

AVALIAÇÃO DA SAZONALIDADE QUÍMICA E DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE EXTRATOS AQUOSOS DE *Duroia macrophylla* Huber

Hudson Freires de ANDRADE¹

Sabrina Schumaker ZANCA²

Maria Carolina Scheffer de SOUZA³

Kissinara Alessandra Marques MOREIRA⁴

Cecília Verônica NUNEZ⁵

¹Bolsista IC INPA-PIBIC/CNPq;

²Colaboradora/mestranda INPA;

³Colaboradora/Doutoranda INPA/UFAM/CAPES;

⁴Colaboradora/Graduada/INPA; ⁵Orientadora

LABB/COTI/NPA

INTRODUÇÃO

Os produtos naturais são utilizados pela humanidade desde os tempos mais remotos. Ao longo da história, vários relatos da utilização de recursos naturais por civilizações antigas orientais e ocidentais na prática medicinal foram encontrados, principalmente nas civilizações Egípcia e Greco-romana, como por exemplo, o ópio, retirado de *Papaver somniferum* e que era utilizado por suas propriedades analgésicas desde a época dos sumérios por volta de 4000 A.C, de onde foi isolada a morfina, analgésico usado até a atualidade (Viegas *et al.* 2006). Os compostos bioativos isolados de espécies vegetais são responsáveis por uma grande e diversificada gama de atividades biológicas, sendo hoje a maior esperança para portadores de doenças graves como o câncer e a AIDS (Castro *et al.* 2004). Várias substâncias que foram obtidas de plantas deram origem a fármacos com grande importância medicinal, como, a vimblastina e a vincristina isolados de *Catharanthus roseus* que são usados no tratamento de neoplasias. Outro exemplo é o ácido acetil salicílico obtido a partir da salicilina que foi isolada de *Salix alba* (Castro *et al.* 2004 e Viegas *et al.* 2006). Os metabólitos bioativos extraídos de plantas são oriundos principalmente do metabolismo secundário das mesmas, sendo importantes alvos na busca por novos compostos com atividade biológica. A grande e diversificada flora do Brasil tem imenso potencial como fornecedora de metabólitos secundários, entretanto pouco tem sido estudado quimicamente, havendo pouco conhecimento sobre seus potenciais usos terapêuticos (Castro *et al.* 2004). A Floresta Amazônica, dentro do cenário nacional, destaca-se no fator biodiversidade, mas ainda apresenta poucos estudos fitoquímicos, considerando a grande diversidade de plantas que possui e que podem constituir uma fonte muito rica para a bioprospecção de produtos naturais biologicamente ativos (Cechinel Filho e Yunes 2001). A família Rubiaceae é a quarta maior família botânica entre as Angiospermas, possui grande interesse econômico, com espécies utilizadas na alimentação, como o café (*Coffea arabica*), até espécies utilizadas amplamente na medicina popular e na fabricação de fitofármacos e fitoterápicos, como a unha-de-gato (*Uncaria tomentosa*) (Oliveira 2009). Entre as diversas espécies com grande potencial da família Rubiaceae, encontra-se a *Duroia macrophylla*, que a partir de estudos fitoquímicos de suas folhas foi evidenciada a presença de um alcaloide, com atividade biológica contra células tumorais (Nunez e Vasconcelos 2012). Os extratos de *D. macrophylla* também apresentaram elevada citotoxicidade em ensaios com *Artemia salina*, atividade antioxidante e antibacteriana contra *Micobacterium tuberculosis* (Martins *et al.* 2013 e Martins *et al.* 2014). Porém, nem todos os extratos de folhas desta espécie apresentam as mesmas atividades biológicas. A época em que é feita a coleta do material vegetal é um dos fatores que exerce grande influência na constituição química dos extratos, visto que ela não permanece constante, havendo alteração na quantidade e natureza química dos

compostos bioativos ao longo do dia, dos meses e das estações do ano. Essas alterações são decorrentes da influência do ciclo circadiano e da sazonalidade (Gobbo-Neto e Lopes 2007). Desta forma, o presente trabalho tem o intuito de continuar os estudos com a espécie *Duroia macrophylla*, tendo como objetivo avaliar a sazonalidade química e a bioatividade de extratos aquosos de folhas desta espécie, durante um ano em dois indivíduos.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta do material vegetal

Folhas de dois indivíduos de *D. macrophylla* Huber foram coletadas na Reserva Florestal Adolpho Ducke, no município de Manaus (AM), localizados em regiões diferentes da reserva e denominados de A e B. As coletas foram realizadas ao longo de doze meses, de abril de 2013 a março de 2014, uma coleta a cada mês. As exsiccatas foram depositadas no Herbário da Coordenação de Pesquisas em Botânica do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, números de depósito 259228 e 261554.

Preparo dos extratos

As folhas coletadas foram secas em estufa com temperatura média de 40 °C e em seguida moídas em moinho de facas (marca Tecnal, Willye TE-650). Posteriormente foi realizada extração com hexano, metanol (extratos que foram utilizados em outros estudos) e água destilada, onde foram realizadas de três a quatro extrações, utilizando banho de ultrassom (marca Unique) por 20 minutos em cada extração. Após, os extratos foram filtrados e em seguida congelados e concentrados em liofilizador (marca Christi).

Análise cromatográfica dos extratos

As análises iniciais dos extratos foram realizadas por Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC), empregando cromatofolhas de alumínio, com sílica gel 60 com indicador de fluorescência UV_{254nm} (marca Macherey – NAGEL – MN). A eluição das cromatofolhas foi realizada com vários solventes, em diferentes proporções. Para revelação, empregou-se como revelador físico, a luz ultravioleta (comprimento de onda de 254 e 365 nm) e como reveladores químicos, anisaldeído sulfúrico, sulfato cérico, cloreto férrico e reagente de Dragendorff. Para a padronização das amostras na análise de Cromatografia em Camada Delgada Comparativa, foram pesados 10 mg de extrato de cada amostra, que foram diluídos em 1 mL de solvente (hexano ou metanol) para cada. Para a aplicação das amostras nas placas cromatográficas (10x20 cm), foi utilizado um pipetador automático, ajustado para alíquotas de 15 µL.

Identificação de metabólitos de interesse nos extratos

Todos os extratos aquosos foram submetidos à Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de 300 MHz (marca Bruker – modelo Fourier 300). As amostras levadas ao RMN foram padronizadas, onde foram pesados 30 mg de cada extrato, que foram diluídos em 600 µL de água deuterada. Cada espectro foi analisado e comparado com as análises em RMN das substâncias já isoladas da espécie, visando detectar a presença das mesmas em cada amostra.

Ensaio antibacteriano

Os extratos de folhas *Duroia macrophylla* foram testados frente a oito bactérias: *Aeromonas hydrophilla* (ATCC 7966), *Corynebacterium glutamicum* (ATCC 13032), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076), *Staphylococcus aureus* (ATCC 12600), *Serratia marcescens* (ATCC 10145),

Pseudomonas fluorescens (ATCC 13525) e *Nocardia brasiliensis* (ATCC 19296). Para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM), os extratos foram primeiramente solubilizados em água destilada e em seguida foram realizadas diluições sucessivas em poços (microplaca de 96 poços) para a obtenção das concentrações de 1000, 500, 250 µg/mL. Foram adicionados 95 µL de cada concentração do extrato e 5 µL da bactéria testada (McFarland 0,5 contendo aproximadamente $1,5 \times 10^8$) diluída 10 vezes. Para o controle negativo foram utilizados 95 µL de água destilada no lugar do extrato. Para o controle positivo foi utilizado o antibiótico oxitetraciclina na concentração de 125 µg/mL. Todos os testes foram realizados em triplicata. Em seguida, a placa foi incubada a 30 ou 37 °C, dependendo da bactéria testada. A determinação da concentração mínima inibitória foi realizada observando as absorvâncias de cada concentração dos extratos em comparação com as absorvâncias do meio sem a presença de extratos (controle negativo) e com o meio contendo oxitetraciclina (controle positivo) os ensaios foram realizados em triplicata, lidas em espectrofotômetro de multiplacas (Thermo Multiskan GO[®]) no comprimento de onda de 625 nm.

Ensaio de toxicidade frente à Artemia salina

Para a avaliação da toxicidade dos extratos de *Duroia macrophylla* foi realizado o ensaio sobre *Artemia salina*. Para a obtenção dos microcrustáceos, foi preparada uma solução salina na concentração de 38 g/L, sendo esta posteriormente filtrada e acondicionada em um bequer de 1 L, onde foram adicionados 10 mg de cistos de *A. salina*. O bequer foi coberto com filme PVC e deixado sob luz artificial por 48 h a uma temperatura ambiente de 27-30 °C. Foram preparadas 24 soluções de cada amostra de extrato aquoso na concentração de 10 mg/mL utilizando como solvente água destilada. Posteriormente foram acrescentados 1 mL de solução salina em cada poço de uma placa contendo 24 poços, cada um dos poços abrangendo dez indivíduos de *A. salina*. Em seguida, foram adicionadas as soluções das amostras juntamente com a solução salina (sem indivíduos). O ensaio foi realizado em triplicata e o controle negativo foi feito utilizando a solução salina e o solvente no lugar da amostra. As placas foram deixadas em temperatura ambiente de 27-30 °C sob luz artificial durante 24 h. Posteriormente foi feita a leitura dos resultados a partir da observação das larvas, sendo consideradas mortas todas as que não apresentaram qualquer movimento. A determinação da toxicidade foi realizada, através do percentual (%) de mortalidade das larvas (Meyer *et al.* 1982; Cechinel *et al.* 2003). Caso haja amostras que apresentem mortalidade acima de 60%, estas serão testadas novamente, ampliando os pontos de curva de concentração das amostras, visando obter a CL₅₀.

Avaliação da atividade antioxidante

A avaliação da atividade antioxidante dos extratos foi realizada utilizando os ensaios quantitativos com 2,2-difenil-1-picril-hidrazila DPPH e com Fe³⁺/1,10-Fenantrolina 0,25%, os resultados obtidos foram comparados em termos de equivalência com ácido ascórbico. Para a construção da curva analítica foram preparadas seis alíquotas diluídas do padrão ácido ascórbico. Foram usados para a curva do DPPH 10 µL dessas alíquotas diluídas em seis novos microtubos adicionando em seguida 990 µL de DPPH e, após 30 minutos, serem realizadas leituras em espectrofotômetro em comprimento de onda de 517 nm. Para a curva utilizando Fe³⁺ foram utilizados 10 µL dessas alíquotas diluídas em seis microtubos e adicionados 10 µL Fe³⁺ e 980 µL de 1,10-fenantrolina. Uma hora depois foram realizadas as leituras em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 508 nm. Para o preparo das soluções com os extratos aquosos, foram pesados 5 mg de cada extrato e solubilizados em 10 mL de água deionizada (0,5 mg/mL). Para o teste com DPPH foram transferidos 10 µL da amostra para um microtubo seguido pela adição de 990 µL da solução de DPPH, onde a mistura foi homogeneizada e após 30 minutos foi medida a absorvância em um espectrofotômetro sob um comprimento de onda de 517 nm. Para o teste com ferro foram transferidos 10 µL da solução padrão de Fe³⁺ com concentração de 1000 µg.mL⁻¹ para um microtubo,

seguido pela adição de 10 µL da amostra e 980 µL da solução de 1,10 - fenantrolina 0,25% (m/v), onde a mistura foi homogeneizada. Após uma hora, foi medida a absorvância em um espectrofotômetro sob um comprimento de onda de 508 nm. Os testes foram realizados em triplicata. Foi realizado um teste controle para cada tipo de agente oxidante, onde o controle foi preparado da mesma forma como as amostras, substituindo-se a amostra por água deionizada.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Extratos obtidos

As doze coletas mensais realizadas ao longo de um ano, de abril de 2013 a março de 2014 deram origem a 24 extratos aquosos brutos de folhas de *D. macrophylla*, sendo doze do indivíduo A e doze do indivíduo B.

Análise em Cromatografia de Camada Delgada Comparativa

Para a Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC) foram testados vários sistemas de eluição, porém nenhum chegou a uma separação satisfatória dos constituintes químicos dos extratos. A provável causa é a alta concentração de compostos com polaridades similarmente elevadas que estão presentes nos extratos aquosos. O melhor sistema encontrado foi Metanol/Água/Ácido acético 6:3:1 e este foi usado na eluição dos extratos. A revelação com anisaldeído sulfúrico revelou três manchas distintas ao longo da cromatoplaça, uma na origem, outra com Rf de aproximadamente 0,52 e uma com Rf de aproximadamente 0,87, porém como este reagente é um revelador universal não se podem inferir quais compostos estão presentes. A revelação com reagente de Dragendorff não ocasionou o aparecimento de manchas alaranjadas em nenhum ponto da placa, indicando a ausência de alcaloides nos extratos aquosos dos dois indivíduos. Na revelação com sulfato cérico ambos os indivíduos apresentaram manchas roxas com baixa intensidade de coloração e com Rfs em torno de 0,8. A presença de manchas roxas com o uso deste revelador é um indicativo da presença de terpenos. Todos os extratos de ambos os indivíduos apresentaram manchas escuras com baixa intensidade de coloração com Rfs de aproximadamente 0,83 quando revelados com cloreto férrico, exceto o extrato do indivíduo A correspondente ao mês de abril. Estas manchas sugerem a presença de compostos aromáticos.

Análise em Ressonância Magnética Nuclear

Nos espectros de RMN de ^1H é possível observar sinais de maior intensidade entre 3 e 4,5 ppm, os quais correspondem à região dos açúcares, em todos os meses analisados. A maior concentração de açúcares está provavelmente relacionada à polaridade elevada dos mesmos, que por ter maior afinidade com a água, do que a maioria dos metabólitos secundários produzidos pela planta podem ser facilmente retirados do material vegetal nas extrações aquosas. É interessante notar que estes são açúcares livres, ou seja, não estão ligados a outras classes de metabólitos, como flavonoides glicosilados ou triterpenos glicosilados (saponinas). Se estivessem esterificando outras classes químicas, as intensidades dos sinais seriam mais equiparadas com os sinais entre 6,5 e 8 ppm (de aromáticos, como flavonoides, por exemplo) ou com sinais entre 0,6 e 1,1 ppm (de metilas de triterpenos, por exemplo), o que não ocorre. Os extratos dos meses de janeiro, fevereiro, março e abril do indivíduo A assim como extratos de janeiro, fevereiro, março, abril e dezembro do indivíduo B apresentaram sinais de menor intensidade na região dos açúcares podendo assim inferir a presença de concentrações inferiores desses compostos nesses meses. Todos os extratos dos dois indivíduos apresentaram sinais na região entre 0,6 e 1,4 ppm indicativo da presença de terpenos, esteróides e compostos graxos. Sendo maior a concentração desses metabólitos nos extratos dos meses de janeiro, fevereiro e março. O indivíduo B apresentou nos meses de janeiro e fevereiro sinais indicativos de

triterpenos (sinais de metilas entre 0,7 e 1,1 ppm). Martins *et al.* (2013) identificaram triterpenos com atividade contra *Mycobacterium tuberculosis* em extratos metanólicos de folhas de *D. macrophylla*. A região do espectro entre 6,5 a 8 ppm correspondente à substâncias aromáticas apresentou poucos sinais em alguns extratos e em muito baixa intensidade nas duas plantas. Na revelação das placas de CCDC com cloreto férrico, houve o surgimento de manchas negras com baixa intensidade, indicando a presença de substâncias aromáticas em baixa concentração. Em nenhum dos extratos de ambas as plantas foram evidenciadas sinais na região dos alcaloides indólicos (sinais entre 8 e 10 ppm). Podendo inferir a ausência desses metabólitos nos extratos aquosos dos dois indivíduos de *D. macrophylla*. Portanto, este resultado está em conformidade com os resultados da Cromatografia em Camada Delgada Comparativa onde também não foi detectada a presença desses compostos. Nos dois indivíduos houve diferenças na composição e na concentração dos metabólitos encontrados nos meses de janeiro, fevereiro e março em relação aos outros meses, porém não é possível saber quais substâncias estão presentes sendo necessárias outras análises para identificação das mesmas. Nos extratos de ambas as plantas notam-se correlação positiva entre os índices pluviométricos e a intensidade dos sinais na região correspondente a terpenos, compostos graxos e esteróides. Segundo Gobbo-Neto e Lopes (2007), o teor de metabólitos secundários pode sofrer influências de diversos fatores, como temperatura, altitude, índices pluviométricos e sazonalidade, porém alguns fatores apresentam correlação entre si e podem influir em conjunto na produção de metabólitos secundários pelas plantas. Considerando que os sinais referentes à triterpenos aparecem apenas nos extratos obtidos da planta coletada no período de maior incidência de chuvas na região de Manaus, isto sugere que o período chuvoso seja o fator indutor para a produção de triterpenos na espécie *D. macrophylla*. Porém, outros estudos serão necessários para corroborar essa hipótese. Nota-se também uma menor concentração de açúcares no período chuvoso, comparando com os extratos dos demais meses. Isto pode ter ocorrido em decorrência do acúmulo intracelular de solutos osmoticamente ativos, como sais minerais, aminoácidos e açúcares, durante o período seco, em resposta às condições de baixa disponibilidade de água. O mecanismo responsável pela manutenção da turgescência celular, chamado ajustamento osmótico, permite a manutenção de importantes atividades fisiológicas, como a fotossíntese, sob baixo potencial hídrico. Isto foi comprovado em estudo realizado com a planta do cerrado brasileiro *Solanum lycocarpum*, onde em indivíduos submetidos à deficiência hídrica ocorreu aumento nos teores de açúcares solúveis totais e redutores, em folhas (Chaves-Filho e Seraphim 2001). Portanto, pode ter ocorrido acúmulo de açúcares nas folhas de *D. macrophylla* nos meses mais secos do ano, o que possivelmente pode ter acarretado na menor concentração destas substâncias nos extratos dos meses mais chuvosos.

Resultado do ensaio antibacteriano

No ensaio antibacteriano foi possível observar uma pequena atividade inibitória do crescimento bacteriano de alguns dos extratos. Com relação ao indivíduo A, os extratos de todas as coletas demonstraram atividade inibitória do crescimento bacteriano em todas as concentrações testadas sobre as cepas de *S. aureus* e *K. pneumoniae*; o extrato da coleta de agosto também demonstrou atividade sobre *S. marcescens* nas concentrações de 1000 e 500 µg/mL; o extrato de janeiro sobre *N. brasiliensis* em 500 e 250 µg/mL; o extrato de fevereiro sobre *C. glutamicum* e *S. enterica* em 500 e 250 µg/mL; e o extrato de março sobre *N. brasiliensis* em 500 µg/mL e *S. marcescens* em todas as concentrações testadas. Com relação ao indivíduo B, todos os extratos demonstraram atividade inibitória do crescimento bacteriano em todas as concentrações testadas sobre as cepas de *S. aureus* e *K. pneumoniae*; o extrato de abril também demonstrou atividade sobre *N. brasiliensis* na concentração de 250 µg/mL e *S. marcescens* em 100 e 250 µg/mL; os extratos de maio, junho, julho, agosto, fevereiro sobre *S. marcescens* em todas as concentrações; o extrato de outubro sobre *C. glutamicum* em 500 µg/mL. Os extratos que apresentaram uma pequena atividade inibitória podem estar agindo apenas como bacteriostáticos (impedindo apenas

temporariamente ou apenas diminuindo a capacidade das bactérias de se multiplicarem) e não como bactericidas (que causam a morte de todas as bactérias, sem capacidade de tornarem a se multiplicar). Estes extratos poderiam ser unidos e testados em um novo ensaio em diferentes combinações, pois estes poderiam agir em sinergismo e apresentar uma atividade antibacteriana maior. É possível observar que na maioria dos ensaios, o valor da absorvância dos extratos foi superior ao valor da absorvância do controle negativo, que corresponde ao crescimento da bactéria apenas em meio de cultura. Na análise de Ressonância Magnética Nuclear foram detectados poucos ou fracos sinais nas regiões do espectro correspondentes a metabólitos com potencial antibacteriano, como, alcalóides, terpenos e flavonóides, indicando a ausência ou a presença em baixas concentrações desses compostos. Sendo que açúcares foram os constituintes detectados em maior concentração em todos os extratos, provavelmente atuaram como fonte suplementar de carbono, e que na ausência de metabólitos com propriedades antibacterianas provavelmente melhoraram o desempenho das bactérias no meio de cultura utilizado.

Resultados do ensaio de toxicidade frente à Artemia salina

Foram testados os 24 extratos obtidos das folhas de *D. macrophylla* oriundos das doze coletas efetuadas de abril de 2013 à março de 2014, doze da planta A e doze a planta B. Os testes foram realizados em três concentrações de amostra: 1000, 500 e 250 µg/mL. Os extratos aquosos de *Duroia macrophylla* não apresentaram atividade citotóxica significativa contra *Artemia salina* em nenhuma das concentrações testadas, não sendo possível determinar a CL₅₀.

Avaliação da atividade antioxidante

Os resultados obtidos foram expressos em equivalência com o ácido ascórbico, termo este adotado para expressar a razão da concentração da amostra pela concentração de ácido ascórbico. A concentração equivalente de ácido ascórbico foi obtida pela interpolação dos dados de variação de absorvância e concentração de ácido ascórbico na curva dose-resposta para o método. Portanto o termo “equivalência com o ácido ascórbico” permite correlacionar a resposta obtida do extrato vegetal com a do antioxidante padrão e quanto mais próximo de 1,0 mais semelhante é a capacidade antioxidante da amostra frente ao ácido ascórbico sendo que entre 0-2 é ativa, 3-4 possui média atividade e >4 não é ativo. Desta forma, nenhum dos extratos das duas plantas apresentou qualquer atividade antioxidante, pois a equivalência em nenhum dos extratos foi próxima de 1,0.

CONCLUSÃO

Em ambas as plantas de *D. macrophylla* não foram evidenciadas a presença de alcaloides indólicos nos extratos aquosos. Há variação química dos extratos aquosos entre os meses chuvosos em relação aos outros meses, indicando uma influência da pluviosidade na produção de metabólitos em *D. macrophylla*;

Os extratos aquosos de *D. macrophylla* não apresentaram atividade antimicrobiana significativa para a maioria das bactérias testadas, porém foram ativos contra *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae*. Foram atóxicos frente à *Artemia salina*, pois não foi possível determinar sua CL₅₀, e não apresentaram atividade antioxidante.

REFERÊNCIAS

- Braz Filho, R. 2010. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. *Química Nova*, 33(1): 229-239.
- Castro, H.G.; Ferreira, F.A.; Silva, D.J.H. da; Mosquin, P.R. 2004. *Aspectos gerais importância das plantas medicinais. Contribuição ao estudo das plantas medicinais e metabólitos secundários*. 2 ed. Visconde do Rio Branco, Suprema, p. 4-22.

- Cechinel Filho, V.; Yunes, R.A. 1998. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. *Química nova*, 21(1): 99-105.
- Cechinel Filho, V.; Noldin, V.F.; Monache, F.D.; Benassi, J.C.; Christmann, I.L.; Pedrosa, R.C.; Yunes, R.A. 2003. Composição química e atividades biológicas das folhas de *Cynara scolymus* L. (alcachofra) cultivada no Brasil. *Química Nova*, 26(3): 331-334
- Gobbo-Neto, L.; Lopes, N.P. 2007. Plantas Medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova*, 30(2): 374-381.
- INPE – Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais. Índice pluviométrico. Disponível em <<http://www.inpe.br/>>. Acesso em dezembro de 2014.
- Meyer, B.N.; Ferrigini, N.R.; Mclaughlin, J.L. 1982. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica*, 45(8): 31-34.
- Martins, D.; Carrion, L.L.; Ramos, D.F.; Salome, K.S.; Silva, P.E.A.; Barison, A.; Nunez, C.V. 2013. Triterpenes and the antimycobacterial activity of *Duroia macrophylla* Huber (Rubiaceae). *BioMed Research International*, Article ID 605831, 7 pages, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/605831>
- Martins, D.; Fachin-Espinar, M.T.; Oliveira, T.A.; Lima, K.C.S.; Cavalcanti, R.M.; Teles, B.R.; Nunez, C.V. 2014. Estudio químico y biológico de *Duroia macrophylla*. *Journal of Pharmacy and Pharmacognosy Research*, 2(6): 158-171.
- Nunez, C.V.; Vasconcelos, M.C. 2012. Novo Alcaloide Antitumoral de *Duroia macrophylla*. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: PI10201203380, data de depósito: 31/12/2012. Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial.
- Oliveira, P.L. 2009. *Contribuição ao estudo de espécies da família Rubiaceae: fitoquímica da espécie Amaioua guianensis Aubl.* Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Goiás, Instituto de Química. Goiânia.
- Viegas, C.J.; Bolzani, V.S.; Barreiro, E.J. 2006. Os produtos naturais a química medicinal moderna. *Química Nova*, 29(2): 326-337.
- Valentini, C.M.; da Silva, L.E.; Maciel, E.N.; Franceschini, E.; Sousa Jr., P.T.; Coelho, M.F.B. 2010. Variação anual do rendimento e composição química dos componentes voláteis da *Siparuna guianensis* Aubl. *Química Nova*, 33(7): 1506-1509.