDCM.C11.fr3 .....	p50
<b>Figura 29-</b> Secções transversais da nervura central das folhas de <i>D. longiflora</i> sem coloração, controle.....	p54
<b>Figura 30-</b> Secções transversais das folhas <i>D. longiflora</i> , metabolismo primário .....	p54
<b>Figura 31-</b> Secções transversais das folhas de <i>D.longiflora</i> , metabolismo secundário.....	p55
<b>Figura 32-</b> Secções transversais das folhas de <i>D. longiflora</i> .Anatomia foliar .....	p58
<b>Figura 33-</b> Resultados do teste de atividade antimicrobiana.....	p61

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1-** Reveladores para Cromatografia em Camada Delgada..... p 19
- Tabela 2-** Frações purificadas da fase DCM do extrato metanólico das folhas de *Duroia longiflora*..... p 22
- Tabela 3-** Reveladores Para Avaliação Histoquímica (Metabólitos Primários) .....p 26
- Tabela 4-** Reveladores Para Avaliação Histoquímica (Metabólitos Secundários) .....p 26
- Tabela 5-** Massas e rendimentos dos extratos obtidos de *Duroia longiflora*..... p32
- Tabela 6-** Massas obtidas pela partição do extrato metanólico das folhas de *Duroia longiflora*..... p 33
- Tabela 7-** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  da substância 2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ -epoxi-5,7,3',4'-tetrahidroxiflavan-(4  $\alpha$  -8)-epicatequina e comparação com a literatura .....p36
- Tabela 9-** Visão geral dos processos de identificação das substâncias..... p 51
- Tabela 10-** Visão geral dos processos de isolamento e purificação das substâncias...p 52
- Tabela 11-** Resultados do teste antioxidante com o método DPPH..... p 59
- Tabela 12-** Resultados do teste antioxidante com método  $\text{Fe}^{+3}$  .....p 60
- Tabela 13** – Resultado do teste de toxicidade frente a *Artemia salina*.....p 62

## LISTA DE ABREVIATURAS

**AcOEt** - Acetato de etila

**AlCl<sub>3</sub>** - Cloreto de Alumínio

**CLAE** - Cromatográfica líquida de alta eficiência

**CCDC** - Cromatografia em camada delgada comparativa

**CCDP** - Cromatografia em camada delgada preparativa

**CBM** - Concentração Bactericida Mínima

**CIM** - Concentração Inibitória Mínima

**DCM** - Diclorometano

**DMSO** - Dimetilsulfoxido

**DPPH** - 2-2 Difetil-picril-hidrizila

**FAA 70** - Formalina, ácido acético glacial e álcool 70%

**FAPEAM** - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas

**FeCl<sub>3</sub>** - Cloreto Férrico

**Fe<sup>3+</sup>** - Solução de ferro III

**Hex** - Hexano

**H<sub>2</sub>O** - Água (destilada)

**MeOH** - Metanol

**RMN** - Ressonância Magnética Nuclear

**Safrablau** - Azul de Astra e Safranina

# 1. INTRODUÇÃO

A Amazônia é o bioma com a maior biodiversidade do mundo, com ampla quantidade e variedade de animais e vegetais, oferecendo para as populações locais, recursos como alimentos, moradia e até tratamento para diversas enfermidades, principalmente pelo uso da flora local como medicamento. Em plantas utilizadas na terapêutica de muitas enfermidades, os chamados princípios ativos são substâncias com origem predominantemente do metabolismo secundário, como: alcaloides, flavonoides, terpenos, substâncias fenólicas, antraquinonas, entre outros (CECHINEL FILHO & YUNES, 2008; GLOBO-NETO & LOPES, 2007; EVERT, 2014).

Esses metabólitos secundários produzidos pelas plantas foram fundamentais para o desenvolvimento da química orgânica moderna, principalmente a partir do século XIX, quando diversos estudos realizados levaram ao isolamento de alguns princípios ativos, que foram posteriormente utilizados como medicamentos. Além disso, essas substâncias podem servir como base para o desenvolvimento de produtos mais ativos que os metabólitos originalmente isolados (ROBBERS, SPEEDIE & TYLER, 1997; MONTANARI & BOLZANI, 2001; DEWICK, 2002).

Tendo em vista a biodiversidade amazônica e o potencial terapêutico das plantas dessa região está a família Rubiaceae, que possui grande importância econômica, com espécies que são utilizadas como alimento, como o café *Coffea arabica*, e jenipapo (*Genipa americana*). Além de espécies com importância medicinal como *Cinchona officinalis*, de onde é extraído a quinina, um alcaloide utilizado no tratamento de arritmias cardíacas, antimalárico e analgésico e ainda existem gêneros que são bastante utilizados como plantas ornamentais, como a *Mussaenda*, *Gardenia* e *Ixora* (Ribeiro, et al, 1999; THE PLANT LIST, 2017).

Dentre as áreas que estudam os metabólitos secundários e primários e como estes são produzidos nos tecidos vegetais, estão a anatomia e a histoquímica. Nos estudos anatômicos é possível estudar como ocorrem os processos fisiológicos e descrever os tecidos e as células responsáveis pela manutenção da planta. Já a histoquímica permite a localização *in situ* das diversas classes químicas de metabólitos primários e secundários produzidos nos diferentes tecidos da planta, pela detecção através de microscopia, por coloração ou emissão de radiação. Assim, quando estudos

fitoquímicos são aliados com a anatomia e histoquímica, estes se tornam mais precisos e eficazes, potencializando a prospecção de substâncias ativas (FIGUEIREDO et al., 2007).

A família Rubiaceae é muito conhecida pelo número de espécies com variados usos. Dentre os gêneros pertencentes à família, e que apresentam potencial medicinal, destacam-se as espécies do gênero *Duroia*. Dos estudos realizados com *Duroia macrophylla* foram isolados terpenos com atividade antimicrobacteriana e alcaloides indólicos e *D. saccifera* com potencial antifúngico (MARTINS et al, 2013; REIS et al, 2016).

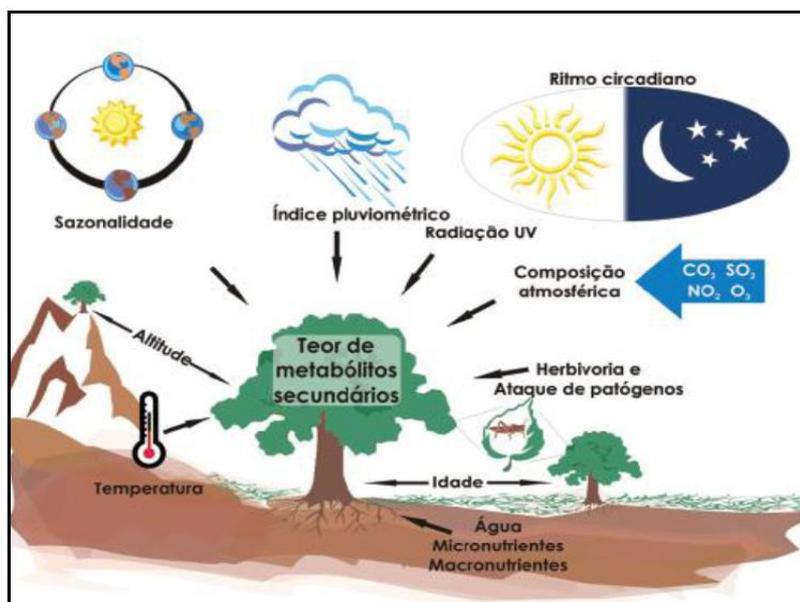
Tendo em vista que a família Rubiaceae possui diversas espécies produtoras de metabólitos de interesse, e da escassez/ausência de estudos relacionados com a análise fitoquímica aliada à anatomia e histoquímica das estruturas produtoras e secretoras de metabólitos secundários com potencial farmacológico da espécie *Duroia longiflora*, o presente estudo tornou-se relevante por contribuir para o conhecimento da espécie-alvo quanto à sua composição química e anatômica, podendo inclusive auxiliar estudos taxonômicos, uma vez que algumas classes químicas são características de alguns gêneros, sendo considerados marcadores quimiotaxonômicos.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Estudos Fitoquímicos e Metabólitos Secundários

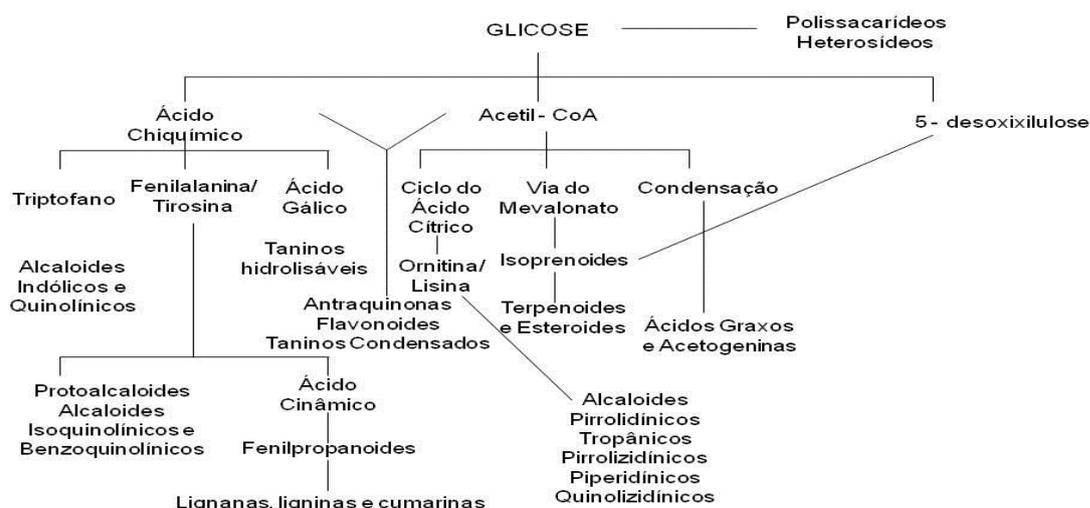
A floresta Amazônica é considerada a maior fonte de biodiversidade, pois abriga plantas, fungos, insetos e bactérias que são ricos em substâncias biologicamente ativas sendo potencial fonte de novos fármacos. O que vem despertando cada vez mais o interesse para pesquisas voltadas à prospecção da biodiversidade contida neste bioma, e a busca por estudos de espécies de cunho medicinal e por espécies da mesma família que possam produzir substâncias similares (BARREIRO & BOLZANI, 2009).

Nessa bioprospecção, buscam-se principalmente substâncias produzidas pelas plantas (metabólitos secundários, em sua maioria), que auxiliam em sua adaptação ao ambiente ou em resposta as ações externas, como sazonalidade, temperatura, herbívora, ataques de patógenos, bem como, radiação UV, índice pluviométrico, entre outros fatores. E essas substâncias podem estar distribuídas em diferentes partes da planta, como: flores, folhas, raízes, frutos, caules e cascas (Figura 1) (BARREIRO & BOLZANI, 2009; GOBBO-NETO & LOPES, 2007).



**Figura 1:** Fatores que influenciam no teor de metabólitos secundários (GOBBO-NETO & LOPES, 2007).

A origem de todos os metabólitos secundários provém de estágios particulares de crescimento, desenvolvimento, períodos de estresse ou por questões nutricionais da planta. Sendo assim, a origem dos metabólitos secundários pode ser abreviada a partir do metabolismo da glicose, via do ácido chiquímico e o acetato. O ácido chiquímico promove a origem dos aminoácidos aromáticos, precursores da maioria dos metabólitos secundários aromáticos (CUNHA & ROQUE, 2005), visualizado na figura 2.



**Figura 2:** Rota biosintética básica dos produtos naturais. Fonte: CUNHA & ROQUE, 2005.

O uso empírico de plantas ao longo do tempo levou às primeiras investigações do ponto de vista químico e quimiotaxonômico dos vegetais, ocasionando os primeiros isolamentos de substâncias bioativas de plantas com propriedades medicinais, como os alcaloides morfina, estricnina e quinina, entre outras substâncias (Figura 3). Isso resultou numa grande modernização na pesquisa com plantas medicinais como fonte promissora de metabólitos secundários com potencial biológico, sendo possível o isolamento, identificação estrutural e determinação de sua função biológica (SAXENA et al, 2013).

O uso dos metabólitos secundários tornou-se reconhecido por sua ação farmacológica, demarcando a caracterização de espécies vegetais com atividades farmacológicas e o estudo da sua composição química com isolamento, identificação e dosagem dos seus constituintes. Entre as substâncias originadas dos metabólitos

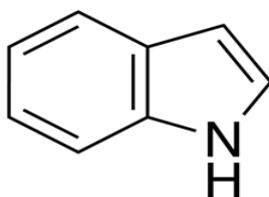
secundários, temos em destaque os alcaloides, flavonoides e terpenoides (CUNHA &ROQUE 2005).



**Figura 3:** Estrutura básica da morfina, estircina e quinina.

Os alcaloides compõem um grande grupo de metabólitos com diversidade estrutural e propriedades terapêuticas descritas desde os tempos mais antigos, normalmente estão todas as partes de uma planta, mas são comumente encontrados em quatro tipos de tecidos ou células: tecidos com crescimento ativo, células epidérmicas e hipodérmicas, bainhas vasculares e vasos lactíferos, comumente sintetizados no retículo endoplasmático e concentrando-se nos vacúolos, existem relatos da origem dos alcaloides se dar por necessidade de defesa e contra ataques de herbívoros e patógenos (ZIEGLER & FACHINI, 2008; HENRIQUES et al 2007).

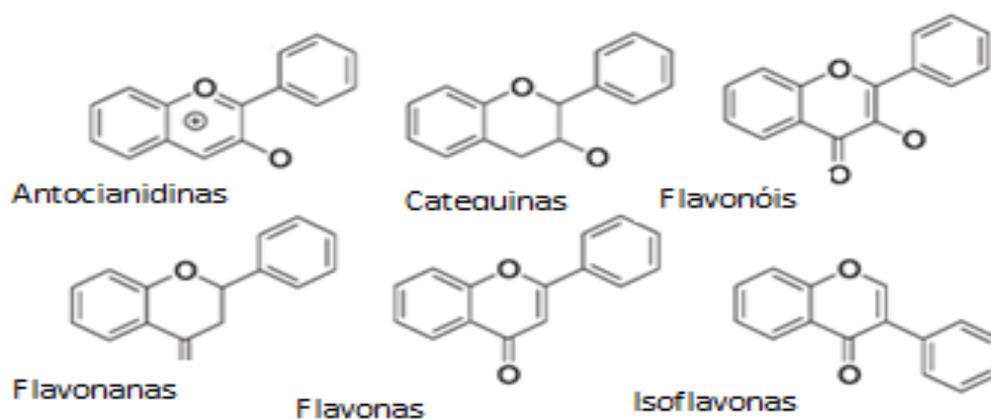
Dentre tantos tipos de alcaloides tem os indólicos, que são classificados em dois grandes grupos: os derivados do triptofano e os monoterpênicos que são definidos por apresentarem o núcleo indólico (Figura 4).



**Figura 4:** alcaloide indólico

Já os flavonoides fazem parte de uma importante classe de polifenóis, e são classificados por possuir dois ou mais núcleos aromáticos, sendo encontrados nas Angiospermas. Este grupo é considerado o maior em diversidade estrutural, porém

existem características predominantes neste grupo, como a presença de 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental, constituído de duas fenilas ligadas por uma cadeia de três carbonos entre si, e muitas das substâncias tricíclicas recebem nomenclatura de acordo com a posição do anel benzênico B, sendo esta substituição dividida em classes: flavonoides, isoflavonoides, flavonas, flavonóis, catequinas e antocianinas (Figura 5) (ZUANAZZI & MONTANA, 2007).



**Figura 5:** Principais classes de flavonoides (CUNHA & ROQUE 2005).

As funções dos flavonoides nas plantas são diversas, vão desde a proteção contra patógenos e herbívoros, como proteção dos vegetais contra raios ultravioleta, controle de hormônios, etc. E ainda podem ser utilizados como marcadores taxonômicos devido à sua abundância relativa. Do ponto de vista econômico, os flavonoides apresentam diversas propriedades que vão desde substâncias que funcionam como pigmentos ou uso de substâncias com propriedades terapêuticas. Estas propriedades são, por exemplo: antitumoral, antioxidante, antiviral e antiinflamatória (SAXENA et al 2013).

Outra classe de metabólitos são os terpenos. São de origem vegetal e animal e tem uma grande capacidade farmacológica. É considerada a maior classe entre os produtos naturais, os terpenos se diferem por seus grupos funcionais e o esqueleto de carbono, podendo ser cíclicos ou alifáticos. Entre eles estão os geram sabor amargo nas plantas com a função de inibir ataques de herbívoros e inimigos naturais, mas há também os terpenos que possuem fragrâncias empregadas em cosméticos, ou para atrair polinizadores, funcionam também como reguladores de hormônios, além de todas essas funcionalidades eles ainda são empregados como fitoterápico como anticancerígeno,

antimaláricos, anti-úlceras, hepaticida, antimicrobianos ou diuréticos, antimaláricos sesquiterpenoide (SAXENA et al 2013; CUNHA & ROQUE, 2005).

## **2.2 Estudos Histoquímicos**

A histoquímica pode ser definida como a técnica de coloração de tecidos, que permite conhecer a química dos constituintes celulares. Baseia-se na coloração específica dos constituintes celulares, *in situ*, através de reações químicas específicas. Sendo possível caracterizar a presença, nos tecidos da planta, de metabólitos secundários, que são expressões da individualidade química de cada planta, podendo divergir qualitativa e quantitativamente de espécie para espécie (SANTOS et al, 2009).

A histoquímica das plantas permite detectar a presença desses metabólitos e quantificá-los em relação à área observada, são úteis para a caracterização química e também para estudos buscando novos produtos e inovação. Sendo assim, uma planta com as características diferenciáveis é extremamente útil para a autenticidade da espécie e a identificação dos órgãos das plantas onde podem estar presentes substâncias com concentrações diferentes, especialmente quando as plantas estão fragmentadas para o uso em medicamentos à base de plantas (MATIAS et al., 2016).

Estudos químicos usando técnicas histoquímicas contribuem para uma avaliação preliminar barata e rápida da presença de metabólitos de interesse produzidos pela planta sejam eles primários ou secundários, na busca de substâncias que podem se tornar novos fármacos.

## **2.3 Estudos Anatômicos**

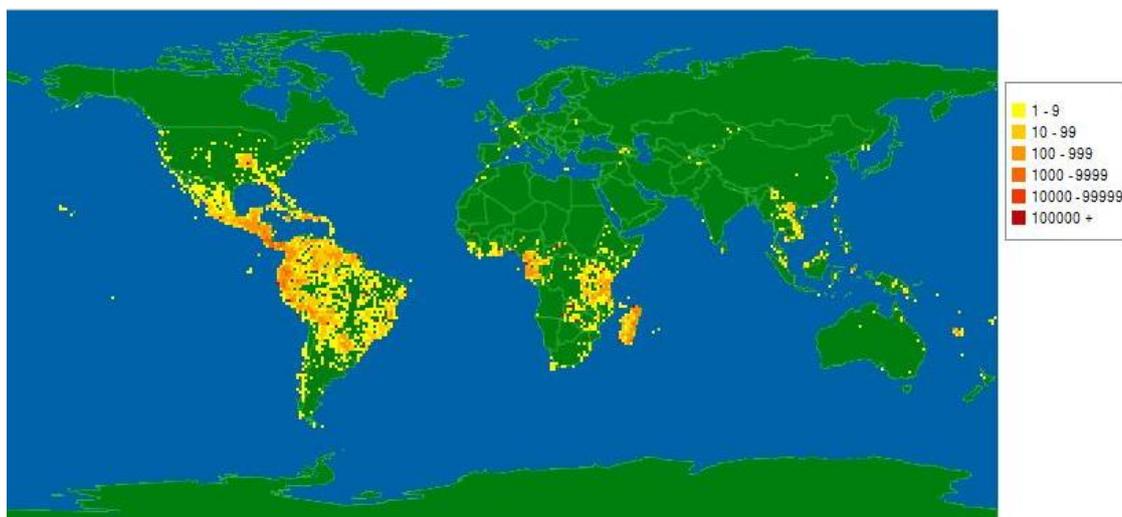
O estudo anatômico permite maior conhecimento dos aspectos anatômicos das plantas com potencial medicinal, e para gestão adequada, já que permite localizar suas estruturas secretoras ou armazenadoras de substâncias de interesse, e entender como a planta sintetiza os metabólitos secundários e se está associada a sua disposição anatômica (SANTOS et al., 2009).

Existem características peculiares em plantas como a presença de tricomas, estes com forma, função, tamanho e estrutura específica. Os tricomas são estruturas anatômicas especializadas que produzem, armazenam e secretam os constituintes por eles produzidos, existem ainda aqueles especializados na acumulação de metabólitos secundários, tais como flavonoides e alcaloides e outros tricomas capazes de segregar polissacarídeos e proteínas, amido entre outros que são muito úteis para fins fitoterápicos e cosméticos. A utilização segura e eficaz de plantas com potencial medicinal depende da elaboração de metodologias adequadas que deem confiabilidade a esses fitoterápicos (ARGRYROPOULOU et al., 2010; ALMEIDA et al., 2015).

#### **2.4 Família Rubiaceae**

A família Rubiaceae possui cerca de 13.673 espécies, com distribuição cosmopolita e possui 609 gêneros e 44 tribos. Dividida em três subfamílias (Cinchonoideae, Ixoroideae e Rubioideae) é a quarta maior família de dicotiledôneas, ocorre em todo o mundo, porém predomina em regiões tropicais. No Brasil compreende 18 tribos, 112 gêneros e 1.347 espécies, sendo considerada uma das maiores famílias de dicotiledôneas (Figura 6), também importante elemento no cenário econômico e na constituição de fármacos naturais (NASCIMENTO, 2013; BARBOSA, 2016; THE PLANT LIST, 2017).

Na Reserva Ducke, localizada em Manaus, Amazonas, podem ser encontradas 90 espécies e 35 gêneros pertencentes a essa família, de hábitos bem variados como árvores, arvoretas, arbustos, ervas, lianas e epífitas (RIBEIRO *et al.* 1999).



**Figura 6:** Mapa de distribuição global de Rubiaceae. Fonte: Mobot, 2016.

Ribeiro e colaboradores (1999) descrevem como uma das características da família Rubiaceae o seu estado vegetativo como folhas opostas e raramente verticiladas e a presença de estípulas, sua inflorescência costuma variar bastante tanto na sua forma quanto tipo, suas flores costumam ser actinomorfas, brancas, amarelas, azuis e com odor agradável e são polinizadas por insetos e possui associação com formigas, característica marcante da família. Quanto aos seus frutos podem ser secos ou carnosos, os frutos carnosos são capsulares e as sementes frequentemente aladas, outras características são que o fruto carnosos tem forma de bagas ou drupas de coloração variadas: amarelas, alaranjadas, vermelho, azul, roxo ou preto.

A química da família Rubiaceae engloba diversas substâncias conhecidas, como flavonoides, terpenos, alcaloides indólicos e cumarinas, isoladas em diversos gêneros (MARTINS et al., 2014; VIEIRA et al., 2001; VALENTE et al., 2009; CARDOSO et al., 2008). Ainda, segundo Young (1996, *apud* CARDOSO, 2008), a ocorrência dos principais metabólitos secundários encontrados na família, tais como iridoides, alcaloides indólicos e antraquinonas demonstraram-se valiosas pistas para a solução de problemas quimiotaxonômicos.

A família Rubiaceae é caracterizada pela produção de metabólitos secundários com propriedades bioativas, empregadas em uso farmacológico, alguns exemplos espécies é a *Psychotria* das quais foram isolados alcaloides com atividade antimicobacteriana; espécies de *Uncaria* para as quais os seus extratos brutos e substâncias isoladas, como alcaloides e terpenos pentacíclicos, apresentaram

comprovada atividade citotóxica, antiinflamatória, antiviral, imunoestimuladora, antioxidante, vascular, hipotensora, antimutagênica e antibacteriana; a *Morinda citrifolia*, da qual foram feitos estudos que relatam atividade antifúngica, antibacteriana, antiviral, antimicrobiana e anti-inflamatória; e estudos com extratos das cascas do tronco da espécie *Hensia crinita*, que possuem atividade antiplasmódica, antioxidante e da qual ainda foram isolados dois novos iridoides (MORAES, 2011; HEITZMAN, 2005; USHA, 2010; TSHIBANGU, 2017).

Contudo, ainda existem gêneros pouco explorados dentro da família, como *Duroia*, onde alguns estudos com espécies do gênero mostram a presença de alcaloides indólicos, terpenos e substâncias fenólicas, bem como potenciais farmacológicos pouco explorados, mostrados a seguir.

## **2.5 *Duroia* L.F**

O gênero *Duroia* L.F pertence à subfamília Ixoroideae da tribo Gardeniae, são plantas lenhosas, estípulas inteiras, corolas com lobos contornos, muitos óvulos por lóculos, raramente um e frutos carnosos (RIBEIRO, 1999).

Este gênero, considerado neotropical, está distribuído pela América Central, Colômbia, Guianas, Equador, Peru, Bolívia, até o Brasil central. Nascimento (2013) relata que no Brasil, o gênero compreende a região Norte (Roraima, Amapá, Pará, Amazonas, Acre, Rondônia), Nordeste (Maranhão) e Centro-Oeste (Mato Grosso).

Delprete (2010) enfatizou que as inflorescências masculinas em *Duroia* não apresentam diferença para distinção com *Amaioua* por serem similares, já as inflorescências femininas são apresentadas em corimbos ou cimeiras, suas flores são solitárias assim como seus frutos, diferindo bastante das *Amaioua*, isso torna as espécies de *Duroia* únicas e raras na família Rubiaceae.

Outra característica do gênero *Duroia*, é que seus representantes são árvores ou arbustos dioicos, com ramos cilíndricos, estípulas terminais em forma de cone apical, também podendo ser decíduas ou persistentes, folhas decussadas, ternadas, em algumas com bolsa mirmecófilas na base, papiráceas, subcoriáceas a coriáceas; domácias com indumento ou não, inflorescências terminais, as estaminadas fasciculadas ou corimbosas, flor pistilada semelhante à estaminadas, só que única, raramente aos pares (DELPRETE, 2010).

Existem poucos estudos com o gênero *Duroia*, entre esses estudos destacam-se estudos químicos e biológicos realizados pelo nosso grupo de pesquisas com *D. macrophylla* onde foram isolados triterpenos com atividade antimicobacteriana, ácido oleanólico e ácido ursólico com atividade anti-tuberculose (Martins et al 2012, 2013, 2015), e estudos que avaliaram atividades antimicobacteriana, antifúngica e antiparasitária de extratos de *D. macrophylla* e *D. saccifera* (Reis et al 2016). Também foram realizados estudos *in vitro* dos calos da espécie *D. macrophylla* e a prospecção química e biotecnológica do potencial dos extratos, bem como estudos de sazonalidade (Zanca et al 2016). Com *D. hirsuta* foram realizados estudos que relatam a relação mutualística com formigas e estudos químicos onde foram isolados 3-metoxiflavonas, iridoides lactônicos e flavonoides (Aquino et al 1998, Frederickson & Gordom, 2007). Contudo ainda existem espécies que carecem de estudos, como a *D. longiflora*, alvo deste estudo.

## 2.6 A espécie *Duroia longiflora* Ducke

*D. longiflora* Ducke ocorre espontaneamente no Brasil, é encontrada na Região Amazônica, nos Estados do Pará, Amapá, Rondônia e Amazonas. Na revisão do gênero *Duroia*, Nascimento (2013) observou que *Duroia longiflora* na Reserva Adolpho Ducke, floresce e frutifica de setembro a dezembro, sendo encontrada em florestas de baixio, vertente e platô.

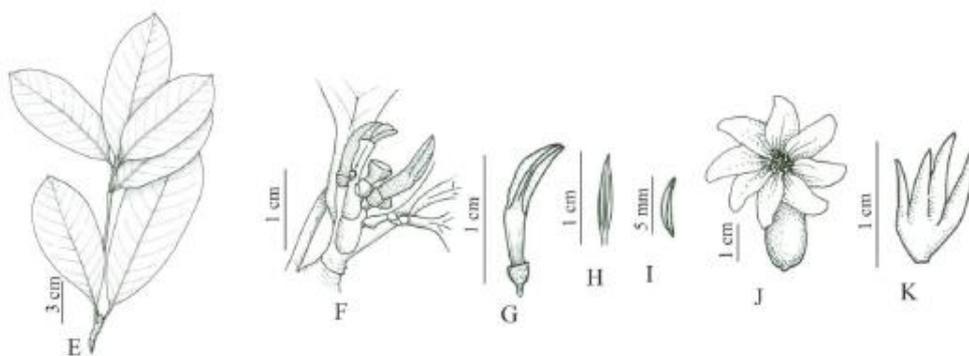
Os indivíduos de *D. longiflora* podem medir até 17 metros de altura com 15 cm de diâmetro, o ritidoma é marrom-escuro, estriado a fissurado; exterior da casca marrom com estrias creme, fibrosas, com cerca de 0,2 cm de espessura; alborno creme-rosado, ramos em domácias, esbranquiçados, ligeiramente quadrangulares, glabros, escamosos, estípula 1,5 cm compr. x 0,5 cm larg., levemente cônica com tricomas amarelados.

Como ilustrado nas Figuras 7 e 8, as características das folhas são ternadas com 17-27 cm comprimento x 7-12 cm largura, pecíolo 1,5-2,0 cm comprimento lâmina elíptico-oblancheolada com margem plana, cartácea, com indumento escasso em ambas as faces, base aguda a atenuada, ápice cuspidado. Venação camptódroma de 10-12 nervuras secundárias de cada lado. Nervuras principais e secundárias proeminentes em ambas as faces do tipo quadrada, glabrescentes. Inflorescência estaminada pedicelada, subséssil, fasciculada com 3-5 flores (NASCIMENTO, 2013).



**Figura 7:** Características das folhas e estípulas de *Duroia longiflora* Ducke (RIBEIRO et al 1999).

Flor pistilada hipocrateriforme, alva a amarelada, heptâmera 1,5-3,0 cm compr. x 0,3-0,5 cm comprimento, externamente pubescente e internamente com ramento ‘escama parda’, cálice 0,3-0,4 cm comprimento, coriáceo, truncado a enrugado, discretamente piloso na base, antera 0,5-1,0 cm comprimento, dorsifixa longitudinal, estilete 1,0-1,5 cm comprimento, não funcional. Flor, única, envolvida por uma bráctea pilosa, cálice 1,5 cm comprimento. x 1,0- 4,7 cm largura, corola alva a amarelada, 3,0-3,4 cm comprimento x 1,0 cm largura, pétalas 8, estilete 1,0 cm comprimento., com quatro câmaras estigmáticas, anteras 7, 0,5 cm comprimento, não funcional (RIBEIRO, 1999).



**Figura 8:** Morfologia foliar e floral de *Duroia longiflora* Ducke. E- ramos com folhas ternadas; F - inflorescência; G – Botão floral; H - estilete; I-flor pistilada; J – estilete com quatro câmaras estigmáticas (NASCIMENTO, 2013).

Não existem estudos prévios fitoquímicos, histoquímicos e anatômicos da espécie *Duroia lonfligora*, na literatura consultada, tornando assim este trabalho importante, pois agrega novas informações para a espécie.

## **2.4 Ensaios Biológicos**

### **2.4.1 Atividade Antioxidante**

O agente antioxidante pode ser definido por sua capacidade de neutralizar a ação dos radicais livres agindo total ou parcialmente sobre enzimas responsáveis pela produção desses radicais. Estes antioxidantes podem ser sintéticos ou naturais, como o ácido ascórbico, úrico, vitamina E, carotenoides, glutathione. E ainda existem substâncias em plantas que também possuem função antioxidante e que podem ser produzidas em grande ou pequena quantidade (SHAMI & MOREIRA, 2004).

Os radicais livres são substâncias tóxicas que possuem o número de elétrons ímpares, e que promovem a oxidação de substâncias nas células saudáveis, danificando-a fazendo com que busquem um elétron ligante para se estabilizarem, porém durante esse processo podem danificar as células e muitas vezes geram outros radicais livres (CANCELA 2008; MELO et al. 2008).

A vitamina C também denominada ácido ascórbico é um dos mais potentes antioxidantes, capaz de estabilizar, e em alguns casos, erradicar os radicais livres, impedindo a deterioração das células. Os antioxidantes estão presentes em diversos alimentos, como verduras, frutas e legumes ou isolados a partir da planta na forma de clorofila, flavonoides, carotenoides, eles atuam protegendo a planta contra injúrias e em seres humano atua na inibição dos danos causados pelos radicais livres (BIANCHI & ANTUNES, 1999).

### **2.4.2 Atividade Antimicrobiana**

A busca por drogas contra patógenos que causam enfermidades nos seus hospedeiros, seja humano ou animal ocorre desde os tempos mais remotos. A existência

de cepas cada vez mais resistentes às drogas impulsiona constantemente a busca por novas drogas que sejam eficazes e menos agressivas e de fontes naturais. Portanto as plantas são uma fonte de novas moléculas com propriedades antimicrobianas (DUARTE, 2006; PARKER & LUZ, 2007).

De diferentes métodos laboratoriais *in vitro*, que são usados para determinar o potencial antimicrobiano do extrato ou substância, que podem ser empregados, entre eles o de difusão em poços em ágar (SOUZA et al 2003).

O método de difusão em ágar é uma das técnicas mais usadas dentro da rotina dos laboratórios de análise clínica e recomendada pela Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2012). Através desta técnica é possível avaliar a inibição do crescimento de bactérias, utilizando-se diferentes tipos de reservatórios, como discos de papel filtro impregnados com a substância a ser avaliada os quais são colocados na superfície do meio de cultura previamente inoculado com as bactérias ou perfurado poços nessa superfície onde é colocada uma concentração conhecida do antibacteriano, posteriormente é observada a correlação entre a concentração da substância e a capacidade para gerar halos de inibição ao redor dos discos ou poços, o que representa o potencial antibacteriano das substâncias avaliadas, as cepas testadas foram classificadas com pré clínicas, sendo duas gram-positivas e duas gram-negativas (ELOFF, 1998; SOUZA et al 2003).

#### **2.4.3 Atividade Tóxica frente a *Artemia salina***

A *Artemia salina* é um microcrustáceo pertence à ordem Anostraca e família Artemidae, gênero *Artemia*, com colorações variadas como rosa, claro a escuro, amarelado ou até mesmo verde, isso dependendo do tipo de alimentação, ele é amplamente utilizado como indicador de toxicidade em bioensaios que visam detectar compostos bioativos em extratos vegetais. Sendo assim, os ensaios são realizados com o objetivo de avaliar possíveis efeitos tóxicos em um sistema biológico e prever a toxicidade da substância em teste (TEIXEIRA, 2008).

As substâncias consideradas bioativas quase sempre são tóxicas, sua concentração pode ser monitorada através de bioensaios com este microcrustáceo. Os

cistos ou ovos de *Artemia salina* (Leach) são encontrados facilmente em qualquer *pet shop*, os cistos podem ser conservados em ambiente seco e anaeróbico por longos períodos sem necessidade de cultura contínua. O bioensaio é considerado preliminar e permite fazer uma triagem quando se buscam substâncias biologicamente ativas. (CUNHA, 2011)

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Realizar o estudo fitoquímico e da atividade biológica dos extratos das folhas de *Duroia longiflora*, bem como o estudo histoquímico e anatômico das folhas.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar os extratos das folhas de *D. longiflora* quanto a sua atividade tóxica sobre *Artemia salina*, antimicrobiana e antioxidante;
- Descrever os tecidos anatômicos das folhas de *D. longiflora*, com ênfase no sítio de produção das substâncias.
- Histolocalizar as substâncias detectadas nas folhas;
- Caracterizar as classes de substâncias químicas presentes nos extratos de *D. longiflora*;
- Fracionar e isolar as substâncias presentes nos extratos bioativos.

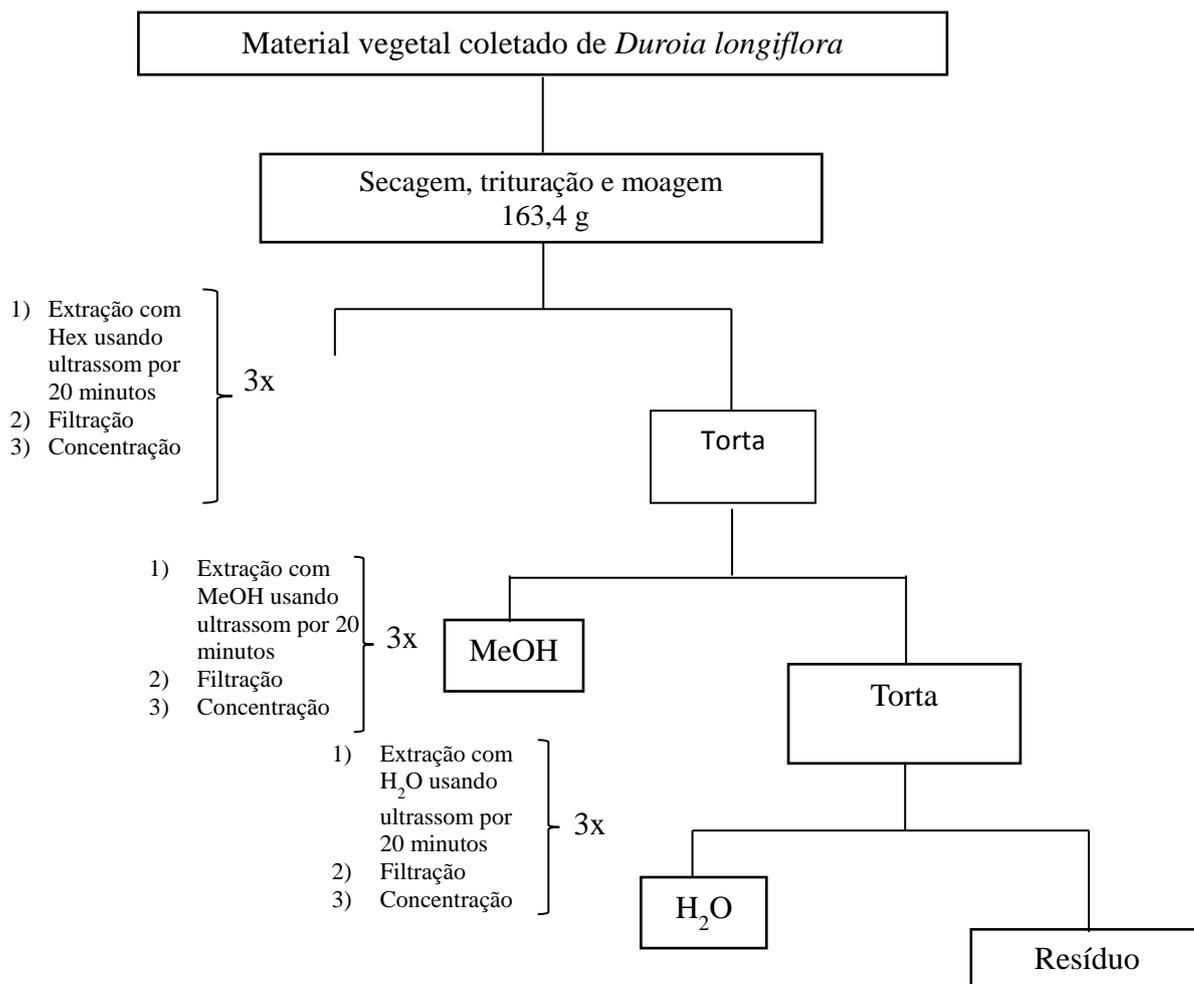
## **4. MATERIAL E METÓDOS**

### **4.1 Coleta**

As folhas de três indivíduos de *Duroia longiflora* foram coletadas na Reserva Ducke, localizada no Km 26 da Estrada Manaus-Itacoatiara (AM-010) e na Base de Manejo Florestal ZF2, Estação de Silvicultura Tropical, localizada na BR 174 km 50, vicinal ZF-2 Km 23. A sua exsicata foi depositada no Herbário do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas sob o n° 10893. A coleta para a parte fitoquímica foi realizada no dia 22 de março de 2015.

### **4.2 Preparo e Seleção dos Extratos**

As partes vegetais foram separadas (galhos e folhas) e secas primeiramente em estufa de circulação forçada (30 a 40 °C) e depois moídas em moinho de facas (marca Tecnal, modelo Willye TE-650). Em seguida foi realizada a extração, primeiro com o solvente hexano, com auxílio do banho de ultrassom (marca Unique) por 20 minutos, o material filtrado e novamente extraído com solvente e ultrassom; sendo o processo repetido até que visualmente a coloração do extrato ficasse clara. Depois, as folhas foram extraídas com metanol e finalmente com água. Em seguida, os extratos foram concentrados em rota evaporador (marca Fisatom, modelo 802) para os extratos hexânicos e metanólicos e liofilizador (marca CHRIST, modelo (Beta 1-8 LD plus) para os extratos aquosos, conforme o esquema abaixo (Figura 9).



A seleção do extrato a ser estudado foi realizada por meio das técnicas cromatográficas (Cromatografia Delgada Comparativa) avaliando a presença ou não de determinados compostos e as técnicas espectroscópicas (Ressonância Magnética Nuclear), auxiliando na análise por CCDC e aliados os resultados dos ensaios biológicos (Ensaio Antioxidantes, Microbiológicos e Toxicidade), onde os extratos mais ativos e com maior presença de grupos químicos foram fracionados.

## 4.2 Fracionamentos Cromatográficos e Isolamento

### 4.2.1 Análise cromatográfica dos extratos

Para a análise cromatográfica em camada delgada comparativa (CCDC) foram utilizadas cromatofolhas de sílica gel 60, com indicativo de fluorescência no UV 254 nm, estas cromatofolhas apresentam 0,20 mm de espessura (Macherey-Nagel-NM).

Para as revelações das amostras em CCDC foram utilizados os reagentes de anisaldeído, reagente de Bouchardt, cloreto de alumínio, cloreto férrico, 2,2-difenilpicril-hidrazila (DPPH), reagente de Dragendorff e iodo e utilizou se irradiação ultravioleta nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm, a aplicação das amostras nas cromatoplasca foi feita com uso de tubos capilares de vidro de 75 mm de comprimento e diâmetro interno e externo de 1,0 mm e 1,5 mm, respectivamente. Abaixo segue a tabela 1 com especificações de cada revelador.

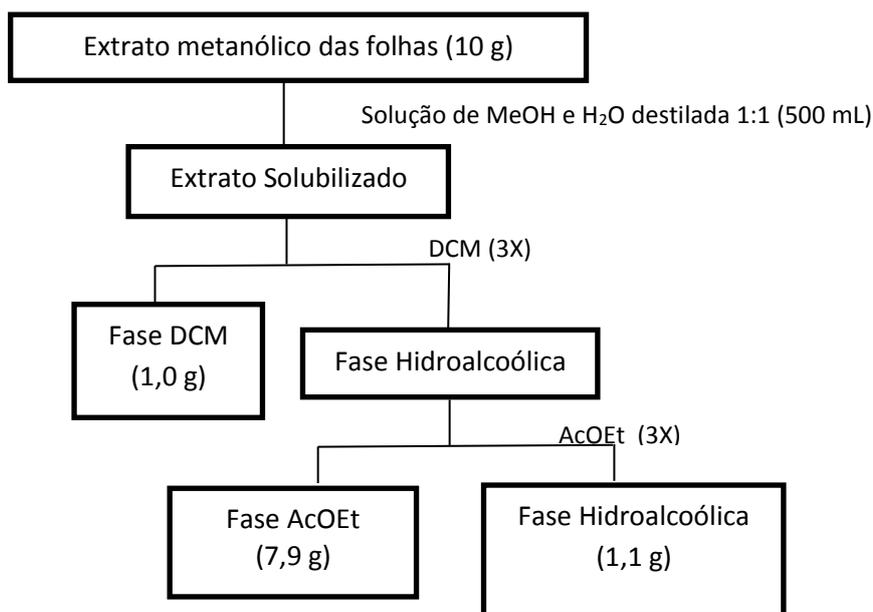
**Tabela 1. Reveladores para Cromatografia em Camada Delgada**

<b>Revelador</b>	<b>Classes químicas</b>	<b>Resultado</b>	<b>Referência.</b>
<b>Anisaldeído</b>	Monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos	Manchas arroxeadas, rosadas e avermelhadas	COSCIA, 1984
<b>Reagente de Bouchardt</b>	Alcaloides	Manchas de cor marrom	WAGNER, BLADT, ZGAINSKI; 1984
<b>Cloreto de Alumínio (AlCl<sub>3</sub>)</b>	Revela todos os Alcaloides	Fluorescência amarela na luz UV- 365nm	SIMÕES, 1999
<b>Cloreto Férrico (FeCl<sub>3</sub>)</b>	Flavonoides e Taninos	Intensificação 365 nm	SIMÕES, 1999
<b>DPPH</b>	Antioxidante	Fluorescência amarela	MOLYNEUX, 2004
<b>Reagente de Dragendorff</b>	Alcaloides	Manchas laranja a vermelhas persistentes	WAGNER, BLADT, ZGAINSKI; 1984
<b>Iodo</b>	Duplas ligações (cumarinas e seus derivados, polifenóis, xantinas, alcaloides).	Manchas amarelas a marrom	COLLINS, BRAGA, BONATO, 2006.
<b>UV 254 nm</b>	Derivados antraquinônicos, cumarinas, alcaloides.	Florescência	COLLINS, BRAGA, BONATO, 2006

UV 365 nm	Substâncias fenólicas, cumarinas, antraquinonas.	Florescência amarelada e esverdeada	COLLINS, BRAGA, BONATO, 2006
-----------	--	-------------------------------------	------------------------------

#### 4.2.2 Partição Líquido-Líquido

Posteriormente à análise cromatográfica em camada delgada, o extrato metanólico das folhas foi submetido à partição. Para esse fracionamento foram utilizados 10 g de extrato metanólico que foram solubilizados em 500 mL de uma solução de MeOH e água destilada (1:1), colocados em um funil de separação de 1 L extraídos por três vezes para cada solvente, no total sendo utilizados 1,5 L de solvente para cada extração com diclorometano (DCM), e acetato de etila (AcOEt). Com esses procedimentos foi possível realizar uma pré-separação dos constituintes químicos, facilitando os fracionamentos seguintes (Figura 5).



**Figura 10:** Fluxograma da partição do extrato metanólico das folhas de *Duroia longiflora*

#### 4.2.3 Fracionamento dos Extratos

Para o fracionamento dos extratos foram utilizadas colunas cromatográficas abertas, utilizando como fases estacionárias sílica gel, Florisil, alumina, poliamida,

Sephadex LH-20, Sep-Pack Florisil, Sep-Pack C<sub>18</sub>. Durante este trabalho foram realizados um total de 23 colunas cromatograficas abertas, 3 cromatograficas em camada delgada preparativa, 3 cromatograficas em coluna Sep-pack e 1 partição. A fase diclorometânica da partição do extrato metanólico foi a que concentrou as substâncias isoladas ou em processo de purificação deste estudo, sendo assim optou-se por descrever as colunas cromatográficas da fase que geraram estas substâncias; a fase acetato de etila também foi fracionada, porém não foi possível isolar substâncias em tempo viável. As condições dos fracionamentos estão indicadas na tabela 2. As frações foram analisadas pela revelação das placas cromatográficas com os reveladores: vapores de iodo, anisaldeído, cloreto férrico, sulfato cérico, reagente de Dragendorff e reagente de Bouchardt.

#### **4.2.4 Fracionamento da fase DCM do Extrato Metanólico das Folhas de *Duroia longiflora***

O primeiro fracionamento da fase DCM (1 g) do extrato metanólico das folhas de *Duroia longiflora* foi realizado em coluna cromatográfica aberta de vidro medindo 40 cm de altura, com altura da fase estacionária x diâmetro interno de 32 x 2,2 cm, usando Sephadex LH-20 como fase estacionária e eluição em sistema isocrático em MeOH (5 L), gerando 64 frações. Estas foram analisadas por CCDC e as frações 2-4, 5-12, 13-20, 21-60 reunidas e novamente fracionadas.

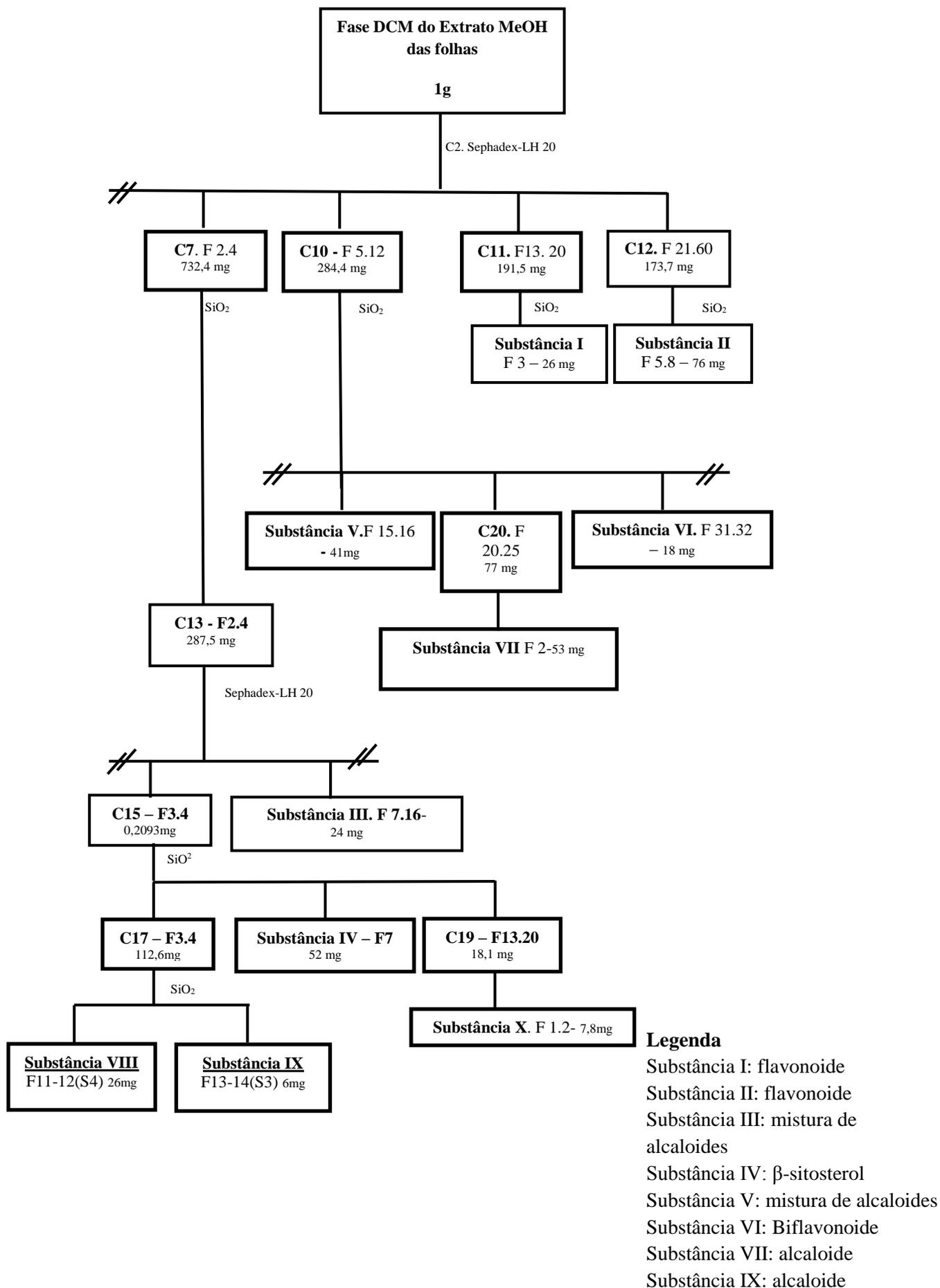
**Tabela 2: Frações purificadas da fase DCM do extrato metanólico das folhas de *Duroia longiflora***

Fração refracionada da fase DCM do extrato metanólico	Massa da Amostra (g)	Fase Estacionária	Dimensões da coluna (altura x diâmetro interno) e Proporção de Amostra/Fase estacionária	Sistema de Eluição	Frações coletadas	Fração de interesse / Classe substância isolada
<b>13-20 (C11)</b>	0,1915	Sílica	32,2 x 1 cm 1:80	DCM 100%, DCM/AcOEt (99:1), DCM/AcOEt (95:5), DCM/AcOEt (9:1), DCM/AcOEt (85:15), DCM/AcOEt (8:2), DCM/AcOEt (7:3), DCM/AcOEt (1:1) MeOH 100%,	0, 1, 2, 3, 4, 5 6, 7 8, 9 10, 11 12, 13,14 15 16,17 18	Fração 13-20 fracionada, Fração 19, fracionada Fração 3- alcaloide ( <b>Substância I</b> )
<b>21-60 (C12)</b>	0,1737	Sílica	29 x 1 cm, 1:100	DCM 100%, DCM/AcOEt (95:5), DCM/AcOEt (9:1), DCM/AcOEt (85:15), DCM/AcOEt (8:2), DCM/AcOEt (7:3), DCM/AcOEt (1:1) MeOH 100%	1, 2, 3 4, 5 6, 7 8, 9 10, 11 12, 13 14,15,16 17, 18, 19, 20	Fração 21-60 fracionada, Fração 19 fracionada, Fração 8-2 flavonoide ( <b>Substância II</b> )
<b>16-19 (C13)</b>	0,2875	Sephadex LH-20	3,5 x 1,5	MeOH 100%	16	Fração 2-4 fracionada, Fração 16-19 fracionada, Fração 16 fracionada, Fração 7-16 flavonoide ( <b>substância III</b> )
<b>3-4 (C15)</b>	0,2093	Sílica	29 x 1 cm 1:100	DCM 100%, DCM/AcOEt (95:5), DCM/AcOEt (9:1), DCM/AcOEt (85:15), DCM/AcOEt (8:2), DCM/AcOEt (75:25), DCM/AcOEt (7:3), DCM/AcOEt (6:4), DCM/AcOEt (1:1), MeOH 100%	1,2,3 4,5,6,7,8,9,10,11,12,13 14,15,16,17 18,19,20,21,22,23,24 25,26,27,28,29,30,31 32,33,34,35,36,37 38,39 40,41 42,43 44,45	Fração 2-4 fracionada, Fração 16-19 fracionada, Fração 16 fracionada, Fração 3-4 fracionada, Fração 7 β- sitosterol ( <b>substância IV</b> )
<b>5-12 (C10)</b>	0,2844	Sílica	3,2 x 1,5 cm 1:100	DCM 100%, DCM/AcOEt (95:5), DCM/AcOEt (9:1), DCM/AcOEt (85:15), DCM/AcOEt (8:2), DCM/AcOEt (7:3), DCM/AcOEt (1:1),	1, 2, 3, 4,5 6, 7, 8, 9,10 11,12,13,14,15 16,17,18,19,20 21,22, 23,24,25 26,27,28,29 30,31,32,33,34	Fração 5-12 fracionada, Fração 35 fracionada, Fração 15-16 mistura de alcaloides

				MeOH 100%	35	indólicos ( <b>substância V</b> <b>majoritária</b> ), Fração 31-32 alcaloide indólico ( <b>substância VI</b> )
<b>20-25</b> <b>(C20)</b>	0,0077	sílica	1,2 x 0,5 cm (pipetinha) 1:100	DCM/AcOEt (8:2), DCM/AcOEt (75:25), DCM/AcOEt (7:3), DCM/AcOEt (65:35), DCM/AcOEt (6:4), DCM/AcOEt (1:1), AcOEt 100%, MeOH 100%	1,2 3 4 5 6 7 8 9,10	Fração 5-12 fracionada, Fração 35 fracionada, Fração 10 fracionada, Fração 2 alcaloide indólico ( <b>Substância</b> <b>VII</b> ),
<b>11-12</b> <b>(C17)</b>	0,0134	CCDP		DCM/AcOEt (98:2)	7	Fração 2-4 fracionada, Fração 16-19 fracionada, Fração 16 fracionada, Fração 3-4 fracionada, Fração 3-4, Fração 21 fracionada Fração 11-12 fracionada,(S4) alcaloide ( <b>substância</b> <b>VIII</b> )
<b>13-14</b> <b>(C17)</b>	0,052	CCDP		DCM/AcOEt (95:5)	4	Fração 2-4 fracionada, Fração 16-19 fracionada, Fração 16 fracionada, Fração 3-4 fracionada, Fração 3-4, Fração 21 fracionada Fração 13-14 (S3) um alcaloide ( <b>substância</b> <b>IX</b> ),
<b>1-2 (C19)</b>	0,0072	CCDP		DCM/AcOEt (95:5)	6	Fração 2-4 fracionada, Fração 16-19 fracionada, Fração 16 fracionada, Fração 3-4 fracionada,

						Fração 13-20 fracionada, Fração 10 Fração 1-2 mistura de terpenos <b>(substância X          majoritária)</b>
--	--	--	--	--	--	--

A figura 11 mostra o fluxograma geral de todos os fracionamentos realizados que levaram a elucidação e isolamento da substâncias descritas neste estudo. As substâncias isoladas estão em processo de identificação/elucidação estrutural por meio de análise dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de (300 MHz (Bruker), de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  (mono e bidimensionais) e Espectrometria de Massas (*eletrospray* (ESI), utilizando como instrumento micrOTOF (Bruker)).



**Figura 11:** Fluxograma das substâncias isoladas da Fase DCM do extrato metanólico das folhas de *Duroia longiflora*.

## 4.3 Preparo e Fixação das Folhas para estudo anatômico e histoquímico.

### 4.3.1 Estudo histoquímico

Foram coletadas cinco folhas de indivíduos jovens do 3º ou 4º nó, sadias, de três indivíduos de *D. longiflora*, estes foram fixados em FAA<sub>70</sub> por 48 horas estocadas em álcool 70% a serem submetidas aos testes histoquímicos. O material foi seccionado com lâmina de micrótomo de mesa rotativo adaptado para um micrótomo de mesa corte de mão livre e colocado sobre vidro de relógio onde foram corados e receberam tratamento de acordo com reagente escolhido conforme Tabelas 3 e 4. Depois de corados, os cortes foram colocados em lâmina de vidro para observação. As substâncias detectadas nos tecidos do pecíolo e limbo foliar foram fotografadas em microscópio acoplado com câmera digital.

**Tabela 3 - Reveladores Para Avaliação Histoquímica (Metabólitos Primários)**

Revelador	Classes químicas	Resultado	Autor
Lugol	Amido	Corá roxa, negra e marrom.	JOHANSEN, 1940
Sudam III	Lipídios	Coram alaranjado	PEARSE, 1972
Xilidine Ponceu	Proteínas	Coram vermelho	VIDAL, 1970

**Tabela 4- Reveladores Para Avaliação Histoquímica (Metabólitos Secundários)**

Revelador	Classes químicas	Resultado	Autor
Reagente de Dragendorff	Alcaloides	Coram vermelho acastanhado	SVEENDSEN & VERPOORTEL, 1983. FURR, M. e MAHLBERG, 1981.
Reagente de Wagner	Terpenos e Alcaloides	Coram vermelho alaranjado	GANTER & JOLLÈS, 1969; 1970
Reagente de Cloreto Férrico	Substâncias Fenólicas	Corá marrom ou negra	JOHANSEN, 1940
Reagente de Vanilina Clorídrica	Taninos	Coram vermelho	MACE & HOWEL, 1974

#### **4.3.1.1 Detecção de Amido**

Os cortes das folhas foram imersos no lugol por 5 a 10 minutos, após esse período foram lavados em água destilada. Em seguida, foi montada a lâmina em meio com glicerina.

Os cortes das folhas foram imersos na solução de Sudam III por 15 a 30 minutos em um recipiente fechado, após esse período foram lavados rapidamente em álcool 70% e em água destilada. Em seguida, foi montada a lâmina em meio com glicerina.

#### **4.3.1.3 Detecção de Proteínas**

Os cortes das folhas foram imersos no reagente de Xilidine Ponceu por 5 a 10 minutos, após esse período foram lavados em solução acética a 5% e em seguida lavados em água destilada. A lâmina foi montada em meio com glicerina.

#### **4.3.1.4 Detecção de alcaloides**

Os cortes de folhas foram imersos no ácido tartárico a 5% etanol a 95% por um período de 48 a 72 horas, após esse período os cortes foram corados por 15 a 30 minutos com os reagentes de Dragendorff (SVEENDSEN & VERPOORTEL, 1983), e de Wagner (FURR e MAHLBERG, 1981), em seguida foram lavados com água destilada e fixadas em lâminas com água destilada.

#### **4.3.1.5 Detecção de Substâncias Fenólicas**

Os cortes de folhas foram imersos nas soluções de cloreto férrico (JOHANSEN, 1940) e dicromato de potássio (GABE, 1968), por 15 a 30 minutos após esse período foram lavados em água destilada e as lâminas foram fixadas em meio hidratado (água, glicerina ou gelatina glicerinada).

#### **4.3.1.6 Detecção de Taninos**

Os cortes foram corados com vanilina clorídrica (MACE & HOWEL, 1974), foram corados por 10 minutos, os cortes foram preparados diretamente nas lâminas.

#### **4.4. Estudo anatômico**

Foram utilizadas as folhas de três indivíduos de *Duroia longiflora*, coletadas *in vivo* foram fixadas em FAA<sub>70</sub> por 48 horas estocadas em álcool 70%. Posteriormente foram obtidos cortes da região mediana do pecíolo e da base, meio e ápice do limbo foliar.

Para o estudo anatômico foram feitos cortes transversais do pecíolo e limbo, paradérmicos e por dissociação de epidermes da lâmina foliar, utilizando-se o material fixado estocado em álcool 70%.

Foram obtidos os cortes paradérmicos do limbo realizados à mão livre com lâmina de barbear, posteriormente clarificados em hipoclorito de sódio a 20% e corados com safranina alcoólica a 1%.

Também foi utilizado o método de dissociação da epiderme, onde foram realizados cortes no limbo com cerca, 1 cm<sup>2</sup> da ápice, base, região da nervura e margem da folhas esta foram colocadas em solução de peróxido de hidrogênio 30% e ácido acético P.A. (1:1), coradas com safranina alcoólica a 1% e submetidas a uma série etanólica (30, 50, 70 e 95%). Em seguida, foram confeccionadas lâminas semipermanentes com glicerina 50% e seladas com esmalte (KRAUS & ARDUIN, 1997).

Também foram feitos cortes das folhas da região mediana do pecíolo, mediana do limbo próximo à nervura central e na região marginal para serem corados com azul de astra e safranina (Safrablau) (9:1). A realização dos cortes transversais foi realizada com lâmina de micrótomo de mesa rotativo adaptado para um micrótomo de mesa corte de mão livre em seguida os cortes também foram clarificados com hipoclorito a 20% e corados com Safrablau e as lâminas semipermanentes foram confeccionadas da mesma forma que as dos cortes paradérmicos.

## 4.5 Ensaios Biológicos

### 4.5.1 Atividade Antioxidante

A avaliação da atividade antioxidante dos extratos das folhas e galhos (0,5 mg/mL) foi realizada utilizando os ensaios quantitativos com o 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH•) e com o  $\text{Fe}^{3+}$ /1,10-fenantrolina 0,25%, os resultados obtidos foram comparados em termos de equivalência com o padrão ácido ascórbico. A concentração equivalente do ácido ascórbico foi obtida pela interpolação dos dados entre a variação da absorbância e a concentração do ácido ascórbico representados em uma curva analítica. Para construção dessa curva analítica foram preparados seis micro tubos do tipo ependorff, com alíquotas diluídas do padrão ácido ascórbico e sua quantificação foi feita através do espectrofotômetro (Marca Femto) em comprimento de onda de 517 nm, por 30 minutos (NOVAES, 2007).

Para a curva do  $\text{Fe}^{3+}$  foi preparada utilizando 10  $\mu\text{L}$  dessas alíquotas diluídas em seis novos micros tubos também e então adicionado a eles 10  $\mu\text{L}$  de  $\text{Fe}^{3+}$  e 980  $\mu\text{L}$  de 1,10 de fenantrolina e 1 hora depois essas alíquotas foram submetidas à leitura em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 508 nm.

Para a curva de DPPH, as soluções foram preparadas no dia do experimento dissolvendo aproximadamente 3 mg do reagente em 100 mL de metanol (30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). O ácido ascórbico foi preparado dissolvendo 44 mg do reagente em 50 mL de água deionizada (44  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Para o procedimento utilizando o DPPH• foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  da solução do extrato e 990  $\mu\text{L}$  de DPPH• e 30 minutos depois, a leitura é realizada em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 517 nm. O preparo do branco consistiu em adicionar 10  $\mu\text{L}$  de água deionizada com 990  $\mu\text{L}$  de DPPH. Para o procedimento usando  $\text{Fe}^{3+}$  como agentes oxidantes foram utilizados 10  $\mu\text{L}$  da solução do extrato para 10  $\mu\text{L}$  de uma solução padrão de  $\text{Fe}^{3+}$  e 980  $\mu\text{L}$  de 1,10-fenantrolina. A leitura foi feita 1 hora depois em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 508 nm. O preparo do branco consistiu em adicionar 10  $\mu\text{L}$  de água deionizada com 10  $\mu\text{L}$  de  $\text{Fe}^{3+}$  e 980  $\mu\text{L}$  de 1,10-fenantrolina. Todos os ensaios foram feitos em triplicata.

#### 4.5.2 Atividade Antimicrobiana

Para este ensaio foram selecionadas duas bactérias Gram-Positivas: *Escherichia coli* (ATCC 11775) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 12600) e duas Gram-Negativas: *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145) e *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), cedidas pela Coleção de Micro-organismos patogênicos humanos de alta significância médica da FIOCRUZ (GERSHMAN et al., 2008; TILDEN et al., 1996.)

A atividade antimicrobiana foi avaliada pelo método de difusão em ágar. Os extratos testados foram os hexânicos, metanólicos e aquosos de folhas e galhos de *D. longiflora*, estes foram diluído em uma solução de DMSO à 5% na proporção de 95:5 para 2 µL de cada amostra.

O ensaio ocorreu através da técnica de difusão de poços seguindo o protocolo estabelecido por CLSI. Após turvação do caldo Müeller-Hilton (MH), a turbidez da cultura foi ajustada em caldo a uma concentração de 0,5 da escala de Mc Farland, o que equivale a uma suspensão bacteriana contendo aproximadamente de 1 a 2 x 10<sup>8</sup> UFC/mL. Em seguida, foram preparadas placas de Petri esterilizadas, onde foram adicionadas meio de cultura previamente inoculado com as bactérias, 20 mL de ágar Müeller Hilton. Após a solidificação, a superfície seca foi inoculada com as bactérias teste, onde poços de 6,0 mm foram feitos com auxílio de uma pipeta Pasteur esterilizada, e neste orifício, 50 µL do extrato foram depositados numa concentração de 2 mg/mL, sendo incubadas durante um período de 16 a 24 horas, para a reativação e posteriormente foram observados a correlação entre a concentração da substância e a capacidade para gerar halos de inibição ao redor dos poços, o que representa o potencial antibacteriano das substâncias avaliadas.

Foi também realizado o controle positivo e neste foram adicionados 50 µL de oxitetraciclina na concentração de 125 µg/mL. As placas foram incubadas em aerobiose a 30 ou 37 °C por 18 h. Após esse período, foram observados os halos de inibição resultantes. Os diâmetros dos halos de inibição total (visualizadas a olho nu) e são mensurados (mm), incluindo o diâmetro do poço usando uma régua.

#### **4.5.3 Teste de Toxicidade sobre à *Artemia salina***

O ensaio de tóxico foi realizado de acordo com o executado por Meyer e colaboradores (1982), com adaptações. Os extratos foram testados em triplicata, nas concentrações de 1000, 500, 250 µg/mL. Para realização deste ensaio foi preparada uma solução marinha contendo 38 g de sal marinho diluída em 1 L de água destilada e foi adicionado 10 mg de cistos de *Artemia*, essa solução foi colocada em Becker sob luz artificial por 48 horas e a temperatura em torno de 27 a 30 °C.

Após o período de eclosão, as artemias foram depositadas em uma placa de 24 poços juntamente com o extrato (diluído em 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) a 25 % ou água destilada, dependendo da polaridade do extrato). Foram colocados 10 indivíduos por poço e em triplicata por concentração e como controle negativo utilizou-se o DMSO e controle positivo dicromato de potássio (100 µg/mL). Após 24 horas, realiza-se a contagem dos sobreviventes para cada poço e calcula-se desvio padrão da quantidade de indivíduos mortos e para determinar o grau de toxicidade do extrato.

## 5. Resultados e Discussão

### 5.1 Coleta e obtenção dos extratos

Os extratos foram preparados e armazenados no Laboratório de Bioprospeção do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (LABB-INPA) e posteriormente submetidos a testes e análises. As massas de extratos obtidos estão mostradas na tabela 5. As maiores massas foram dos extratos metanólicos de folhas e galhos. Abaixo segue as figuras da espécie coletada.



**Figura 12:** (a) Folhas *Duroia longiflora* coletada no Reserva Florestal Adolpho Ducke, AM. (b) Indivíduo *Duroia longiflora*.

**Tabela 5:** Massas e rendimentos dos extratos obtidos de *Duroia longiflora*

Material Vegetal	Massa do Material Vegetal (g)	Extratos obtidos (g)		
		Hexano (g)	Metanol (g)	H <sub>2</sub> O(g)
Folha	163,40	0,9932	24,5058	3,1721
Galho	321,88	0,5058	13,2396	7,0781

## 5.2 Análise por Cromatografia em Camada Delgada Comparativa e RMN.

Todos os extratos brutos foram submetidos à análise de CCDC, em busca de obter um perfil químico. As interpretações das revelações com CCDC foram feitas de acordo com Wagner, Bladt & Zgainski, 1984. Os extratos e as fases foram também analisados por RMN de  $^1\text{H}$  (Marca Bruker, 300 MHz).

## 5.3 Fracionamento do Extrato Metanólico das Folhas de *D. longiflora*

A análise por CCDC do extrato metanólico das folhas indicou a princípio, que poderia haver substâncias aromáticas, terpenos e alcaloides. Posteriormente o extrato metanólico de folhas foi submetido a uma partição líquido-líquido. As massas utilizadas para fracionamentos posteriores das fases podem ser visualizadas na tabela 6.

**Tabela 6:** Visão geral das massas obtidas pela partição do extrato metanólico das folhas de *Duroia longiflora*, mostrando a massa inicial obtida de cada fase, o rendimento em relação à massa do extrato.

Fases	Massa inicial (g)	Rendimento em relação à massa do extrato bruto (10 g) (%)	Massa usada para o fracionamento (g)
Fase DCM	1,0025	10,025	1,0025
Fase AcOEt	7,9000	79	1
Fase hidroalcoólica	1,0975	10,975	1,0975

### 5.3.1 Análise e fracionamento das fases da partição líquido-líquido

Todas as fases foram analisadas por CCDC e RMN, no geral as fases apresentaram indícios de terpenos, substâncias aromáticas e alcaloides: cloreto férrico, iodo, anisaldeído sulfúrico, sulfato cérico e reagente de Dragendorff. As fases DCM e AcOEt se mostram mais promissoras e por isso foram fracionadas.

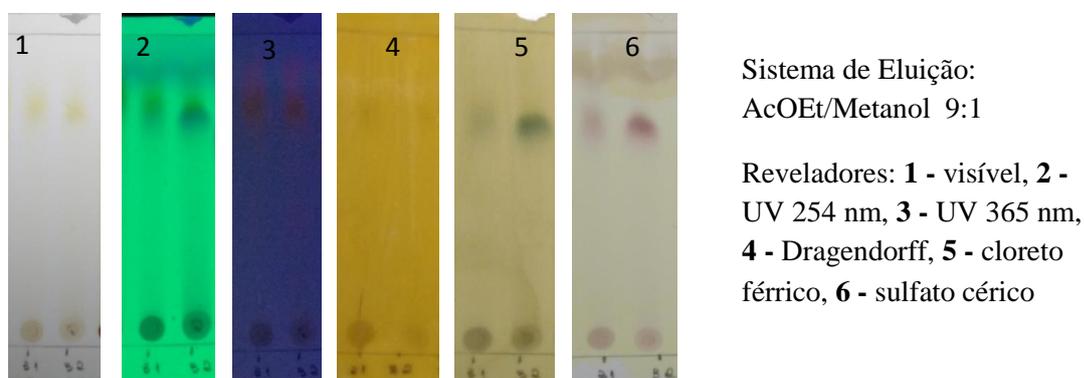
O fracionamento da fase DCM gerou 64 frações, que foram analisadas por CCDC e as frações mais interessantes foram reunidas e refracionadas: 2-4, 5-12, 13-20, 21-60. As frações originadas dos refracionamentos também foram analisadas por CCDC e as mais interessantes foram reunidas e mandadas para análise em RMN.

Por fim, foram isoladas cinco substâncias: FDCM. C10. F31-32 (biflavonoide), FDCM. C15-f7 ( $\beta$ -sitosterol), FDCM. C17. F11-12. S4 (alcaloide), FDCM. C17. F13-14. S3 (alcaloide), FDCM. C20. F2 (alcaloide). Até o momento do fechamento deste trabalho só foi possível realizar a identificação estrutural do biflavonoide (FDCM. C10. f31-32).

Ainda deverão ser fracionadas: FDCM. C11. Fr3 (mistura alcaloides), FDCM. C12. Fr5-8 (mistura alcaloides), FDCM. C13. Fr7-16 (mistura alcaloides), FDCM. C19. F1-2. S5 (mistura terpenos), FDCM. C19. F1-2. S6 (mistura terpenos), FDCM. C10. F15-16 (mistura alcaloides).

### 5.3.1.1 Isolamento e Elucidação Estrutural do FDCM. C10. f 31-32

A fração FDCM. C10. Fr31-32 com 18 mg, originária do refracionamento da fração 5-12 da coluna 10 da fase DCM, quando analisada por CCDC apresentou uma mancha majoritária amarelo-esverdeada em 254 nm. No anisaldeído e sulfato cérico observou-se que a substância era oxidável, no cloreto férrico indicou a presença de substância aromática e não revelou com Dragendorff (figura 13).



**Figura 13:** Análise em CCDC das frações FDCM. C10. Fr31 e 32 (antes da reunião), do extrato metanólico das folhas.

A identificação da substância foi realizada por meio da análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$ , de  $^{13}\text{C}$  e os bidimensionais de HSQC, HMBC e COSY e J-res e de espectrometria de massas de alta resolução. O espectro de massas de alta resolução mostrou a presença de um íon *quasi*-molecular  $[\text{M}+1]$  de  $m/z$  em 577,1330 U condizente com a fórmula molecular  $\text{C}_{30}\text{H}_{24}\text{O}_{12}$ , a única fórmula molecular sem nitrogênios da lista fornecida pelo equipamento, pois não havia revelado para alcaloides. A fórmula molecular indicou se tratar de um biflavonoide. O índice de deficiência de hidrogênio mostrou a presença de 19 insaturações/ciclos. Através da análise do espectro de hidrogênio, observou-se na região dos aromáticos a presença de dois dubletos em 5,98 ppm ( $J= 2,5$  Hz) e 6,7 ppm ( $J= 2,5$  Hz), caracterizando os hidrogênios dos carbonos C6 e C8 do anel A de um flavonoide. Também foi possível observar um singlete em 6,15 ppm caracterizando um hidrogênio no átomo de carbono C6, onde o C8 encontra-se substituído no anel A de um flavonoide. Observou-se ainda dois dubletos em 6,85 ppm  $d$  ( $J= 8,29$  Hz) e 6,86 ppm  $d$  ( $J= 8,10$  Hz), assim como dois duplos dubletos em 7,05 ppm  $dd$  ( $J=8,10; 8,4; 2,05$  Hz), e 7,07 ppm  $dd$  ( $J= 8,29; 2,19$  Hz), além de dois dubletos em 7,20 ppm  $d$  ( $J= 2,14$  Hz) e 7,34 ppm  $d$  ( $J= 2,05$ ). Esses dados permitiram afirmar a presença de dois flavonoides com anéis A, B e C garantindo uma estrutura de um biflavonoide.

Através do espectro de HSQC foram visualizados dois sinais em 4,15 ppm  $d$  ( $J= 3,7$  Hz) e 4,30 ppm  $d$  ( $J=3,7$  Hz) acoplando com os carbonos em 67,56 e 28,76 ppm com base nos espectros. A presença do átomo de um carbono em 67,56 ppm demonstraram a presença de um heteroátomo ligado a esse carbono e ao carbono em 28,76 ppm permitindo dizer que se tratava de um carbono terciário na posição 4 do flavonoide, visto que não houve sinais na região entre 11 e 14 ppm (característicos de hidrogênios da hidroxila em C5 acoplando com o carbono em C4). Sinais em 2,98 ppm  $dd$  ( $J=17,7; 4,6$  Hz) e 2,83 ppm  $dd$  ( $J= 17,7; 2,3$  Hz), acoplando com o carbono 30,27 ppm enquanto o sinal em 4,33 ppm acoplando com o carbono 65,96 e 4,97 ppm acoplava com o carbono 81,96 ppm, mostraram uma ausência de carbonila no outro esqueleto de flavonoide, onde os carbonos em 30,27 ppm de um anel C do flavonoide.

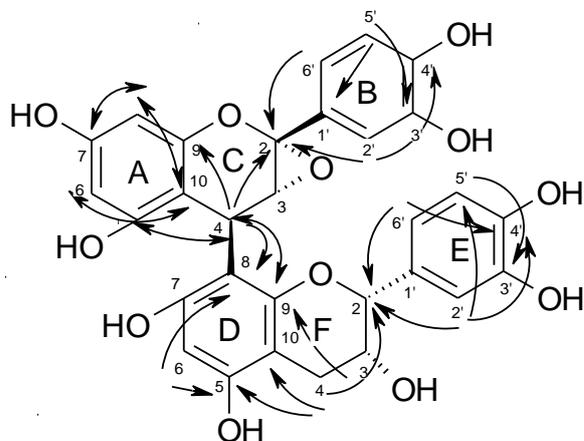
No espectro de COSY foi possível observar o acoplamento dos hidrogênios 7,07 ppm com o 6,85 e 7,05 ppm como 6,86 ppm mostrando que os primeiros dois hidrogênios fazem parte do anel B de um dos esqueletos do flavonoide, enquanto os dois últimos faziam parte do outro anel B do segundo esqueleto. No espectro de HMBC os hidrogênios 6,07 e 4,30

acoplavam com o carbono 153,95, o mesmo em 4,30 também acoplava como o carbono em 99,01, carbono que acoplava também com hidrogênio em 7,07. Esses dados permitiram a conexão e fechamento de um dos esqueletos. O fechamento do outro esqueleto foi possível devido aos sinais 6,15 e 2,98 que acoplava com o carbono 151,85 e a hidrogênio em 4,97 que acoplava com os carbonos em 30,97(ligado ao hidrogênio 2,98 A) e 120,61 conectando-se aos anéis A, B e C do segundo esqueleto. A ligação dimerica foi dada pelo hidrogênio em 4,30 (hidrogênio ligado ao C4 do primeiro flavonoide) que acoplava com os carbonos C8 e C9 do anel a do segundo esqueleto.

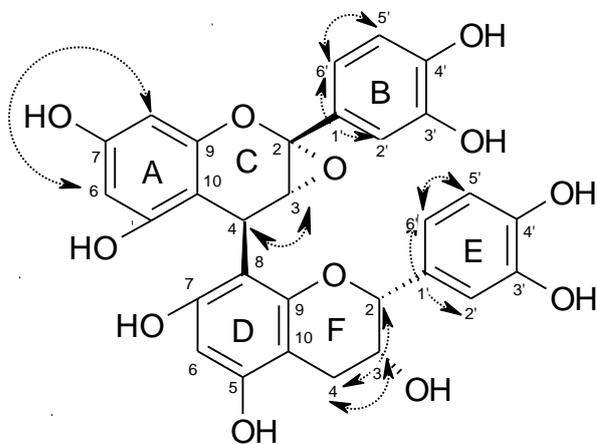
As principais correlações encontradas nos mapas de contorno HMBC e COSY estão mostradas nas figuras 14 e 15, que permitiram a identificação do biflavonoide como sendo o 2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ -epoxi-5,7,3',4'-tetrahydroxiflavan-(4 $\beta$ -8)-epicatequina. Os dados estão mostrados na Tabela 7.

**Tabela 7:** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  da substância 2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ -epoxy-5,7,3',4'-tetrahydroxyflavan-(4 $\beta$ -8)-epicatequina e comparação com a literatura Wang(2011).

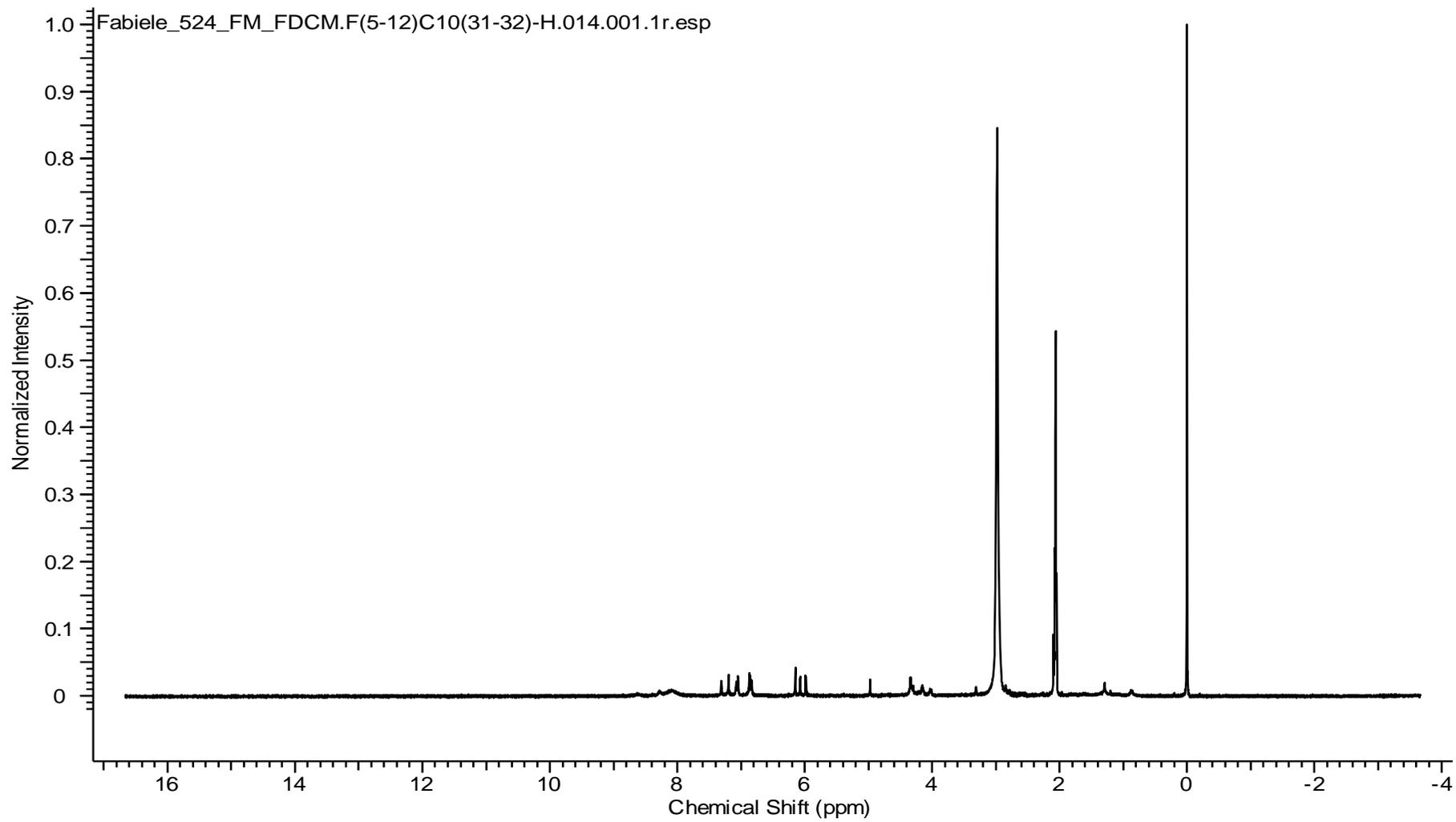
Posição	Observado (acetona- $d_6$ , 300 e 75 MHz)		Literatura (DMSO- $d_6$ , 500 e 125 MHz).	
	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
2C	-	99,91 (C)	-	98,9 (C)
3C	4,15 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 3,7 Hz)	67,56 (CH)	3,87 (1H, <i>sl</i> )	66,6 (CH)
4C	4,30 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 3,7 Hz)	28,76 (CH)	4,32 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 3,5 Hz)	28,2 (CH)
5A	-	157,94 (C)	-	156,5 (C)
6A	5,98 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2,5 Hz)	98,08 (CH)	5,93 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2,0 Hz)	96,9 (CH)
7A	-	153,95 (C)	-	157,0 (C)
8A	6,07 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2,5 Hz)	96,18 (CH)	5,89 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2,0 Hz)	95,0 (CH)
9A	-	156,90 (C)	-	153,3 (C)
10A	-	103,99 (C)	-	103,1 (C)
1'B	-	132,35 (C)	-	131,3 (C)
2'B	7,20 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2,4 Hz)	115,61 (CH)	7,01 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2,0 Hz)	115,2 (CH)
3'B	-	145,08 (C)	-	145,2 (C)
4'B	-	145,63 (C)	-	145,9 (C)
5'B	6,85 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8,4 Hz)	115,26 (CH)	6,77 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8,0 Hz)	115,4 (CH)
6'B	7,07 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 8,4; 2,4 Hz)	119,70 (CH)	6,87 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 8,0; 2,0 Hz)	118,3 (CH)
2F	4,97 (1H, <i>s</i> )	81,67 (CH)	4,83 (1H, <i>s</i> )	79,8 (CH)
3F	4,33 (1H, <i>m</i> )	65,96 (CH)	4,13 (1H, <i>s</i> )	64,9 (CH)
4F	2,98 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 17,7; 4,6 Hz) 2,83 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 17,7; 2,3 Hz)	30,27 (CH <sub>2</sub> )	2,80 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 16,0; 4,0 Hz) 2,57 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 16,0; 2,0 Hz)	29,8 (CH <sub>2</sub> )
5D	-	151,85 (C)	-	155,3 (C)
6D	6,15 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 1,0 Hz)	96,41 (CH)	6,01 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2,0 Hz)	95,0 (CH)
7D	-	156,13 (C)	-	150,8 (C)
8D	-	106,85 (C)	-	106,0 (C)
9D	-	151,71 (C)	-	151,6 (C)
10D	-	102,29 (C)	-	101,6 (C)
1'E	-	130,87 (C)	-	130,5 (C)
2'E	7,31 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2,4 Hz)	116,24 (CH)	7,08 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2,0 Hz)	115,2 (CH)
3'E	-	146,23 (C)	-	144,9 (C)
4'E	-	146,09 (C)	-	144,7 (C)
5'E	6,86 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8,4 Hz)	120,61 (CH)	6,75 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8,0 Hz)	115,5 (CH)



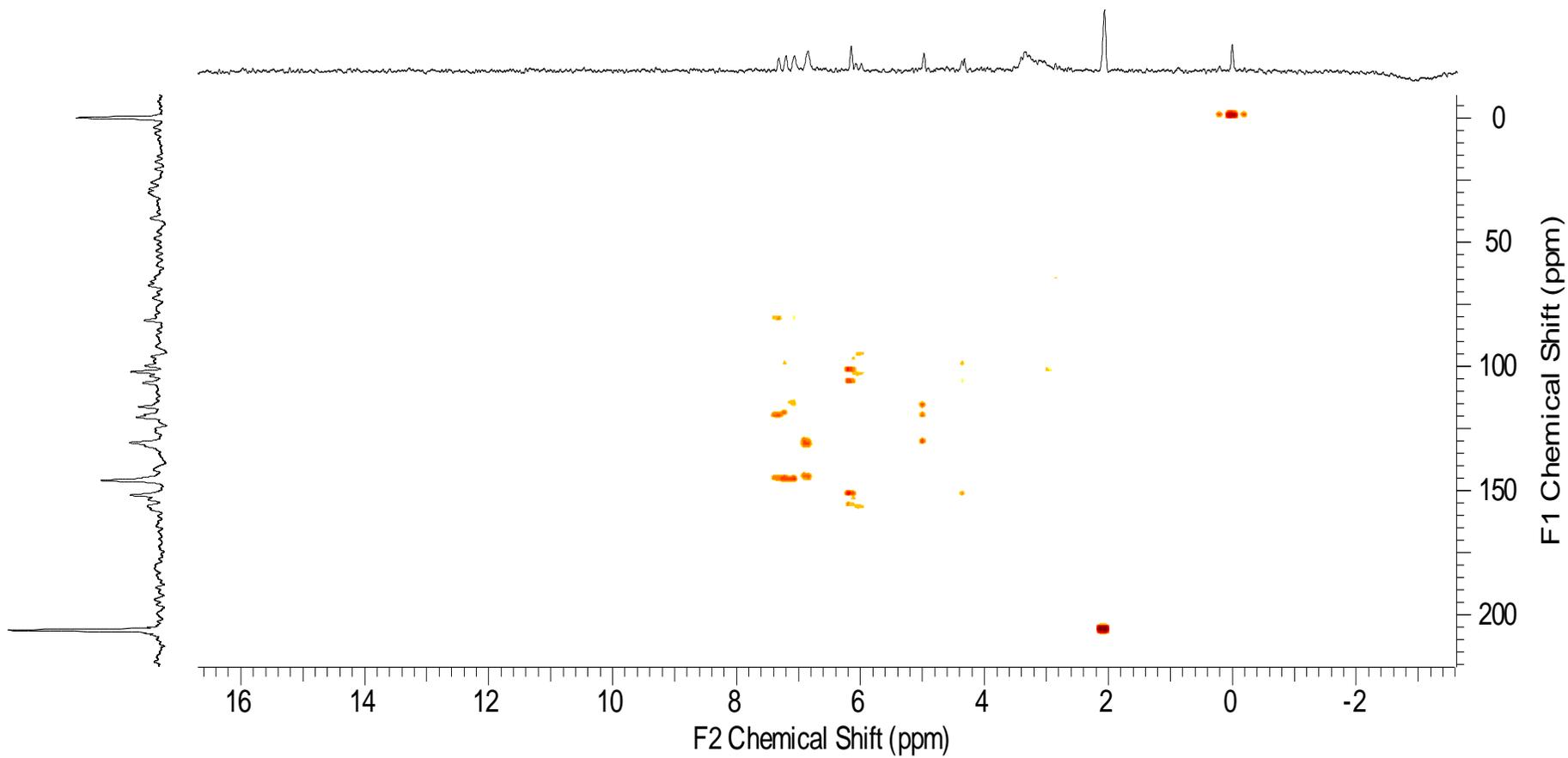
**Figura 14:** Principais correlações encontradas no mapa de contorno HMBC para a substância 2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ -epoxy-5,7,3',4'-tetrahydroxyflavan-(4 $\beta$ -8)-epicatequina.



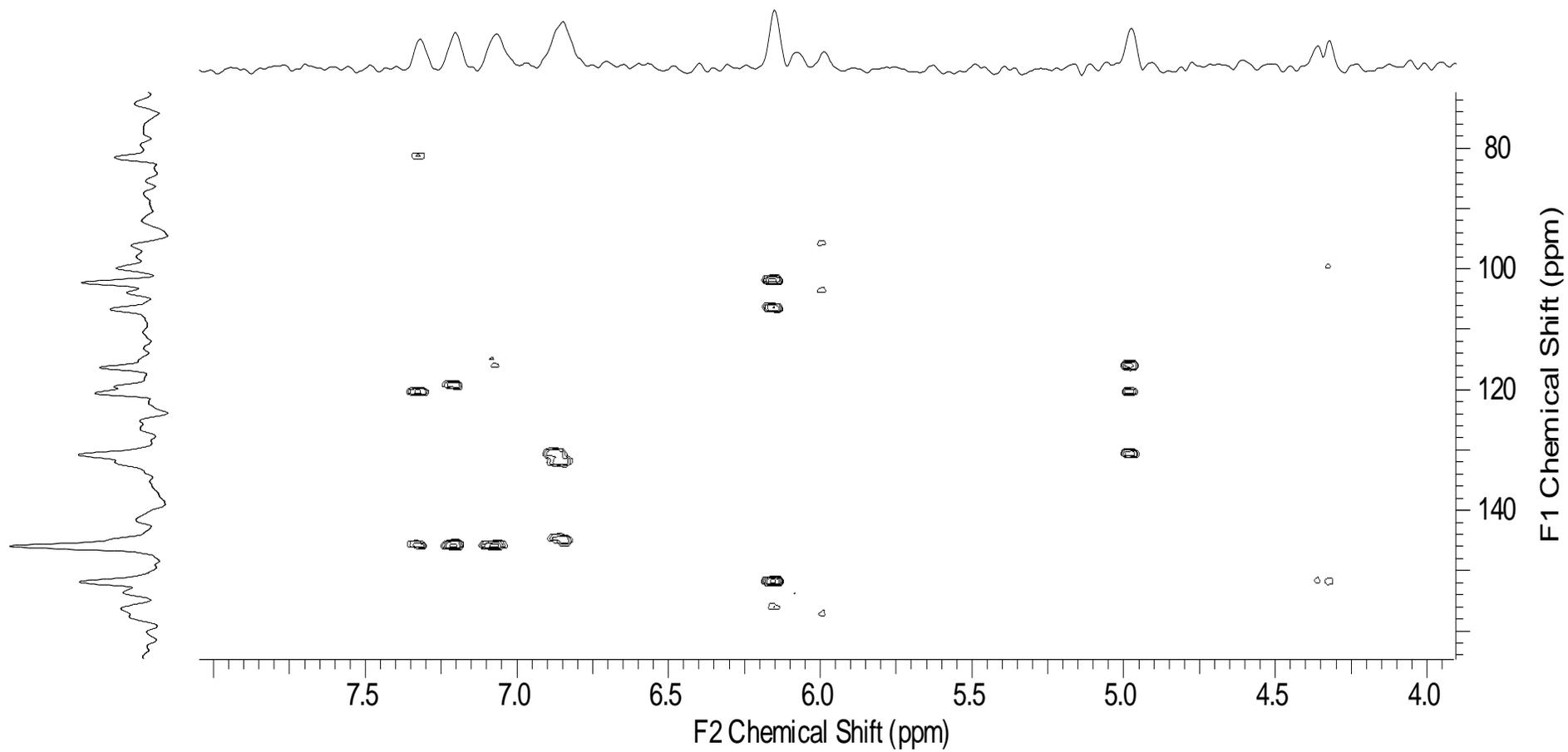
**Figura 15:** Principais correlações encontradas no mapa de contorno COSY para a substância 2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ -epoxy-5,7,3',4'-tetrahydroxyflavan-(4 $\beta$ -8)-epicatequina.



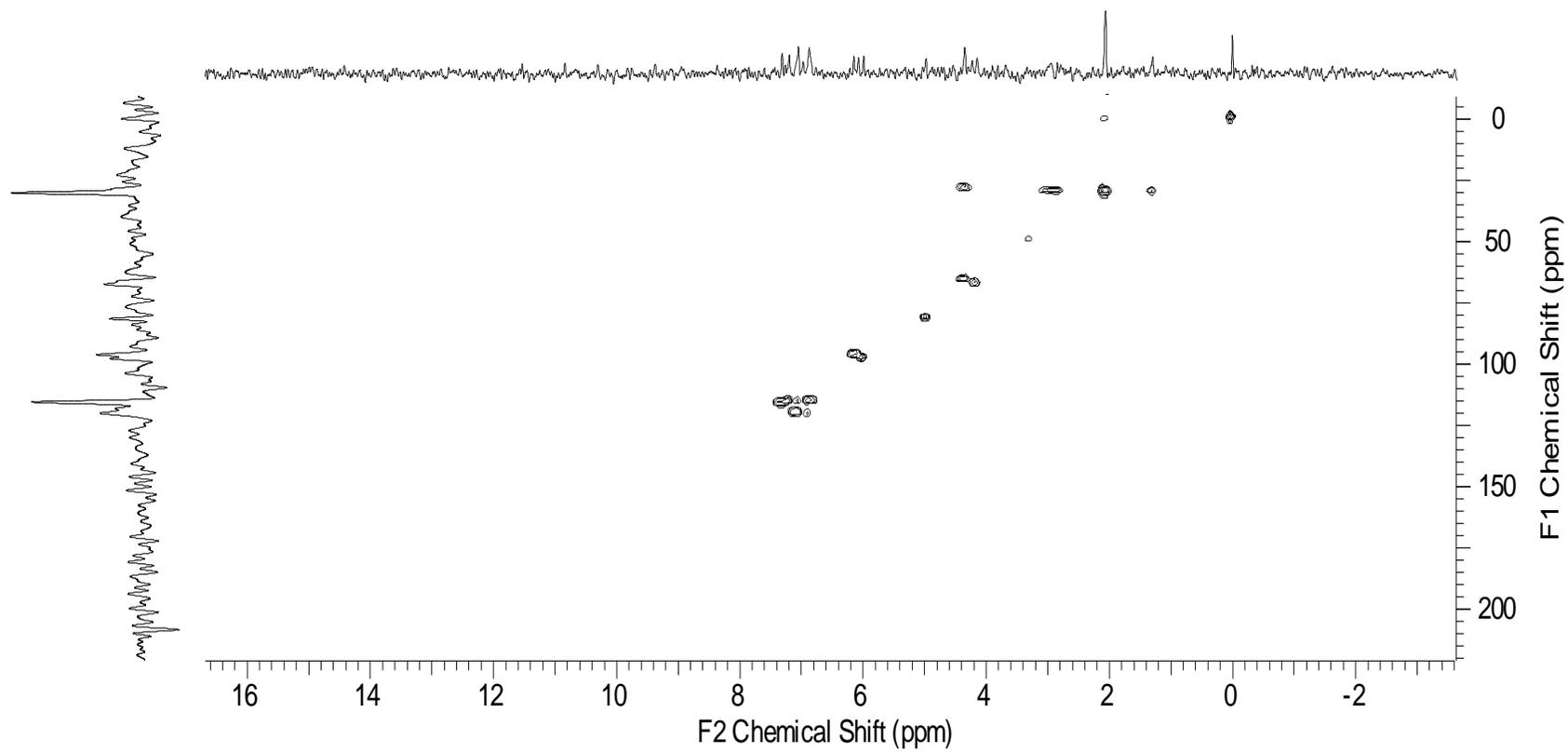
**Figura 16:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do biflavonoide, em acetona- $d_6$  (300 MHz).



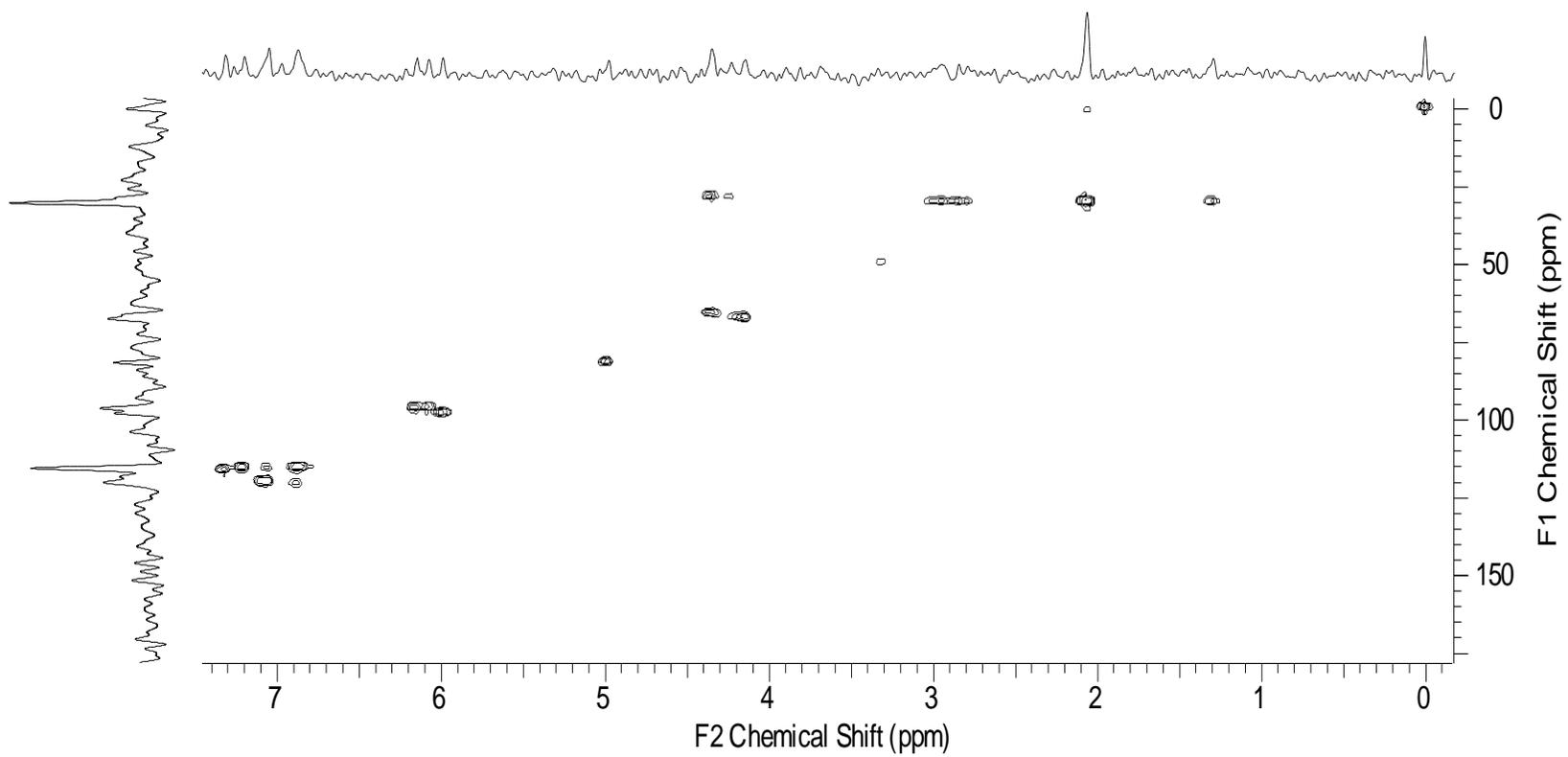
**Figura 17:** Mapa de contorno HMBC do biflavonoide, em acetona- $d_6$  (75 MHz).



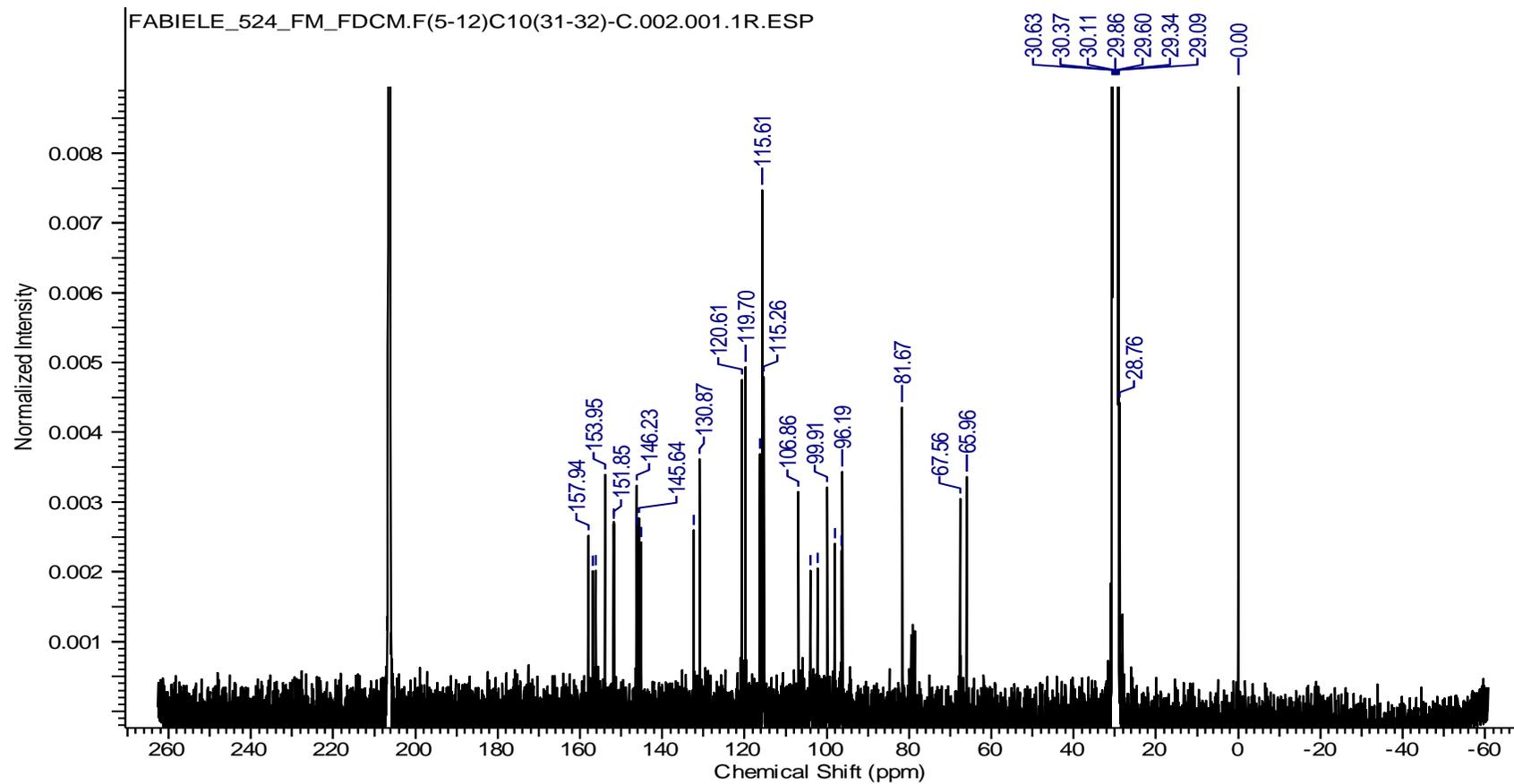
**Figura 18:** Expansão Mapa de contorno HMBC do biflavonoide, em acetona-*d*<sub>6</sub> (75 MHz).



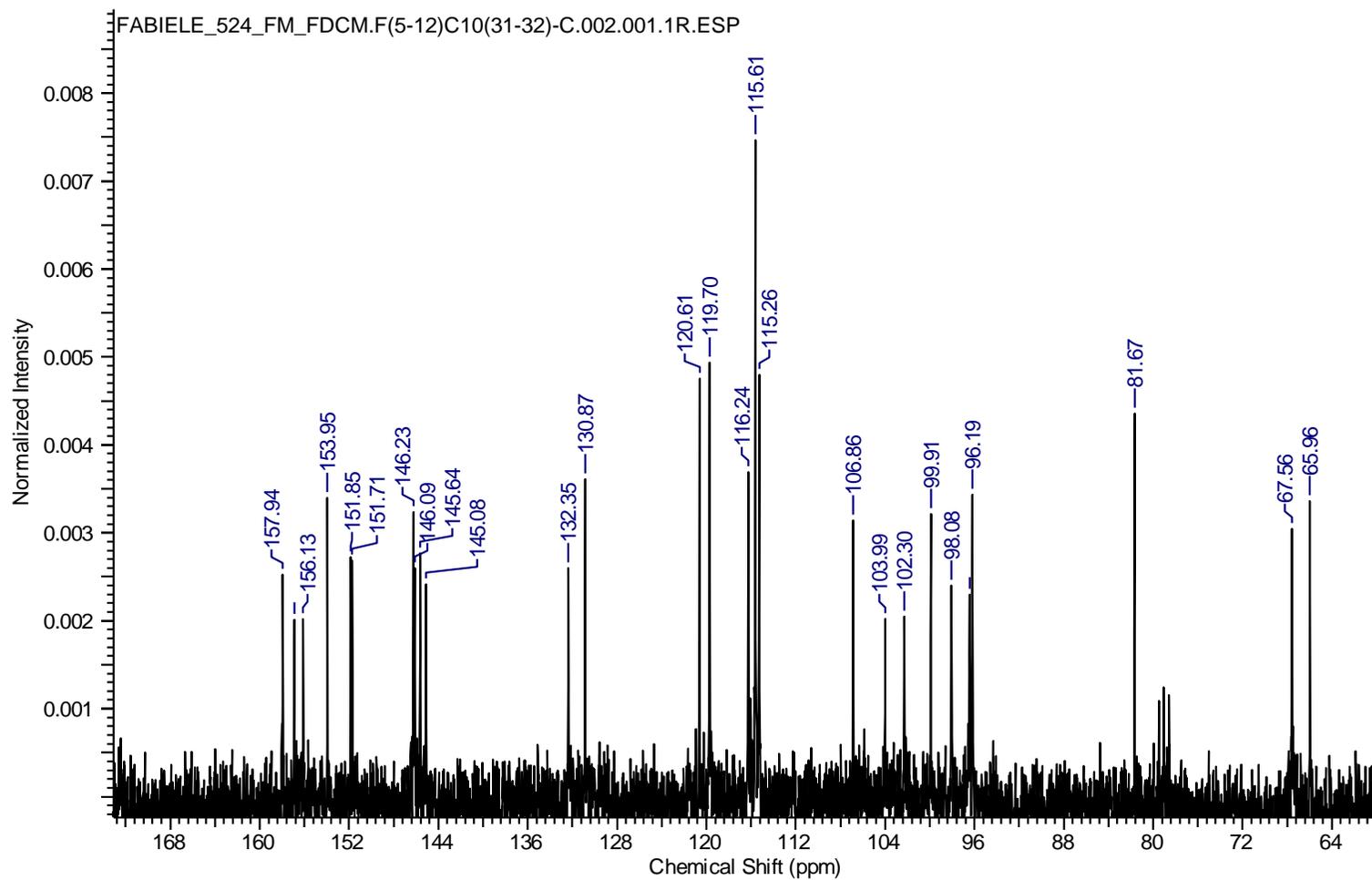
**Figura 19:** Mapa de contorno HSQC do biflavonoide, em acetona-*d*<sub>6</sub> (75 HMz).



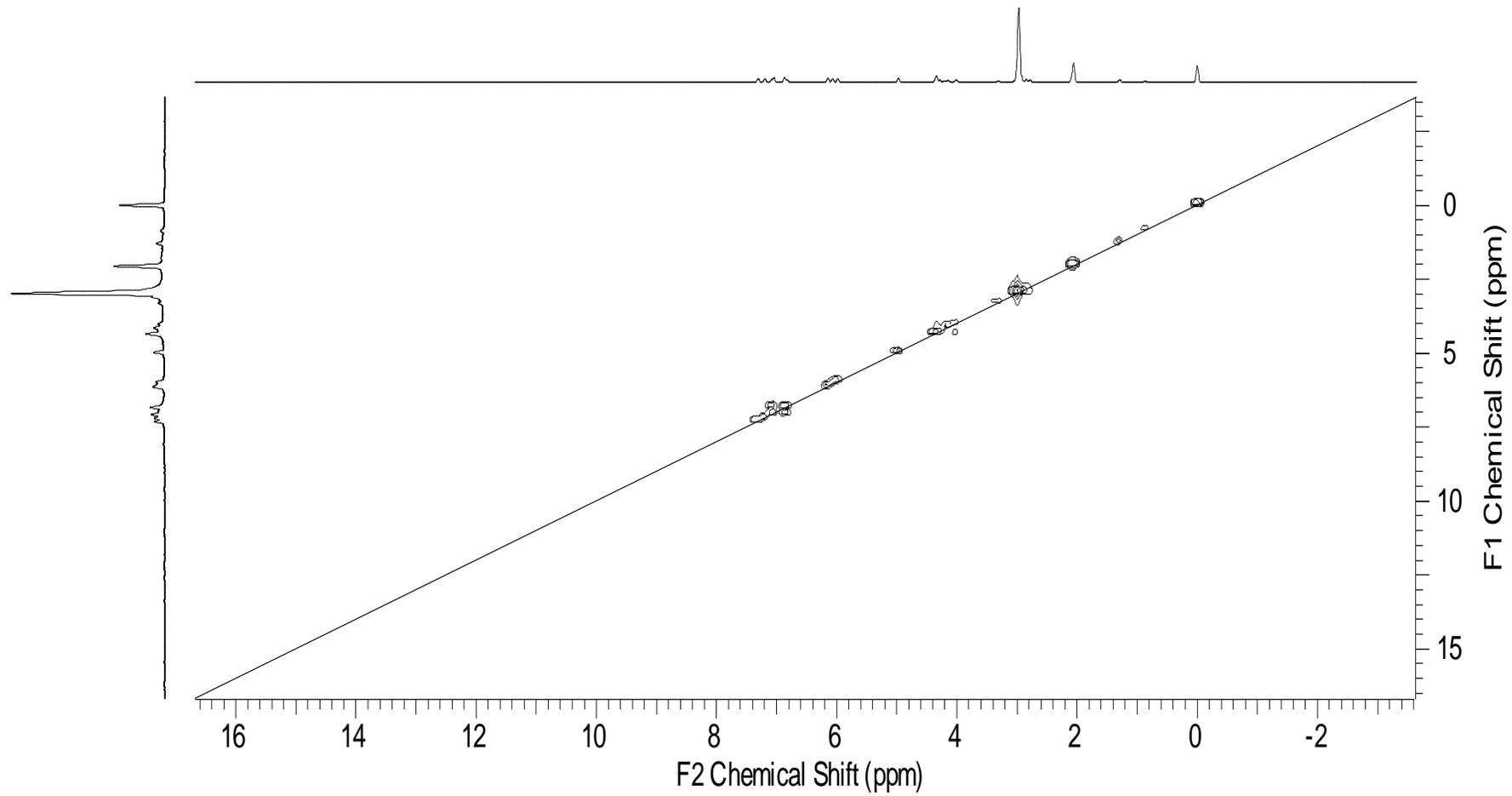
**Figura 20:** Expansão do Mapa de contorno HSQC do biflavonoide, em acetona-*d*<sub>6</sub> (75 HMz)



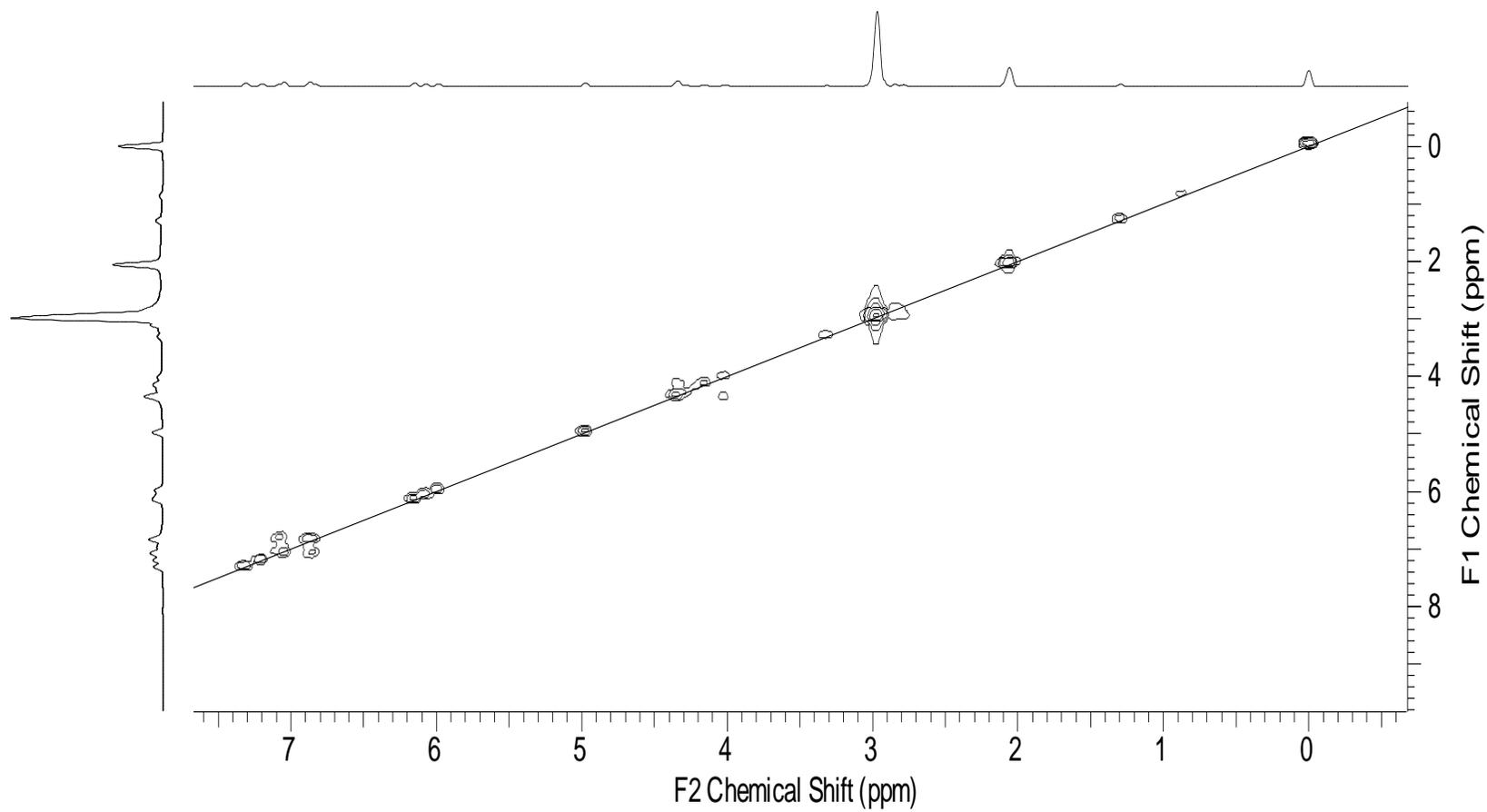
**Figura 21:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do biflavonoide, em acetona- $d_6$  (75 MHz).



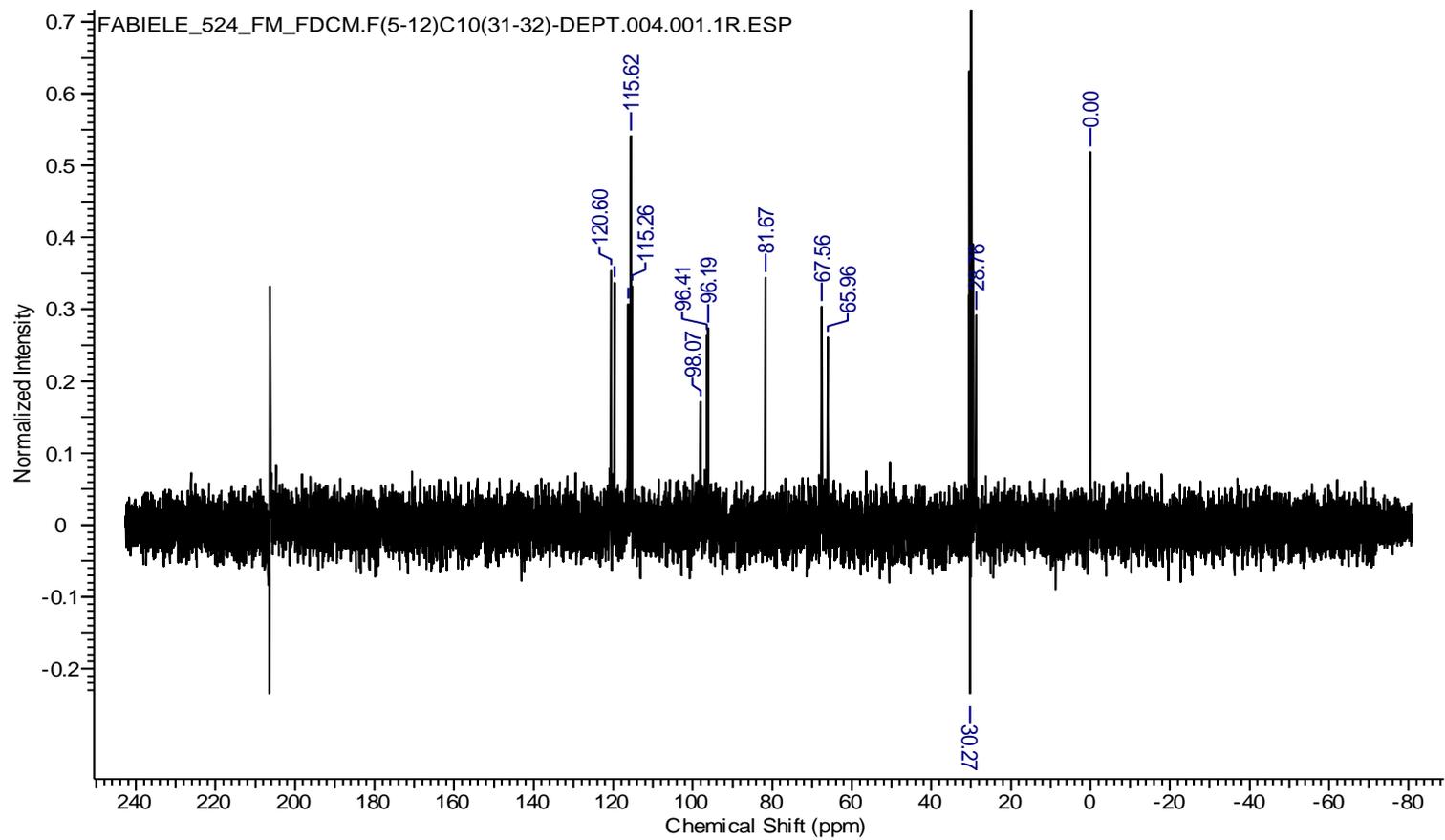
**Figura 22:** Expansão do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do biflavonoide, em acetona- $d_6$  (75 MHz).



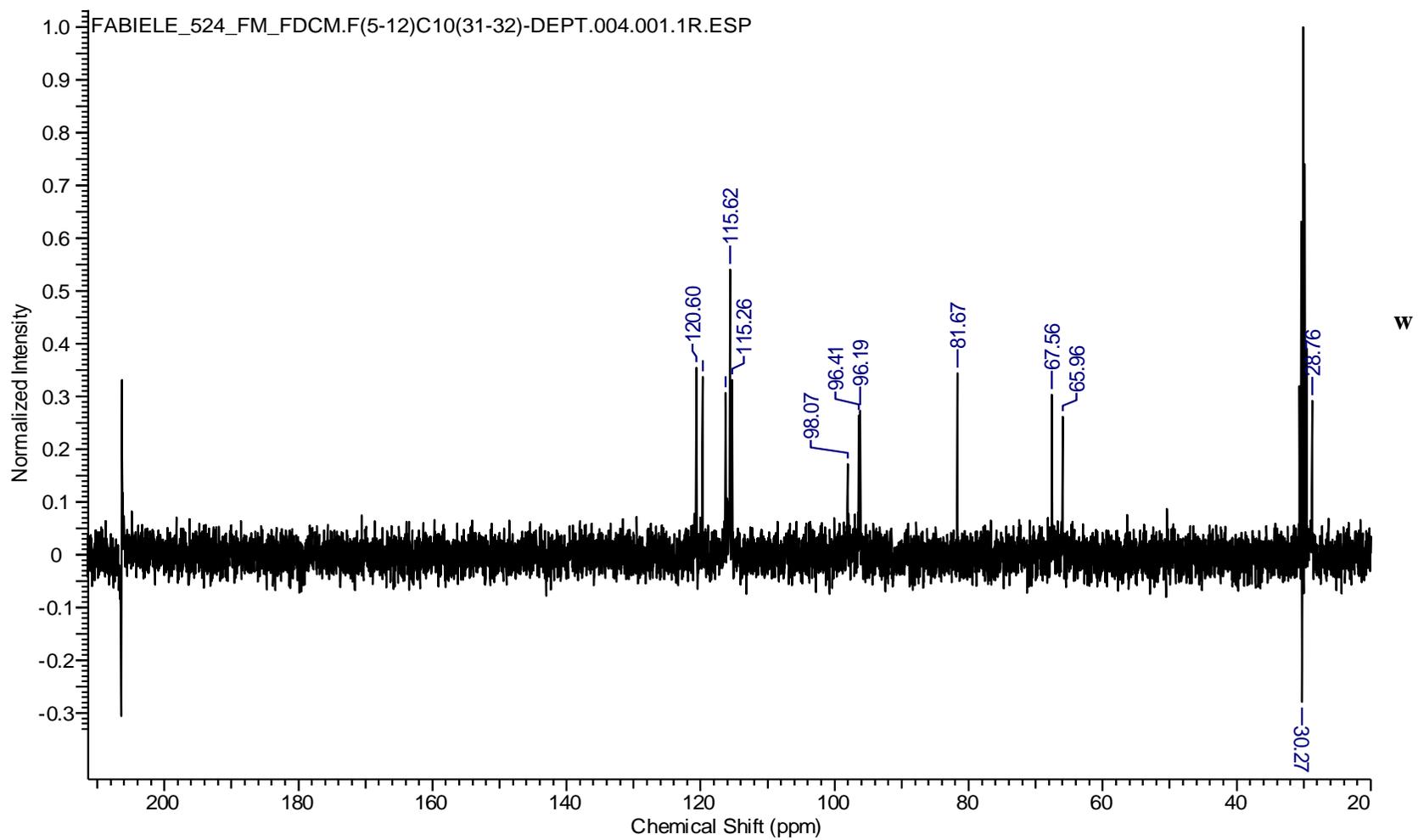
**Figura 23:** Mapa de contorno COSY do biflavonoide, em acetona- $d_6$  (300 MHz).



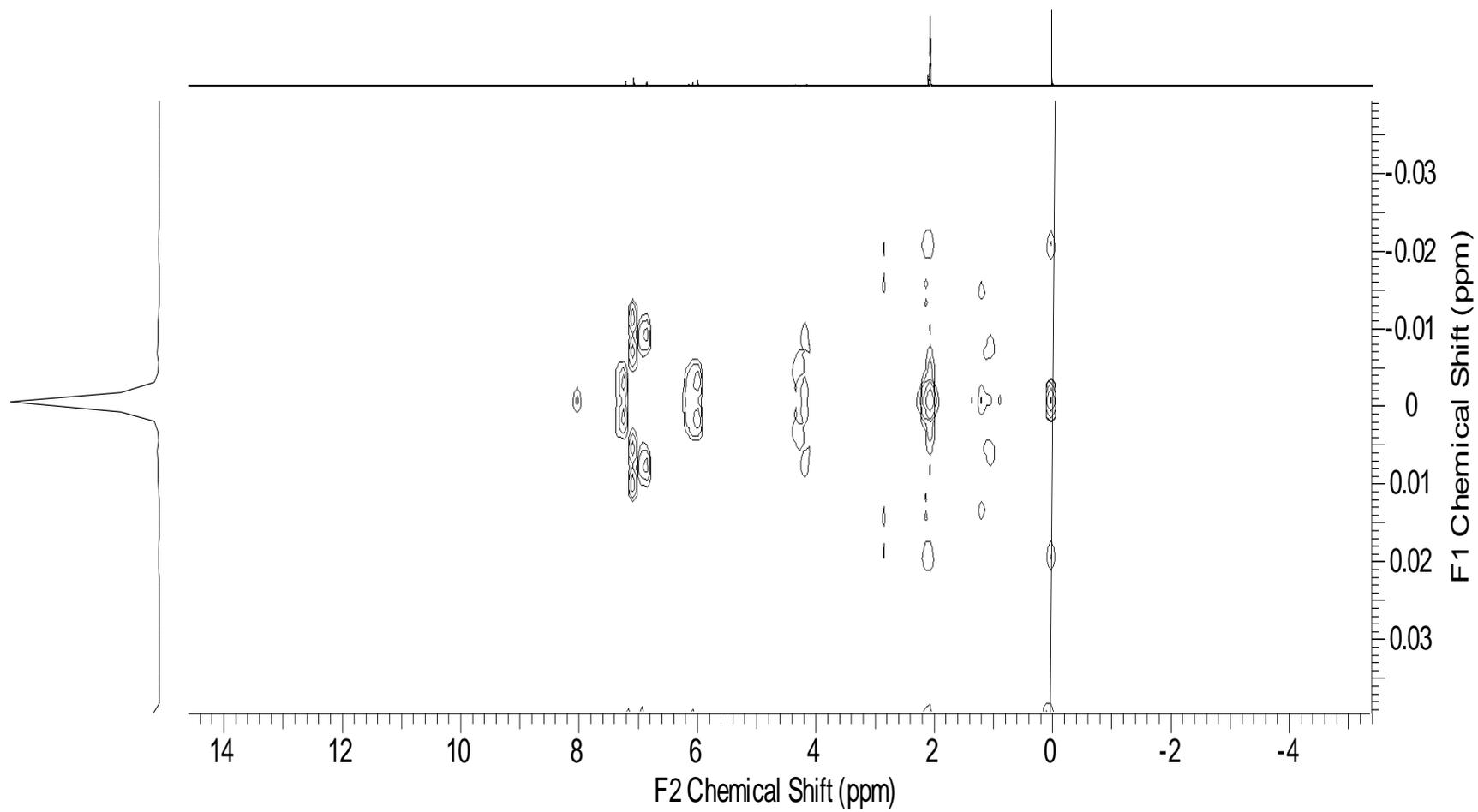
**Figura 24:** Expansão Mapa de contorno COSY do biflavonoide, em acetona-*d*<sub>6</sub> (300 MHz).



**Figura 25:** Espectro de RMN de DEPT 135° do biflavonoide, em acetona-*d*<sub>6</sub> (75 MHz).



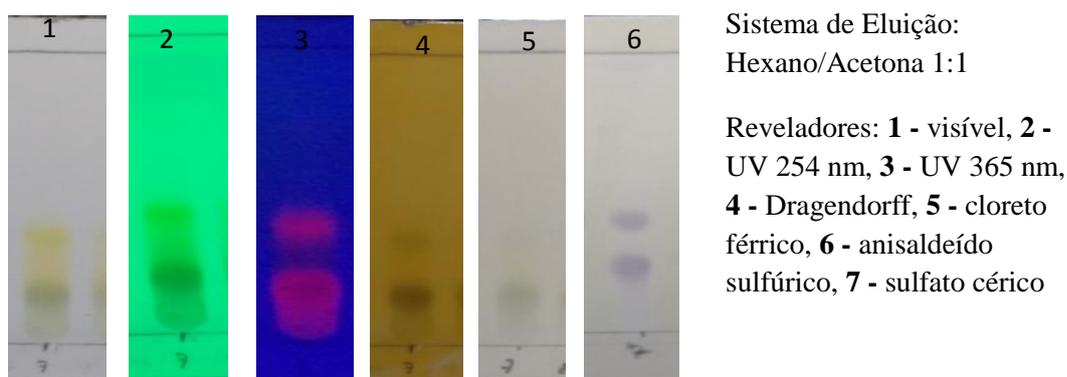
**Figura 26:** Expansão do Espectro de RMN de DEPT 135° do biflavonoide, em acetona- $d_6$  (75 MHz).



**Figura 27:** Espectro de RMN de J-RES do biflavonoide, em acetona- $d_6$  (500 MHz).

### 5.2.1.2 Análise em CCDC e caracterização da FDCM. C15-f7

A fração FDCM. C15. Fr7, originária do refractionamento da fração 3-4 da coluna 13 da fase DCM, quando analisada por CCDC apresentou mancha amarela e laranja típica de clorofila que mascara a fluorescência presente na fração nos comprimentos UV 365 nm, no UV 254 nm típicos de esteroides e no anisaldeído sulfúrico e sulfato cérico indicou a presença de substâncias terpênicas, no cloreto férrico e reagente de Dragendorff não foi possível visualizar nenhum indício de alcaloides ou composto fenólico, porém quando analisada por RMN, foi possível observar a presença de dois constituintes sendo o  $\beta$ -sitosterol o majoritário e o minoritário característico de terpenos (Figuras 28).



**Figura 28:** Análise em CCDC das Frações FDCM C15. Fr7, do extrato metanólico das folhas.

### 5.2.1.3 Substâncias em processo de caracterização e elucidação

As frações. C17. Fr11-12(S3), C17. Fr11-12(S4), C20. F2, todas as frações foram originárias da fase diclorometânica do extrato metanol de folhas, foram analisadas por CCDC com auxílio de métodos físicos como: UV 254 e UV 365 nm e químicos: usando reveladores como: anisaldeído sulfúrico, Dragendorff, sulfato cérico, cloreto férrico, porém não sendo possível visualizar indicio de qualquer classe químicas devido a presença de clorofila, mascarando as substâncias, com base nas informações obtidas com fracionamentos anteriores, acreditava que se tratava de um flavonoide, pois quando foram analisadas por CCDC revelaram manchas escuras e esverdeadas característicos de flavonoides, as três frações foram analisada por RMN, onde através do espectro de  $^1\text{H}$  foi possível observar presença de sinais entre 11 até 9 ppm, para ambas frações, indicando que se tratava de alcaloides, através de análises de mono e bidimensionais e LC-massas está sendo realizadas a elucidação estrutural das frações. Abaixo segue a tabela 9 com as especificações da cada fração.

**Tabela 9:** Visão geral dos processos de identificação das substâncias

Amostra	Massa	CCDC	RMN	Classe química
<b>C17. F11-12(3)</b>	6 mg	Não revelou	Sinais entre 9,8 e 6,5 ppm	Alcaloides
<b>C17. F13-14(4)</b>	26 mg	Não revelou	Sinais entre 11 e 6,2 ppm	Alcaloide
<b>C20. F 2</b>	53 mg	Não revelou	Sinais entre 11,5 e 6 ppm	Alcaloide indólico

### 5.2.1.4 Substâncias em processo de isolamento e purificação.

As frações: C10. F 15-16, C 11. F 3, C12.F 5-8, C13.F 7-16, C17 1-2 (S5), C19. F 1-2 (S6), todas as frações foram originária da fase diclorometanica do extrato metanol de folhas, foram analisada por CCDC com auxílio de métodos físicos como: UV 254nm e UV 365 nm e químicos: usando reveladores como: anisaldeído sulfúrico, Dragendorff, sulfato cérico, cloreto férrico, na investigação de substâncias terpênicas, flavonoides e alcaloides, devido à pequena quantidade de massa destas frações, onde algumas estão

sendo submetidos processos de separação por cromatografia em camada delgada comparativa preparativa (CCDCP), outras frações estão processo de purificação por HPLC, e ainda existem frações que estão sendo analisadas por técnicas de mono e bidimensionais por RMN, para futuras elucidções. Abaixo segue a tabela 10 com as especificações de cada substância e processo que se encontra.

**Tabela 10:** Visão geral dos processos de isolamento e purificação das substâncias.

<b>Amostra</b>	<b>Massa</b>	<b>CCDC</b>	<b>RMN</b>	<b>Classe química</b>
<b>C10. F 15-16</b>	41 mg	Não revelou	Sinais entre 1 e 8 ppm	Mistura de alcaloides
<b>C 11. F 3</b>	26 mg	Não revelou	Sinais entre 11 e 8 ppm	Alcaloide
<b>C12. F 5-8</b>	76 mg	Revelou manchas verdes escuras intensas	Sinais entre 11 e 9,5 ppm	Flavonoide
<b>C13. F 7-16</b>	24 mg	Revelou manchas verdes escuras pouco intensas	Sinais entre 7 e 4 ppm	Flavonoide
<b>C17 11-12 (S4)</b>	266 mg	Não revelou	Sinais entre 9,5 e 7,5 ppm	Alcaloide
<b>C19. F 1-2 (S6)</b>	78 mg	Revelou manchas verdes escuras intensas	Sinais entre 6,5 e 1 ppm	Mistura de terpenos

## 5.2 Estudos Histoquímicos

### 5.2.1 Metabólitos Primários

Foram detectados grãos de amido nas secções transversais da nervura central das folhas de *Duroia longiflora*, quando corados com grãos de amido foi evidenciada no xilema como elemento reserva (Fig.30 A e B). A presença de lipídios foi evidenciada na epiderme (Fig. 30 D), e nos tricomas glandulares tectores no ápice como conteúdo lipofílico (Fig. 30 C). A presença de proteínas foi evidenciada no floema (Fig. 30 E), como conteúdo da parede celular, no colênquima como constituinte da parede celular, no parênquima paliçádico com elemento de reserva (Fig. 30 F).

### 5.2.2 Metabólitos Secundários

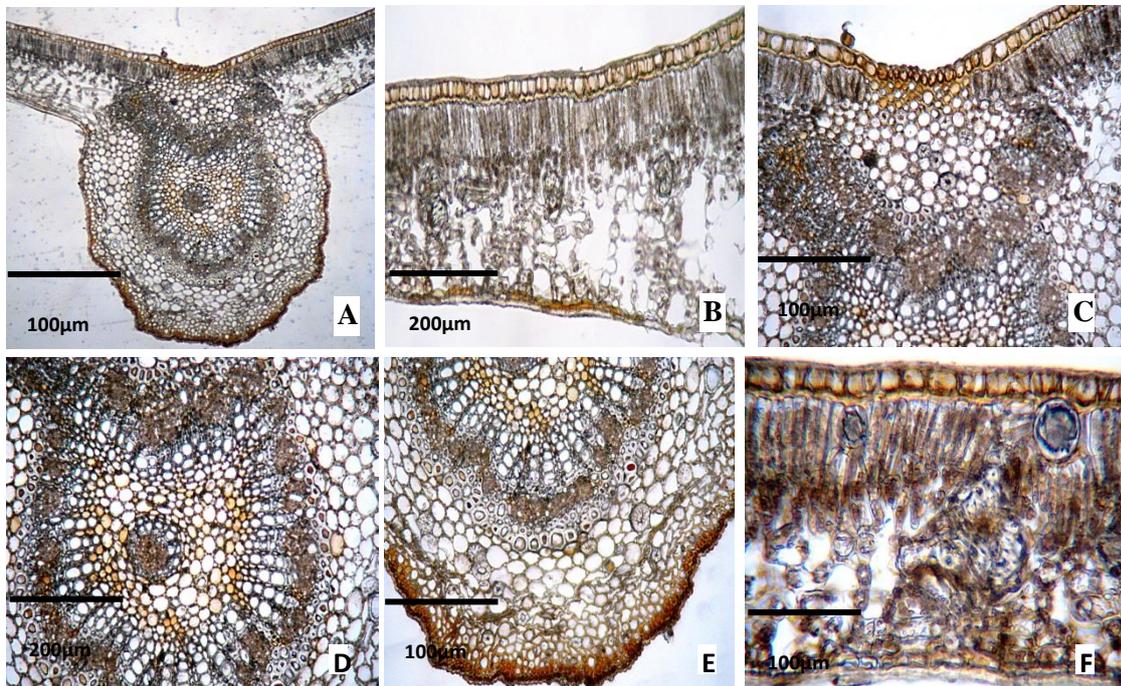
A presença de alcaloides foi evidenciada como constituinte da parede celular, nas secções da nervura central das folhas de *Duroia longiflora* (Fig. 31A). Também foi possível observar a presença de alcaloides colênquima, floema, alguns idioblastos, no córtex interno e no parênquima interno, no mesofilo os alcaloides estão presentes como conteúdo celular da epiderme, abaxial e axial e menos evidente no parênquima lacunoso, na parede interclinal e periclinal do parênquima paliçádico superior (Fig. 31B, C e D).

No geral, os alcaloides evidenciados estão presentes em sua maioria nas regiões estruturais do colênquima, floema e paredes periclinais.

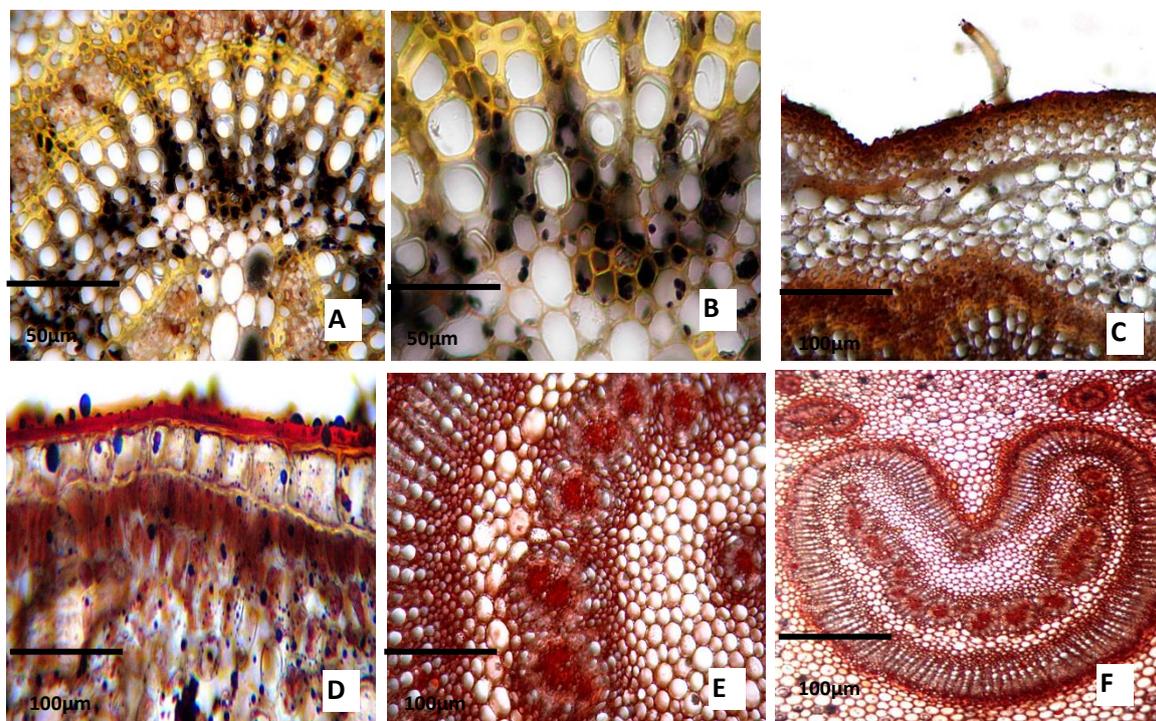
Os testes histoquímicos revelaram substâncias fenólicas, após reação com cloreto férrico e dicromato de potássio foi evidenciada na região cortical, no colênquima e parênquima, dentro das esclereides e no floema (Fig. 31E, F). Na parede celular. (Fig. 31H), no conteúdo celular da epiderme e no tricomas secretor (Fig. 31 G). No geral a presença de substâncias fenólicas abrange região cortical, o colênquima, parênquima, esclereides, e tricomas.

A presença de taninos foi evidenciada somente na epiderme, contudo algumas células do colênquima (Fig. 31 I), também evidenciaram a presença de taninos assim como os tricomas fazendo parte do seu conteúdo, na região subepidérmica e no floema

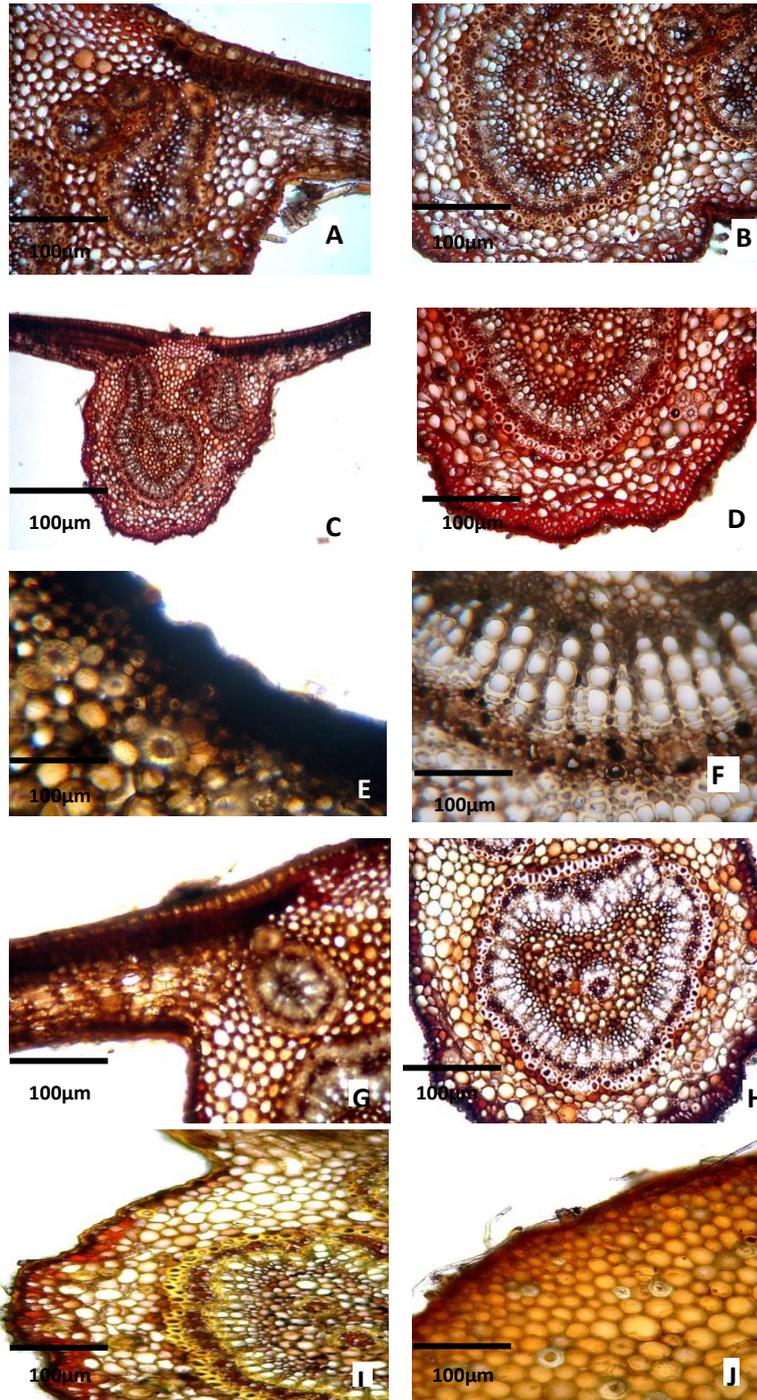
restrito a borda. Os taninos estão restritos a epiderme e na parede colênquima e floema e tricomas (Fig. 31 J).



**Figura 29:** Secções transversais da nervura central das folhas de *D. longiflora* sem coloração (controle)



**Figura 30:** Secções transversais das folhas *D. longiflora*. A - grãos de amido no xilema, B - grãos de amido no xilema, C - lipídios no tricomas, D - lipídios na epiderme, E - proteínas no floema, F - proteínas nas paredes celulares e como elemento de reserva.



**Figura 31:** Secções transversais das folhas de *D.longiflora*. Os alcaloides localizados na parede celular, nervura central, floema, idioblastos, colênquima e parênquima, B - alcaloides localizados na parede interclinal e periclinal, floema, idioblastos, C - alcaloides localizados na região cortical, esclereides, D - presença de alcaloides córtex da medula, E - a presença de compostos fenólicos nas esclereides, F - presença de compostos fenólicos foi observada na região cortical colênquima e parênquima, G - a presença de substâncias fenólicas foi localizada na região secretoras do tricomas, H - a presença de substâncias fenólicas foi localizada parede

celular do colênquima, no conteúdo celular da epiderme, I - a presença de taninos foi evidenciada na parede celular, floema, J - a presença de taninos foi evidenciada nos tricomas.

Através dos estudos histoquímicos observou-se a presença de poucos grãos de amidos e substâncias lipídicas e proteicas, que difere dos estudos realizados por Zini (2016), onde não foi evidenciada a presença de lipídios e proteínas, quanto a substâncias de origem secundária, substâncias fenólicas foram evidenciadas igualmente aos estudos com as espécies de rubiáceas, outras substâncias evidenciadas nesta espécie foram a presença de alcaloides e taninos. Mostrando que espécies de uma mesma família, mas de gênero diferentes podem produzir substâncias iguais, e outras não. Segundo Conceição (2016), as substâncias produzidas por ela aumentam a probabilidade de sobrevivência de uma espécie, pois são responsáveis por proteger as plantas dos patógenos diversos, essas substâncias uma vez isolada e comprovada sua atividade, com este fim, por exemplo, podem atuar como antibióticos, antifúngicos e antivirais.

## **5.3 Estudos Anatômicos**

### **5.3.1 Epiderme**

As folhas de *Duroia longiflora* são hipoestomáticas, pois apresentam estômatos somente na epiderme abaxial (Fig. 32 C). As células têm contornos sinuosos em ambas as faces adaxial e abaxial (Fig. 32 B). Observou-se a presença de tricomas tectores (Fig. 32 D), esparços na epiderme abaxial e sobre a nervura central da face abaxial e ao longo da borda da folha, na região de transição da epiderme adaxial e abaxial, seus estômatos são do tipo parasítico (Fig. 32 A).

O pecíolo é côncavo conexo com duas proeminências voltadas para a face adaxial, a epiderme é formada por células cúbicas e vários tricomas glandulares com paredes espessadas e cutículas inconspícuas (Fig. 32 G).

Ainda nas secções transversais é possível observar a presença de córtex interno com células do parênquima com vários espaços intercelulares (Fig. 32 F) e numerosas esclereides isoladas e agrupadas (Fig. 32 H). Abaixo, na região cortical uma proeminência localiza-se nos feixes vasculares com dois ou três de cada lado e um feixe principal central e arco fechado, com floema circundando o xilema e no centro dois

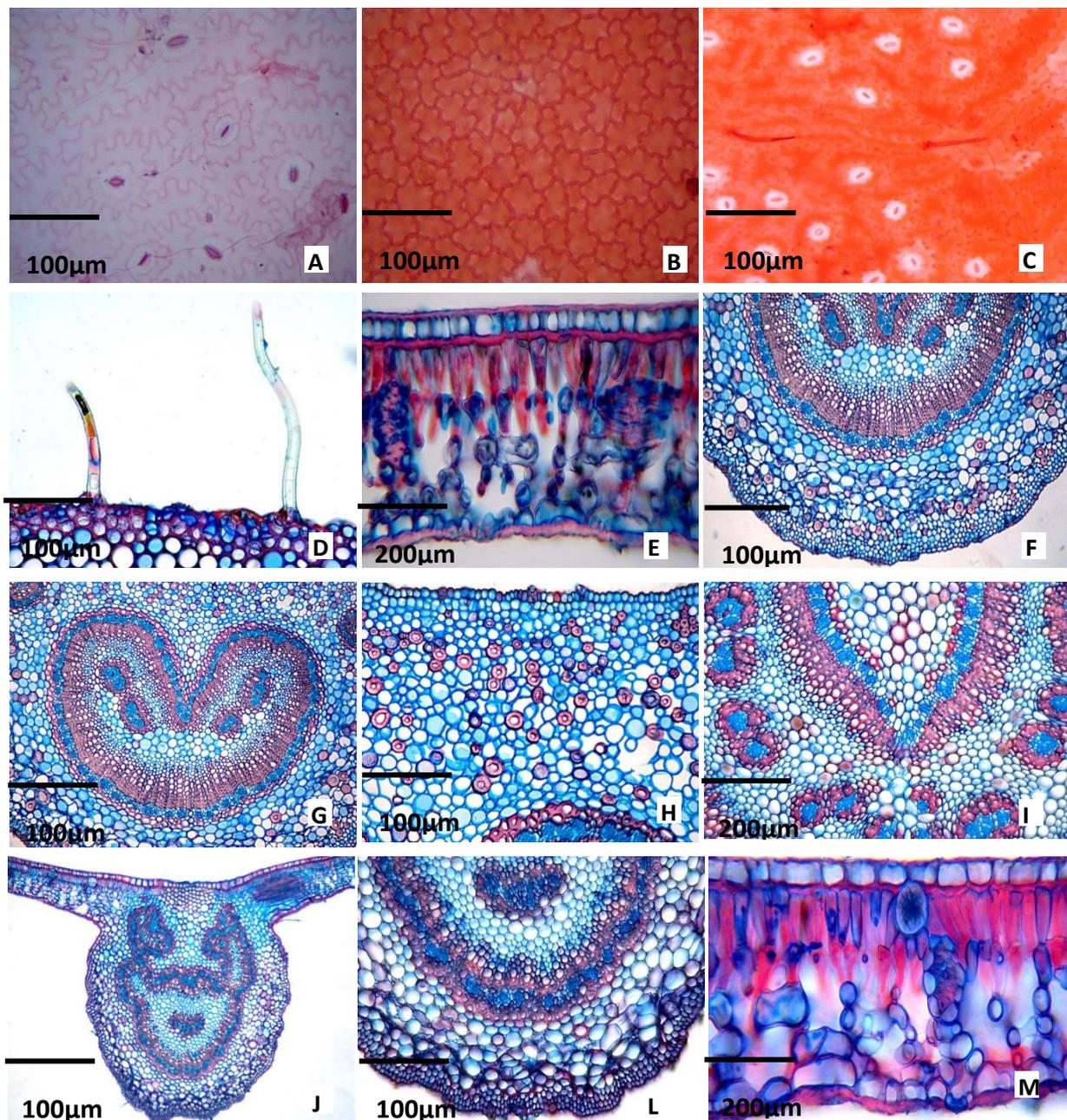
pares de feixe anfibasais por um ou duas filas de anéis de esclerênquimas e a medula reduzida formada de parênquima (Fig. 32 I).

### **5.3.2 Nervura Central**

Epiderme de células cúbicas, presença de tricomas tectores na face abaxial, colênquima angular, restrito à região subepidérmica adaxial e abaxial. Parênquima de duas a três camadas na região da face abaxial e parede espessada. Sistema vascular com dois feixes de estrutura no córtex adaxial com floema interrompido pelo anel esclerenquimático circundante (Fig. 32G), seguido de xilema e no centro da medula encontra-se o feixe anfibasal (Fig. 32 J).

### **5.3.3 Mesofilo**

As secções transversais das folhas de *Duroia longiflora*, mostram cutículas espessas, paredes periclinal, externa e interna espessa da face abaxial, com células de forma e tamanho irregular. Mesofilo dorsiventral com o parênquima paliçádico em uma única camada e algumas regiões duas camadas e parênquima lacunoso com cinco a seis camadas, com câmaras subestomáticas, apresentou também feixe vascular colateral (figura 32 M).



**Figura 32:** Secções transversais das folhas de *D. longiflora*: A - células hipostomáticas, B - células sinuosas, C - estômatos parasíticos, D - tricomas tectores, E - espaços intracelulares, F - córtex interno com células parenquimáticas externas, G - sistemas vascular com dois feixes, tricomas glandulares, colênquimas, pecíolo côncavo convexo, H - células cúbicas, esclereídes, I - feixes vasculares, floema, xilema, feixes anfibasais, feixe central, J - feixe principal em arco fechado pelo floema, L - anel esclerenquimático, xilema no centro da medula, feixe anfibasal, M - cutícula espessa, parede periclinal com forma irregular, mesófilo colateral com colênquima com duas ou seis camadas, feixes, bainha, filios perivasculares.

A espécie *Duroia longiflora* estudada apresentou características similares a de outras espécies de Rubiaceae apresentando folhas hipostomáticas, tricomas tectores, estômatos parasítico, mesófilo dorsiventral, epiderme adaxial, sistema vascular da

lamina foliar compostos por feixes colaterais lacunosos quando comparados com estudos realizados por Zini (2016), onde estudou características foliares de diversas espécies de rubiáceas. Ainda existem características mais específicas da espécie como parênquima paliçádico, idioblastos e tricomas com conteúdo, a nervura central com formato côncavo convexo, espaços intracelulares, feixo principal em arco fechado pelo floema, parede periclinal com forma irregular que possa ser específico do gênero *Duroia*, portanto um estudo com as características foliares do gênero viria a acrescentar mais conhecimento à família, bem como o gênero que apresenta similaridades entre as espécies.

## 5.4 Ensaios Biológicos

### 5.4.1 Atividade Antioxidante

Para a avaliação antioxidante dos extratos, estes foram testados quanto a sua capacidade de inibir o radical livre DPPH, na concentração inicial de 10 µg/mL, os resultados foram expressos em equivalência com o ácido ascórbico, e quanto mais próximo de 1, maior a capacidade antioxidante. Os resultados do ensaio da atividade antioxidante de todos os extratos de galhos e folhas estão indicados na tabela 11, com DPPH e na tabela 12 com Fe<sup>3+</sup>/Fenantrolina.

**Tabela 11- Resultados do teste de atividade dos extratos brutos de folhas e galhos de *Duroia longiflora* utilizando o método com DPPH, mostrando valores de absorvância, equivalência do ácido ascórbico (AA), equivalência das amostras e seus respectivos desvios padrão.**

Extrato	[DPPH]	[AA] <sub>eq</sub>	Equivalência (mg de extrato de ácido ascórbico)
Fo Hex	-0,007	0,066	115,552
Ga Hex	-0,006	0,074	117,102
Fo MeOH	0,250	2,087	2,404
Ga MeOH	0,388	3,164	1,599
Fo H <sub>2</sub> O	0,121	1,070	4,684

<b>Ga H<sub>2</sub>O</b>	0, 190	1, 611	3, 660
--------------------------	--------	--------	--------

\* Fo: folhas; Ga: galhos; Hex: hexano; MeOH: metanol; H<sub>2</sub>O: aquoso.

**Tabela 12- Resultados do teste de atividade dos extratos brutos de folhas e galhos de *Duroia longiflora* utilizando o método com Fe<sup>+3</sup>, mostrando valores de absorvância, equivalência do ácido ascórbico (AA), equivalência das amostras e seus respectivos desvios padrão.**

<b>Extrato</b>	<b>[Fe<sup>2+</sup>]</b>	<b>[AA]<sub>eq</sub></b>	<b>Equivalência (mg de extrato de ácido ascórbico)</b>
<b>Fo Hex</b>	0, 292	1, 041	5, 653
<b>Ga Hex</b>	0, 318	1, 089	4, 595
<b>Fo MeOH</b>	3, 788	7, 346	0, 735
<b>Ga MeOH</b>	3, 319	6, 501	0, 771
<b>Fo H<sub>2</sub>O</b>	0, 672	1, 727	2, 897
<b>Ga H<sub>2</sub>O</b>	1, 790	3, 744	1, 374

\* Fo: folhas; Ga: galhos; Hex: hexano; MeOH: metanol; H<sub>2</sub>O: aquoso.

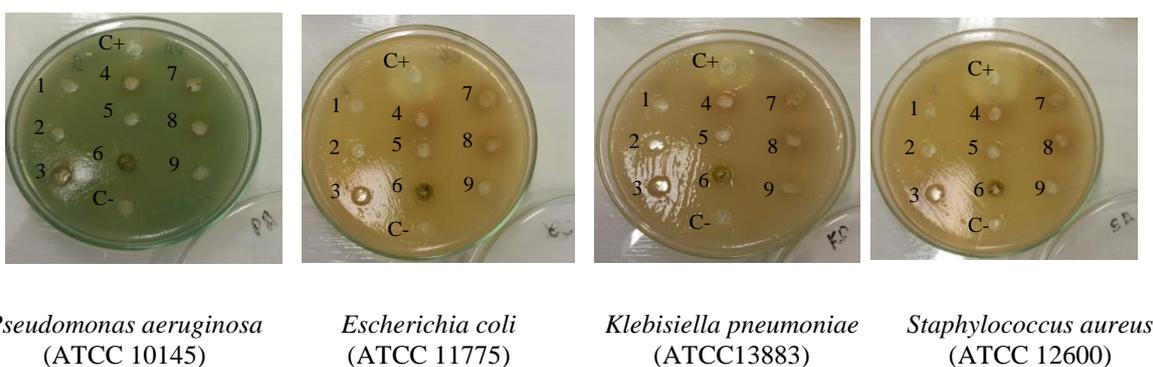
De acordo com resultados obtidos (Tabelas 11 e 12), os valores de equivalência dos extratos de folhas e galhos hexânicos e aquosos não apresentaram atividade antioxidante significativa, em relação aos extratos metanólicos de folhas e galhos se aproximaram do ácido ascórbico, tanto no teste de DPPH e Fe<sup>3+</sup>/Fenantrolina, sendo esses considerados mais interessantes para a prospecção de substâncias antioxidantes com base nas massas apresentadas pelos extratos e resultados obtidos pela análise de RMN, onde observou se a presença de sinais em entre 10 e 9 ppm característicos de alcaloides, 7,5 e 6,5 ppm característicos do grupo de flavonoides, corroborando com os flavonoides isolados, 5 e 1 ppm característicos de terpenos característicos visto que os extratos aquosos apresentaram também atividade antioxidante, mas apresentaram pouca massa. Durante a análise CCDC dos extratos brutos de folhas e galhos metanólicos e aquosos foi possível observar o indício da presença de substâncias aromáticas e com o fracionamento no extrato metanólico de folhas foi possível isolar um biflavonoide denominado como 2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ -epoxi-5,7,3',4'-tetrahidroxiflavan-(4 $\beta$ -8)-epicatequina e outro dois flavonoides, contendo várias hidroxilas fenólicas, corroborando com ensaio

antioxidante, indicando a presença de substâncias que são capazes de atuar no estresse oxidativo. Os flavonoides e outros derivados fenólicos são conhecidos por conseguirem capturar e neutralizar espécies oxidantes como ânion superóxido, radical hidroxila, atuando no sinergismo com outros antioxidantes como as vitaminas C e E, portanto eles podem interferir nas reações de propagação e formação de radicais livres (CUNHA & ROQUE, 2005).

#### 5.4.2 Atividade Antimicrobiana

Todos os extratos foram testados contra 4 espécies de bactérias patogênicas: duas Gram-Positivas *Escherichia coli* (ATCC 11775) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 12600) e Gram-Negativas: *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145) e *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883).

Os extratos e as fases do fracionamento do extrato metanólico foram submetidos ao ensaio de atividade antimicrobiana diluídos em DMSO numa concentração de 2 mg/mL. Os resultados do ensaio antimicrobiano demonstraram que a maioria dos extratos e as fases não apresentaram potencial antimicrobiano para nenhuma das cepas testadas, pelo método de cavidade-placa testada de 11 cm, Figura 33.



**Figura 33:** Resultados do teste de atividade antimicrobiana utilizando a técnica de cavidade-placa, dos extratos e fases dos extratos metanólico das folhas de *Duroia longiflora*. A concentração das amostras foi de 2 mg/mL.

O resultado negativo pode ser atribuído à diluição parcial das amostras com o meio teste e a técnica empregada onde os extratos e as fases não obtiveram uma boa

difusão em meio sólido, pois a polaridade apresentada pelos extratos e fases e apolar quando comparada ao meio cultivado polar.

Martins (2014) realizou o ensaio antimicrobiano empregando a técnica de micro diluição em meio líquido e obteve resultados positivos para diversas cepas entre elas *K. pneumonie*, *Flavobacterium corumnare*, *Nocardia brasiliensis*, *Salmonela enteridis* *Pseudomona aeruginosa*. Portanto o emprego desta outra técnica deverá ser realizada.

#### 5.4.3 Atividade Tóxica frente à *Artemia salina*

O ensaio com a *Artemia salina* foi realizado em triplicata de cada uma das amostras testadas, nas concentrações de 1000, 500 e 250 µg/mL. Na tabela abaixo, são mostrados os valores correspondentes a cada taxa de mortalidade dos indivíduos e seu respectivo controle salino, DMSO e dicromato de potássio, para maior confiabilidade dos resultados. As médias e desvios padrões das amostras foram calculados de acordo com a mortalidade dos indivíduos de *Artemia salina* em cada poço, os resultados são demonstrados na tabela 13.

**Tabela 13** – Resultado do teste de toxicidade frente a indivíduos de *Artemia salina*. Valores apresentados em porcentagem e desvio padrão dos extratos das folhas (Fo) e galhos (Ga), extraídos com metanol (M), hexano (H) e água.

Amostras	Concentrações das amostras (µg/mL)		
	1000	500	250
	Valores médios (%) e Desvio Padrão		
Fo M	100±0	13,3±1,15	0±0
Fo H	86,6±2,30	6,6±1,15	0±0
Ga M	100±0	13,3±0,57	0±0
Ga H	93,3±0,57	30±1	0±0
FH <sub>2</sub> O	6,6±0,57	33±0,57	0±0
Ga H <sub>2</sub> O	16,6±3,46	10±0	0±0
Controle DMSO 25%	0±0	0±0	0±0
Controle salino	0±0	0±0	0±0
Controle Dicromato	96,6±0,57	0±0	0±0

\* Fo: folhas; Ga: galhos; Hex: hexano; MeOH: metanol; H<sub>2</sub>O: aquoso.

Os extratos hexânicos e metanólicos apresentaram uma alta toxicidade e os extratos aquosos uma baixa toxicidade frente ao microcrustáceo na concentração de 1000 µg/mL, apresentando baixa toxicidade nas concentrações 500 e 250 µg/mL. Os extratos de folha e galho metanólico foram os que apresentam alta toxicidade com 100% de mortalidade, e os extratos de folha e galhos hexânicos apresentaram toxicidade moderada com 90% de os indivíduos mortos quando comparados com os extratos metanólicos. Os extratos aquosos de folhas e galhos apresentaram uma baixa toxicidade.

A alta toxicidade pode estar relacionada à boa atividade contra células cancerígenas e atividade contra protozoários, dessa maneira as amostras se mostraram interessantes para a realização de uma investigação fitoquímica em busca de substâncias bioativas com potencial antitumoral e anti-protozoário (HOCAYEN, 2012).

## 6. CONCLUSÃO

A análise fitoquímica de *Duroia longiflora* revelou a presença de classes de alcaloides indólicos, flavonoides e terpenos. Sendo possível identificar um biflavonoide, a  $2\alpha,3\alpha$ -epoxi-5,7,3',4'-tetrahidroxiflavan-(4 $\beta$ -8)-epicatequina e o  $\beta$ -sitosterol. Este é o primeiro relato dessas substâncias na espécie. Foi possível isolar outros 3 alcaloides, porém estas substâncias estão em processo de elucidação estrutural.

Os testes histoquímicos para metabólitos secundários evidenciaram a presença de flavonoides, alcaloides e taninos nos tecidos das folhas, para o metabolismo primário também foi evidenciada a presença de amido, proteínas e lipídios.

Com o estudo anatômico foi possível descrever os tecidos anatômicos das folhas de *D. longiflora*, com ênfase no sítio de produção das substâncias histolocalizadas.

O ensaio antioxidante mostrou que existem substâncias antioxidantes presentes nos extratos metanólicos de folhas e podendo ser fonte de uma ou mais substâncias com potencial usado cosmético ou farmacológico para eliminação de radicais livres.

O ensaio antimicrobiano revelou que os extratos de folhas e galhos, não apresentaram nenhuma atividade antimicrobiana frente às cepas testadas, este resultado não foi conclusivo pois os extratos não dissolveram bem. E não houve uma boa difusão, sendo necessário realizar novos testes com outra técnica.

O ensaio biológico de toxicidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina* revelou que os extratos metanólicos de folhas e galhos possuem substâncias com alta toxicidade, sendo interessantes para futuros ensaios antitumorais.

Os resultados deste trabalho contribuíram para o conhecimento das classes químicas, potenciais biológicos, estudo anatômico das estruturas da espécie, assim como a distribuição das substâncias presentes na parte vegetal estudada, uma vez que estão sendo descritos pela primeira vez. Os dados aqui apresentando podem ser ainda mais explorados, as substâncias caracterizadas pode ser testado frente a diversos microorganismos, a fim de investigar melhor os potenciais biológicos. Este trabalho servirá

de subsídios para futuros estudos comparativos da composição química da espécie, gênero, inclusive tribo e poderá ser usada em estudos quimiotaxonômicos.



## 7. REFERÊNCIAS

- ARGYROPOULOU, C; IOANNIDOU, A.A; CHRISTODOULAKIS, S. N; FASSEAS, C;. Leaf anatomy and histochemistry of *Lipiacitriodora* (*Verbenaceae*). **Australian Journal of Botany**, n.58, p: 398 - 409; 2010.
- AQUINO, R; TOMMASI, D, N; TAPIA, M; LAURO, MR; RASTRELLI L;. New 3-Methoxyflavones, an Iridoid Lactone and a Flavonol from *Duroia hirsute*. **Journal of Natural Products**, No. 4, Vol. 62, 1999.
- ALMEIDA, S DOS JC; RODRIGUES S DE, T; DORES, DAS R.G. R; NAGEM, J.T. Detecção de capsaicina em extratos dos frutos e maduros de *Capsicum baccatum* L. pelas metodologias de cromatografia em camada delgada e histoquímica. **Infarma Ciências Farmacêuticas**. v.27, p: 106-111; 2015.
- BARREIRO, E. J; BOLZANI, V. da S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química. Nova**, v. 32, n. 3, 2009.
- BARBOSA, M.R.; ZAPPI, D.; TAYLOR, C.; CABRAL, E.; JARDIM, J.G.; PEREIRA, M.S.; CALIÓ, M.F.; PESSOA, M.C.R.; SALAS, R.; SOUZA, E.B.; DI MAIO, F.R.; MACIAS, L.; ANUNCIACÃO, E.A. DA; GERMANO FILHO, P.; OLIVEIRA, J.A.; BRUNIERA, C.P.; M. GOMES; DE TONI, K.; FIRENS, M. *Rubiaceae* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB210>>. Acessado em: 10/03/2017.
- BIANCHI, P, L, M; ANTUNES, G, M, L. Radicais Livres e os Principais Antioxidantes na Dieta. **Revista de Nutrição**, Campinas, v12, n.2, p: 123-130; 1999.
- CANCELA, G, MD. **O Processo de envelhecimento**. Portal de psicologia ([www.psicologia.com.pt](http://www.psicologia.com.pt))2008).

- CARDOSO, C, L; SILVA, D, H, S; YOUNG, M, C, M; CASTRO-GAMBOA I, BOLZANI V, DA S.; 2Indole monoterpene alkaloids from *Chimarrhis turbinata* DC Prodr.: a contribution to the chemotaxonomic studies of the Rubiaceae family. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. n.18, vol 1, p: 26-29, 2008.
- CAMPOS, M. DA G. Flavonoides. In: CUNHA, A. P. DA (Ed.). . **Farmacognosia e Fitoquímica**. 3. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2005. p. 238–289.
- CAMPOS, M. DA G; SALGUEIRO, L; GONÇALVES, M, J; ROQUE, R.O. Alcaloides com núcleo indólico. In: CUNHA, A. P. DA (Ed.). . **Farmacognosia e Fitoquímica**. 3. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2005. p. 563–581.
- CECHINEL FILHO, VALDIR; YUNES, ROSENDO A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v.21, n.1, 1998.
- CHARRIEXE, LADREIX; Repartition intracellulaire de secretal flavonique de *Populus nigra* L. **Planta**. 129, Vol1, p: 67-174; 1976.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard. 6<sup>a</sup> ed., 2012.
- CONCEIÇÃO, L.O; AOYAMA, E.M. Anatomia e histoquímica da lâmina foliar de espécies conhecidas por quebra pedra (*Euphorbia prostrata* Aiton, *Euphorbia hyssopifolia* L., *Phyllanthus amarus*. &Thonn e *Phyllanthus tenellus* Roxb.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v 18 n.2, supl. I, p: 571-581, 2016.
- CÓSCIA, C J; C RC. **Handbook of Chromatography Terpenoids**. Florida. C R C. Press. Inc. vol 1, p: 193;1984.

COLLINS, CAROL H.; BRAGA, GILBERTO L.; BONATO, PIERINA S. Introdução á Métodos Cromatográficos. 7ª edição: Editora da UNICAMP (2006).

CUNHA, DA M, B. **Avaliação ecotoxicológica de distintos tipos de efluentes mediante os ensaios de toxicidade aguda utilizando *Artemia salina* e *Lactura Sativa***. Trabalho de Conclusão de Curso. Química, Porto Alegre, 2011.

CUNHA, DA.P; ROQUE, O, R.Esteróis e Triterpenos: Ácidos biliares, precursores das vitaminas D e fitesróis, cardiotónicos, hormonas esteróide, matérias- primas de núcleo. Estereóides usadas em sínteses parciais e saponósidos. In: CUNHA, A. P. DA (Ed.). **Farmacognosia e Fitoquímica**. 3. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, p. 432–476, 2005.

DELPRETE, P.G. **Flora dos Estados de Goiás e Tocantins: Parte 1: Introdução, Gênero A H. Goiânia: Coleção Rizzo, p.1-580, 2010.**

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. New York: John Wiley & Sons, Ltd., 2002.

DUARTE, T, C, M. Atividade Antimicrobiana plantas de Medicinais Aromáticas utilizadas no Brasil; **Multi Ciência: Construindo a história dos Produtos Naturais**, n.7, Campinas, 2006.

EVERT, Ray F.RAVEN | **Biologia vegetal/** Ray FEvert e Susan E. Eichhorn: revisão técnica Jane Elizabeth Ana Claudia Kraus; Tradução M. Vieira... [et al.].-8. Ed-Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.

ELOFF, JN. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. **PlantaMed** 64: 711-713.1998.

FREDERICKSON, E, M; GORDON, D, M; The devil to pay: a cost of mutualism with *Myrmelachista schumanni* ants in “devil’s thress gardens’ is increased

herbivory on *Duroia hirsute* tree. **Proceedings of the Royal Society B.** v. 274, p.111-1123, 2007.

FIGUEIREDO, da Silva, Ana Maria; Barroso, M, G, José; Pedro, G, M, Luís; Ascensão Lia; **Histoquímica e Citoquímica em Plantas: Princípios e Protocolos.** Edição: Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Centro de Biotecnologia Vegetal. 1º Edição, Lisboa, Janeiro de 2007- 30 Exemplares.

FURRM, P G MAHLBERG. Histochemical analysis of laticifers and glandular trichomes in *Cannabis sativa* J. **Nat. Prod** 44: 153-159.1981.

GABE, M. **Techniques histologiques.** Masson & Cie. Paris: 1968.

GANTER.P; G. JOLLÈS. **Histologiques normale et pathologiques.**Vol. 1 & 2.Gauthier. –Villars. Paris. 1969 -1970.

GERSHMAN, M, D .Multitaste outbreak of *Pseudomonas fluorescens* bloodstream incetion after exposure to contaminated heparinized saline flush prepared by a compounding pharmacy. **Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectios Diseases Society of America**,v. 47, n.11, p.1372,1391,dez. 2008.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas Medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v 30, n.2, p. 374 - 381. 2007.

HEITZMAN, E, E; NETO, C, C; WINIARZ, E; VAISBERG, J, B; HAMMOND, G, J. Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of *Uncaria* (Rubiaceae). **Pythochemistry.** n.66, P; 5-29, 2005.

HENRIQUES, T, A; LIMNERGER, P, R; KERBER, A, V; MORENO, H, R, P. Alcaloides. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Eds.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 6. ed. Porto Alegre; Florianópolis: Editora da UFSC; Editora da

UFRGS, 2007. p.765-791.

HOCAYEN, S DE A, P; CAMPOS, A, L; POCHAPSKI, MT, MALFATTI, M, RC.  
Avaliação da toxicidade do extrato bruto metanólico de *Baccharis dracunculifolia* por meio de ensaio com *Artemia salina*. **INSULA: Revista de Botânica**, Florianópolis, n.41, p. 23-31. 2012.

JOHANSEN.D.A. **Plant Microtechnique**; Mc.Graw-Hell-New Work. 1940.

KRAUS J.E; ARDUIN M. Manual Básico de Métodos em Morfologia Vegetal. 1 ed.  
**Soropédica**, Rio de Janeiro, p.164, 1997.

MACE .M.E; HOWELL, C. R.Histochemistry and identification of condensed tannins  
precursor in roots of cottonseedlings. **Canadian Journal of Botany**; 52, p 2723  
- 2426; 1974.

MARTINS, D; CARRION, L.L.; RAMOS, D.F.; SALOMÉ, K.S.; SILVA,  
P.E.A.da;BARISON, A.; NUNEZ, C.V. Triterpenes and the antimycobacterial  
activity of *Duroia macrophylla* Huber (Rubiaceae). **BioMed Research  
International**, p7, vol.2013.

MARTINS, D; FACHIN-ESPINAR, M.T.; OLIVEIRA, T.A.; LIMA, K.C.S.;  
CAVALCANTI, R.M.; TELES B.R.; NUNEZ, C.V. Estudo químico y  
biológico de *Duroia macrophylla*. **Journal of Pharmacy and Pharmacognosy  
Research**, v. 2 (6), p. 158-171, 2014.

MARTINS, D; NUNEZ, V, C; Secondary Metabolites from Rubiaceae.**Molecules**,  
Review, v 20, n.1, 2015.

MATIAS, J. L; SIMÕES, M. O. M; ROYO, A. V; RIBEIRO, M. L; SANTOS, C.A;  
FONSECA, M.S.J. Structure and histochemistry of Medicinal species  
*Solanum*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. V. 1, n.26, p. 147-160, 2016.

- MELO, A, E; MACIEL, S, I M; LIMA, G, A, VL; NASCIEMNTO, J, R. Capacidade antioxidante das Frutas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. Vol 44, n.2, abril/junho, 2008.
- MEYER, B. N., FERRIGNI, N. R., PUTNAN, J. E., JACOBSEN, L. B., NICHOLS, D. E., Mcl. AUGHLIN, J. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **Journal of Medical Plant Research**, v. 45, n.1, p. 31-34, 1982.
- MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química Nova**. v 24, n.1, p.105 - 111, 2001.
- MOLEYNEUX, PHILIP. The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Sangklanakarini.SCI.Technol**; 2004.
- MORAES, DA S, M, T; ÁRAÚJO, DE H, M; BERNADES, R, N; OLIVEIRA, DE B, D; LASUNSKAIA, B, E; MUZITANO, F, M; CUNHA, DA M. Antimicrobial activity and Alkaloid Prospection of Psychotria Species (Rubiaceae) from the Brazilian Atlantic Rainforest. **Planta Medica** n.77, p: 964- 970, 2011.
- NASCIMENTO, DE MELO; **Duroia L. f. (Gardenideae – Rubiaceae) na Amazônia Brasileira**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal Rural da Amazônia-UFRA- Pós Graduação em Ciências Biológicas – Botânica Tropical; 2013.
- NOVAES, J.A. **Desenvolvimento e validação de método para quantificação da Capacidade redutora de extratos vegetais secos**. Dissertação de Mestrado Universidade do Estado do Amazonas, 2007.
- NUNEZ, CV; VASCONCELOS, M. C; Novo alcaloide Antitumoral de *Duroia macrophylla*. 2012 Brasil. **Patente**: Privilégio de Inovação. Número do registro: PI10201203380 data de depósito: 31/12/2012, título: “NOVO ALCALOIDE ANTITUMORAL DE DUROIA MACROPHYLLA, Instituição de registro: INPA - Instituto Nacional da Propriedade Industrial”.

- PAVIA, DONALD L. et al; **Introdução a espectroscopia**; São Paulo: Cengage Learning 2013.
- PACKER, F, J; LUZ, DA S, M, MS. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, vol 17, n1, p: 102-107 Jan. /Mar. 2007.
- PAGE, E, J; MADRINAN, S; TOWERS, N, H, G. Identification of a plant growth inhibiting iridoid lactone from *Duroia hirsuta*, the alleopathic tree of ‘Devil’s Garden’. **Birkhauser Verlag Basel**. V14, n 4, p.840-843, 1994.
- PEARSE, AGE. Theoretical and applied, **Histochemical**, 4 ed. Longman Group Limited, 1980.
- REIS, AJ; CARRION, L, L; RODRIGUES, K; FENALTI, M, J; S-M, T; SCAINI, J, C; MARTINS, D; MESQUITA, O, W, D; MESQUITA, S, S, A; NUNEZ, V, C; SILVA, DA A, E, P; RAMOS, F, D. Avaliação das atividades antifúngica, antimicrobiana e larvicida de *Duroia macrophylla* e *D. saccifera*. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, v. 1, p. 1, 2016.
- RIBEIRO, JOSÉ EDUARDO L. DA S. **Flora da Reserva Ducke: Guia de identificação das plantas vasculares de uma terra-firme na Amazônia Central**. Manaus: INPA, p 633, 1999.
- ROBBERS, J. E; SPEEDIE, M. K; TYLER, V. E. **Farmacognosia-Farmacobiotecnologia**. p.123 - 148. São Paulo, 1997.
- SANTOS, M.C. A; FREITAS, S. DE P; AROUCHA, E.M. M; SANTOS, A.L.A. Anatomia e histoquímica de folhas e raízes de vinca (*Catharanthus roseus* (L) G. Don.). **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v 9, n.1, 1 Semestre, 2009.
- SAXENA, M. et al. Phytochemistry of Medicinal Plants. **Journal of Pharmacognosy**

**and Phytochemistry**, v. 1, n. 6, p. 168–182, 2013.

SILVA, N, O; CHINALIA, A, L; P DE A, G, J. Caracterização Histoquímica dos Folíolos de *Spondias tuberosa* arruda (ANACARDIACEAE LINDL.). **Revista Caatinga**. Mossoró/Brasil, v.21, n.3, p 62-68; 2008.

SIMÕES, C.O et al. **Farmacognosia da Planta ao Medicamento**. Porto Alegre/ Florianópolis, Ed Universidade /UFRGS/Ed UFSC, p 821; 1999.

SHAMI, J, N, N; MOREIRA, M, A, E. **Revista de Nutrição**. vol.17 no. 2 Campinas Apr./June 2004.

SVEENDSEN, AB; RVEPORTE.Chromatography of alkaloids. **Elsevier Scientific Publishing Company**,New York; 1983.

SOUZA, M. M.; BELLA CRUZ, A. SCHUHMACHER, M. B. KREUGER, M. R. O. FREITAS, R. A.; BELLA CRUZ, R. C. M. **Métodos de avaliação de atividade biológica de produtos naturais e sintéticos**. In: BRESOLIN, T. M. B; CECHINEL, V. F. (Ed.) Ciências Farmacêuticas; Contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos. Itajaí - SC: Univali, p. 107–166. 2003.

TEXEIRA D P, JOSIANE; **Avaliação dos efeitos tóxicos e genotóxicos de inseticida em *Artemia salina* e *Allium cepa* L** (. Monografia Especialização) - Programa de Pós-Graduação/Especialização em Gestão de Recursos Naturais, Criciúma, Junho de 2008.

THE PLANT LIST. Disponível em  
<<http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Rubiaceae/>> Acesso em:  
17/05/2017.

TILDEN, J. A new route of transmission for *Escherichia coli*: infection from dry fermentenslami. **American journal of public health**, v. 86-n.8 p.1142-5 ago. 1996.

- TSHIBANGU, T; KAPEPULA, P, M; KAPINGA, M, J, K; MUKUTA, A, T; KALENDA, D, T; TCHINDA A, T; Ange, A; Mouithys-Mickalad, Cieckiewicz ,O,J , E; Tits, M, L; Frédéric A, M.; **Antiplasmodial activity of Heinsia crinite (Rubiaceae) and identification of new iridoids. Journal of Ethnopharmacology**, p; 18, 2017.
- USHA, R; SANGEETHA, S; PALANISWAMY, M.; Antimicrobial Activity of a Rarely Known Species, *Morinda citrifolia* L. **Ethnobotanical Leaflets**, n.14, p: 306-11, 2010.
- VALENTE, L.M.M. BIZARRI, C.H.B. LIECHOCKI S. BARBOZA R.S. PAIXÃO, D.;ALMEIDA M.B.S.; BENEVIDES, P. J.C.; MAGALHÃES, A.; SIANI, A. C. Kaempferitrin from *Uncaria guianensis* (Rubiaceae) and its Potential as a Chemical Marker for the Species. **Journal. Braz. Chem. Soc.** n.20, ed 6, p: 1041-1045. 2009.
- VIEIRA, R, C; DELPRETEP; G; LEITA, G, G; LEITA, S, G. Anatomical and chemical analyses of leaf secretory cavities of *Rustia formosa* (Rubiaceae). **American Journal of Botany**, n.88, vol12, p: 2151–2156, 2001.
- VIDAL, B, C. Dichroism in collagen bundles stained with xyloidine- Ponceu 2R. **Annales d`Histochemie**, n15, p: 289-296, 1970.
- WAGNER, H; BLADT, S.ZGAINSKI. **Plant Drug Analysis**. Alemanha: Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, p 320; 1984.
- WANG, LIJUN; LOU, GUODONG; MA, ZHOGJUN; LIU, XUEMING. Chemical constituents with antioxidant actives from litchi (*Lichti chinensis* Sonn) seeds. **Food Chemistry**.vol.126, p: 1081–1087, 2011.
- ZANCA, S, S; COSTA, R, C; NUNEZ, V, C; *In Vitro* Callus Inducion of *Duroia macrophylla* Huber. Chemical Prospection and Biotechnological Potentialities of Its Extracts. **Scientific Bot** ed.1:001.v 1, 2016.

ZEIGLER, J; FACHINNI, J, P; Alkaloid biosynthesis: Metabolism and Trafficking, Annual Review of Plant Biology, n.59, p: 735–69, 2008.

ZINI A, S; MARTINS, S; TODERKE, M, L; TEMPONI, G, L: Anatomia foliar de Rubiaceae ocorrentes no fragmento florestal urbano de Mata Atlântica, PR, Brasil, **Hoehnea**, n 43 v.2, p.173-182, 2016.

ZUANAZZI, S, A, J; MONTANHA, A, J. Flavonoides. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Eds.). . **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre; Florianópolis: Editora da UFSC; Editora da UFRGS, p. 577-615. 2007.