

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA – PPGBIOTEC
INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA
LABORATÓRIO DE BIOPROSPECÇÃO E BIOTECNOLOGIA – LABB

**ESTUDO QUÍMICO DO EXTRATO HEXÂNICO DAS FOLHAS E DOS
EXTRATOS DOS CALOS CULTIVADOS *IN VITRO* DE *Duroia*
macrophylla HUBER (RUBIACEAE)**

FABIO VIDAL TANANTA

MANAUS
2017

FABIO VIDAL TANANTA

**ESTUDO QUÍMICO DO EXTRATO HEXÂNICO DAS FOLHAS E DOS
EXTRATOS DOS CALOS CULTIVADOS *IN VITRO* DE *Duroia*
macrophylla HUBER (RUBIACEAE)**

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Cecilia Veronica Nunez

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação Multi-Institucional em Biotecnologia da UFAM, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia, área de concentração em Saúde.

MANAUS

2017

T161e Tananta, Fabio Vidal
Estudo químico do extrato hexânico das folhas e dos extratos dos calos cultivados in vitro de *Duroia macrophylla* Huber (Rubiaceae) / Fabio Vidal Tananta. 2017
93 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Cecilia Veronica Nunez
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. *Duroia macrophylla*. 2. apurui. 3. terpenos. 4. açúcar. 5. calos.
I. Nunez, Cecilia Veronica II. Universidade Federal do Amazonas III.
Título

À Deus, autor da vida e dono de toda sabedoria.
À minha família por todo apoio e compreensão durante essa jornada. Nilcineide (minha mãe), Flávio (meu pai), Jr e Meriam (meus irmãos), é muito bom tê-los por perto.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha orientadora Prof^a. Dr^a. Cecilia Nunez, pelos ensinamentos, orientação e credibilidade desde a fase de Iniciação Científica e durante o tempo de mestrado.

Agradeço à Prof^a. Dr^a. Daiane Martins pela colaboração no meu aprendizado como aluno de Iniciação Científica. Obrigado Daiane pelo conhecimento compartilhado.

Obrigado aos colegas do Laboratório de Biotecnologia e Bioprospecção (LABB) pelos vários momentos de aprendizado e descontração. Desejo muito sucesso na caminhada de vocês. Meu muito obrigado às colegas Maria Carolina (Carol) e Maria Teresa (Maitê) pela contribuição com os ensaios antimicrobianos.

Aos colegas da turma 2015/2016 e professores do PPGBIOTEC/UFAM. Muito obrigado e sucesso a todos!

Agradeço à CAPES pela concessão de bolsa e apoio financeiro para o projeto.

Ao INPA pela infraestrutura e amparo na realização deste projeto de mestrado.

A todos que de alguma forma ajudaram e estiveram presentes durante o período de mestrado. Meu muito obrigado!

RESUMO

Muitos fármacos sintéticos têm alguma relação com as substâncias isoladas de plantas que foram foco de estudos fitoquímicos. Neste trabalho, a espécie vegetal escolhida foi a *Duroia macrophylla* (Rubiaceae), popularmente conhecida como "apurui" ou "purui-grande-da-mata", a qual é rica em substâncias como terpenos e alcaloides, o que pôde ser verificado através das análises e estudos anteriormente realizados. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi realizar o fracionamento do extrato hexânico das folhas de *Duroia macrophylla*, dos extratos hexânico, acetato de etila e metanólico de seus calos obtidos *in vitro*, e ainda, avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos. O extrato hexânico das folhas de *D. macrophylla* foi fracionado e em três frações foi identificado o sitosterol como principal constituinte e um sequiterpeno como constituinte majoritário de uma fração, porém a sua estrutura não pôde ser identificada. O fracionamento do extrato acetato de etila dos calos de *D. macrophylla* forneceu duas frações com elevado grau de pureza, uma contendo um triterpeno como constituinte majoritário e a outra contendo um açúcar. Porém, também não foi possível identificar as estruturas até o fechamento deste trabalho. Em relação ao potencial antimicrobiano, o extrato hexânico das folhas foi capaz de inibir as cepas de *Edwardsiella tarda* (1000 µg/mL), *Pseudomonas aeruginosa* (1000 µg/mL) e *Serratia marcescens* (250 µg/mL) e os extratos acetato de etila e metanólico dos calos mostraram inibição frente às cepas de *Aeromonas hydrophila* (na concentração de 30 µg/mL e 125 µg/mL respectivamente), *Acinetobacter baumannii* (na concentração de 1000 µg/mL e 60 µg/mL respectivamente), *Candida albicans* (na concentração de 1000 µg/mL e 30 µg/mL respectivamente) e *Candida parapsilosis* (na concentração de 60 µg/mL para os dois extratos). Estes resultados incentivam a continuação do fracionamento dos extratos das folhas e dos calos desta espécie a fim de poder isolar as substâncias (esteroides ou triterpenos) responsáveis pelas atividades.

Palavras Chaves: *Duroia macrophylla*, apurui, terpenos, açúcar, esteroide, calos.

ABSTRACT

Many synthetic drugs have some relationship to the substances isolated from plants that were the focus of phytochemical studies. In this work, the plant species chosen was *Duroia macrophylla* (Rubiaceae), popularly known as "apurui" or "purui-grande-damata", which is rich in substances such as terpenes and alkaloids, which could be verified through analyzes and studies previously performed. In this context, the objective of this work was to perform the fractionation of the hexane extract of the leaves of *Duroia macrophylla* and the hexane, ethyl acetate and methanolic extracts of its callus obtained *in vitro*. The hexanic extract of the leaves of *D. macrophylla* was fractionated and in three fractions sitosterol was identified as the main constituent and a sesquiterpene as the major constituent of another fraction, but its structure could not be identified. Fractionation of the ethyl acetate extract of the callus of *D. macrophylla* provided two fractions of high purity, one containing one triterpene as the major constituent and the other containing one sugar. However, it was not possible to identify the structures until the closing of this work. In relation to the antimicrobial potential, the hexane extract from the leaves was able to inhibit the strains of *Edwardsiella tarda* (1000 µg/mL), *Pseudomonas aeruginosa* (1000 µg/mL) and *Serratia marcescens* (250 µg/mL) and the ethyl acetate and methanolic extracts of callus showed inhibition against the strains of *Aeromonas hydrophila* (30 µg/mL and 125 µg/mL), *Acinetobacter baumannii* (1000 µg/mL and 60 µg/mL), *Candida albicans* (1000 µg/mL and 30 µg/mL) and *Candida parapsilosis* (60 µg / mL for both extracts). These results encourage the continued fractionation of leaf extracts and callus of this species in order to isolate the substances responsible for the activities.

Keywords: *Duroia macrophylla*, apurui, terpenes, sugar, steroids, callus.

Sumário

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1. A Família Rubiaceae.....	15
2.2 O Gênero <i>Duroia</i>	16
2.3 A espécie <i>Duroia macrophylla</i> Huber.....	18
2.4 Metabólitos secundários e cultura de tecidos vegetais <i>in vitro</i>	20
2.5 Calogênese e indução de calos <i>in vitro</i>	21
2.6 Atividade biológica em extratos vegetais.....	23
3 OBJETIVOS.....	25
3.1 Geral.....	25
3.2 Específicos.....	25
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	26
4.1 Coleta do material vegetal.....	26
4.2 Preparação dos Extratos das folhas e calos.....	27
4.3 Fracionamento do extrato hexânico das folhas.....	28
4.4 Análise Cromatográfica e fracionamento dos extratos dos calos.....	32
4.5 Análises de RMN e CL/EM.....	35
4.6 Ensaio antimicrobiano.....	35
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
5.1 Análise Cromatográfica do extrato hexânico das folhas e das suas frações.....	37
5.2 Análise Cromatográfica dos extratos dos calos de <i>D. macrophylla</i>	39
5.3 Análise de RMN das frações do extrato hexânico das folhas.....	40
5.4 Análise de RMN das frações e extratos dos calos de <i>D. macrophylla</i>	49
5.5 Análise de CL/EM dos extratos dos calos de <i>D. macrophylla</i>	56
5.6 Ensaio antimicrobiano.....	82
6 CONCLUSÃO.....	85
7 REFERÊNCIAS.....	86

Lista de Figuras

Figura 1: Substâncias isoladas a partir de <i>Duroia hirsuta</i>	17
Figura 2: Características morfológicas de <i>Duroia macrophylla</i> Huber.....	18
Figura 3: Folhas de <i>Duroia macrophylla</i>	19
Figura 4: Triterpenos com atividade antimicobacteriana.....	19
Figura 5: Exsicata de <i>Duroia macrophylla</i>	26
Figura 6: Fluxograma da preparação dos extratos das folhas.....	27
Figura 7: Fluxograma da preparação dos extratos dos calos.....	28
Figura 8: Coluna cromatográfica do extrato hexânico.....	29
Figura 9: Fluxograma do fracionamento do extrato hexânico das folhas de <i>Duroia macrophylla</i>	29
Figura 10: Fluxograma do fracionamento dos extratos dos calos de <i>Duroia macrophylla</i>	34
Figura 11: Cromatoplasmas do extrato hexânico das folhas de <i>Duroia macrophylla</i>	37
Figura 12: Cromatoplasmas das frações reunidas FHEX 19-24.....	38
Figura 13: Cromatoplasmas das frações reunidas FHEX 38-41.....	38
Figura 14: Cromatoplasmas das frações reunidas FHEX 73-82.....	38
Figura 15: Cromatoplasmas do extrato hexânico dos calos.....	39
Figura 16: Cromatoplasmas do extrato acetato de etila dos calos.....	39
Figura 17: Cromatoplasmas do extrato metanólico dos calos.....	40
Figura 18: Espectro de RMN de ¹ H da fração FHEX38-41(8-10) do extrato hexânico das folhas de <i>Duroia macrophylla</i>	41
Figura 19: Espectro de RMN de ¹ H da fração FHEX38-41(16-17) do extrato hexânico das folhas de <i>Duroia macrophylla</i>	42
Figura 20: Espectro de RMN de ¹ H da fração FHEX38-41(11-12)(3-4) do extrato hexânico das folhas de <i>Duroia macrophylla</i>	43
Figura 21: Espectro de RMN de ¹ H da fração FHEX38-41(4-7)(5) do extrato hexânico das folhas de <i>Duroia macrophylla</i>	45
Figura 22: Expansão do espectro de RMN de ¹ H da fração FHEX38-41(4-7)(5) do extrato hexânico das folhas de <i>Duroia macrophylla</i>	46

Figura 23: Espectro de RMN de H^1 do extrato hexânico dos calos de <i>Duroia macrophylla</i>	48
Figura 24: Espectro de RMN de H^1 do extrato acetato de etila dos calos de <i>Duroia macrophylla</i>	49
Figura 25: Espectro de RMN de H^1 do extrato acetato de etila dos calos de <i>Duroia macrophylla</i>	50
Figura 26: Espectro de RMN de 1H da fração CAcOEt (1)(2-3).....	52
Figura 27: Mapa de contorno HSQC da fração CAcOEt (1)(2-3).....	53
Figura 28: Mapa de contorno HMBC da fração CAcOEt (1)(2-3).....	53
Figura 29: Espectro de RMN de H^1 da fração CAcOEt (1)(14).....	54
Figura 30: Mapa de contorno HMBC da fração CAcOEt (1)(14).....	55
Figura 31: Mapa de contorno HMBC da fração CAcOEt (1)(14).....	55
Figura 32: Cromatograma da fração do extrato acetato de etila dos calos de <i>D. macrophylla</i>	56
Figura 33: Fragmentograma Pico 1, modo positivo, da fração CAcOEt 1 (SP).....	57
Figura 34: Fragmentograma Pico 1, modo negativo, da fração CAcOEt 1 (SP).....	57
Figura 35: Fragmentograma Pico 2, modo positivo, da fração CAcOEt 1 (SP).....	57
Figura 36: Fragmentograma Pico 2, modo negativo, da fração CAcOEt 1 (SP).....	57
Figura 37: Fragmentograma Pico 3, modo positivo, da fração CAcOEt 1 (SP).....	58
Figura 38: Fragmentograma Pico 3, modo negativo, da fração CAcOEt 1 (SP).....	58
Figura 39: Fragmentograma Pico 4, modo positivo, da fração CAcOEt 1 (SP).....	58
Figura 40: Fragmentograma Pico 4, modo negativo, da fração CAcOEt 1 (SP).....	58
Figura 41: Fragmentograma Pico 5, modo positivo, da fração CAcOEt 1 (SP).....	59
Figura 42: Fragmentograma Pico 5, modo negativo, da fração CAcOEt 1 (SP).....	59
Figura 43: Fragmentograma Pico 6, modo positivo, da fração CAcOEt 1 (SP).....	59
Figura 44: Fragmentograma Pico 6, modo negativo, da fração CAcOEt 1 (SP).....	59
Figura 45: Fragmentograma Pico 7, modo positivo, da fração CAcOEt 1 (SP).....	60
Figura 46: Fragmentograma Pico 7, modo negativo, da fração CAcOEt 1 (SP).....	60
Figura 47: Fragmentograma Pico 8, modo positivo, da fração CAcOEt 1 (SP).....	60
Figura 48: Fragmentograma Pico 8, modo negativo, da fração CAcOEt 1 (SP).....	60
Figura 49: Fragmentograma Pico 9, modo positivo, da fração CAcOEt 1 (SP).....	61
Figura 50: Fragmentograma Pico 9, modo negativo, da fração CAcOEt 1 (SP).....	61
Figura 51: Fragmentograma Pico 10, modo positivo, da fração CAcOEt 1 (SP).....	61

Figura 52: Fragmentograma Pico 10, modo negativo, da fração CAcOEt 1 (SP).....	61
Figura 53: Fragmentograma Pico 11, modo positivo, da fração CAcOEt 1 (SP).....	62
Figura 54: Fragmentograma Pico 11, modo negativo, da fração CAcOEt 1 (SP).....	62
Figura 55: Fragmentograma Pico 12, modo positivo, da fração CAcOEt 1 (SP).....	62
Figura 56: Fragmentograma Pico 12, modo negativo, da fração CAcOEt 1 (SP).....	62
Figura 57: Fragmentograma Pico 13, modo positivo, da fração CAcOEt 1 (SP).....	63
Figura 58: Fragmentograma Pico 13, modo negativo, da fração CAcOEt 1 (SP).....	63
Figura 59: Fragmentograma Pico 14, modo positivo, da fração CAcOEt 1 (SP).....	63
Figura 60: Fragmentograma Pico 14, modo negativo, da fração CAcOEt 1 (SP).....	63
Figura 61: Fragmentograma Pico 15, modo positivo, da fração CAcOEt 1 (SP).....	64
Figura 62: Fragmentograma Pico 15, modo negativo, da fração CAcOEt 1 (SP).....	64
Figura 63: Fragmentograma Pico 16, modo positivo, da fração CAcOEt 1 (SP).....	64
Figura 64: Fragmentograma Pico 16, modo negativo, da fração CAcOEt 1 (SP).....	64
Figura 65: Cromatograma da fração do extrato metanólico dos calos de <i>D. macrophylla</i>	65
Figura 66: Fragmentograma Pico 1, modo positivo, da fração CAcOEt 1 (SP).....	66
Figura 67: Fragmentograma Pico 1, modo negativo, da fração CAcOEt 1 (SP).....	66
Figura 68: Fragmentograma Pico 2, modo positivo, da fração CAcOEt 1 (SP).....	66
Figura 69: Fragmentograma Pico 2, modo negativo, da fração CAcOEt 1 (SP).....	66
Figura 70: Fragmentograma Pico 3, modo positivo, da fração CAcOEt 1 (SP).....	67
Figura 71: Fragmentograma Pico 3, modo negativo, da fração CAcOEt 1 (SP).....	67
Figura 72: Fragmentograma Pico 4, modo positivo, da fração CAcOEt 1 (SP).....	67
Figura 73: Fragmentograma Pico 4, modo negativo, da fração CAcOEt 1 (SP).....	67
Figura 74: Fragmentograma Pico 5, modo positivo, da fração CAcOEt 1 (SP).....	68
Figura 75: Fragmentograma Pico 5, modo negativo, da fração CAcOEt 1 (SP).....	68
Figura 76: Fragmentograma Pico 6, modo positivo, da fração CAcOEt 1 (SP).....	68
Figura 77: Fragmentograma Pico 6, modo negativo, da fração CAcOEt 1 (SP).....	68
Figura 78: Fragmentograma Pico 7, modo positivo, da fração CAcOEt 1 (SP).....	69
Figura 79: Fragmentograma Pico 7, modo negativo, da fração CAcOEt 1 (SP).....	69
Figura 80: Fragmentograma Pico 8, modo positivo, da fração CAcOEt 1 (SP).....	69
Figura 81: Fragmentograma Pico 8, modo negativo, da fração CAcOEt 1 (SP).....	69
Figura 82: Fragmentograma Pico 9, modo positivo, da fração CAcOEt 1 (SP).....	70
Figura 83: Fragmentograma Pico 9, modo negativo, da fração CAcOEt 1 (SP).....	70

Figura 84: Fragmentograma Pico 10, modo positivo, da fração CAcOEt 1 (SP).....	70
Figura 85: Fragmentograma Pico 10, modo negativo, da fração CAcOEt 1 (SP).....	70
Figura 86: Fragmentograma Pico 11, modo positivo, da fração CAcOEt 1 (SP).....	71
Figura 87: Fragmentograma Pico 11, modo negativo, da fração CAcOEt 1 (SP).....	71

Lista de Tabela

Tabela 1: Alguns exemplos de substâncias isoladas em espécies de Rubiaceae.....	16
Tabela 2: Massa dos extratos das folhas e rendimentos.....	28
Tabela 3: Massa dos extratos dos calos e rendimentos.....	28
Tabela 4: Sistemas de eluição fracionamento extrato hexânico das folhas.....	30
Tabela 5: Massa das frações reunidas do fracionamento do extrato hexânico.....	30
Tabela 6: Fracionamento das frações reunidas 19-24, 38-41 e 73-82.....	31
Tabela 7: Fracionamento das frações reunidas 19-24 (3) e 19-24 (4-5) do extrato dos calos.....	31
Tabela 8: Fracionamento das frações reunidas 38-41 (4-7) e 38-41 (11-12) do extrato dos calos.....	32
Tabela 9: Fracionamento do extrato dos hexânico dos calos	33
Tabela 10: Fracionamento das fração 1 do extrato acetato de etila dos calos de <i>D. macrophylla</i>	34
Tabela 11: Picos identificados no espectro de massas, modo positivo, para o extrato acetato de etila dos calos de <i>D. macrophylla</i>	72
Tabela 12: Picos identificados no espectro de massas, modo negativo, para o extrato acetato de etila dos calos de <i>D. macrophylla</i>	74
Tabela 13: Picos identificados no espectro de massas, modo positivo, para o extrato metanólico dos calos de <i>D. macrophylla</i>	77
Tabela 14: Picos identificados no espectro de massas, modo negativo, para o extrato metanólico dos calos de <i>D. macrophylla</i>	79
Tabela 15: Potencial antimicrobiano do extrato hexânico das folhas de <i>D. macrophylla</i> sobre diferentes cepas (CIM).....	83
Tabela 16: Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato acetato de etila e metanólico dos calos de <i>D. macrophylla</i> sobre diferentes cepas	83

Abreviaturas e símbolos

AcOEt – acetato de etila

Al₂O₃ – alumina

ATCC – *American Type Culture Collection*

CCDC – Cromatografia em Camada Delgada Comparativa

CC – Cromatografia em Coluna

CDCl₃ – clorofórmio deuterado

CHEX – Extrato hexânico dos calos

CL/EM – Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas

CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*

DCM – diclorometano

DMSO-*d*₆ – dimetilssulfóxido deuterado

FHEX – Extrato hexânico das folhas

Hex – hexano

MeOH – metanol

ppm – partes por milhão

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

SiO₂ – sílica

TMS – tetrametilsilano

UV – ultravioleta

¹H – Hidrogênio

¹³C – Carbono treze

δ – deslocamento químico

1 INTRODUÇÃO

Na busca por novos fármacos, os produtos naturais destacam-se pela diversidade estrutural, e assim, torna as plantas candidatas importantes para investigação de novas substâncias bioativas (GIORDANI *et al.*, 2008). Para tal investigação, é importante considerar as informações botânicas e quimiotaxonômicas das plantas, que favorecem o trabalho com a espécie vegetal escolhida (CLARDY & WALSH, 2004). Em continuidade, através da identificação de um extrato bioativo, este pode ser direcionado a um fracionamento biomonitorado por meio de ensaios farmacológicos e/ou biológicos *in vivo* ou *in vitro*, levando à purificação e isolamento, e por fim, a caracterização de substâncias biologicamente ativas (SOUZA *et al.*, 2012).

A partir da biodiversidade brasileira é possível desenvolver diferentes tipos de bioprodutos, entre eles medicamentos, cosméticos, inseticidas, defensivos agrícolas naturais, novos biomateriais, corantes, aromatizantes, novos produtos alimentares e outros. A pesquisa em bioprospecção, relacionada à descoberta de novas moléculas, tem avançado muito no Brasil, assim como, na região Amazônica, decorrente das atividades realizadas por diversos grupos de pesquisas em Química de Produtos Naturais em que plantas, animais e microrganismos têm sido estudados e centenas de novas moléculas têm sido descritas (ASTOLFI-FILHO *et al.*, 2014).

Visando a produção de metabólitos de interesse em extratos vegetais, técnicas de produção *in vitro*, como a cultura de células de plantas, vem sendo aplicadas e associadas a estudos fitoquímicos, a fim de se obter uma produção maior desses metabólitos dentro de um período de cultivo inferior quando comparado à planta, e, além disso, fornecendo condições para um ambiente favorável para a síntese de metabólitos em cada tipo de espécie, e ainda, uma produção constante desses metabólitos nas plantas (CROTEAU *et al.*, 2000; SANTOS, *et al.*, 2007).

Entre as plantas com grande potencial de bioatividade, estão aquelas pertencentes à família Rubiaceae. A família Rubiaceae é rica em metabólitos bioativos com grande potencial farmacológico, e podem ser utilizados como marcadores quimiotaxonômicos de gêneros e subfamílias. As substâncias encontradas são: iridoides, antraquinonas, triterpenos, alcaloides, como constituintes mais comuns (MARTINS & NUNEZ, 2015). Pertencente a esta família, encontra-se a espécie *Duroia macrophylla*, que tem sido investigada a fim de conhecer seu perfil químico e biológico e foi o alvo de estudo deste trabalho.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A Família Rubiaceae

A Família Rubiaceae possui cerca de 609 gêneros e 13.673 espécies (THE PLANT LIST, 2017), possui distribuição cosmopolita, sendo grande parte concentrada nos trópicos (MONGRAND *et al*, 2005). É a quarta maior família botânica entre as Angiospermas e uma das maiores na classe Magnoliopsida. Possui grande valor econômico, ornamental e medicinal na flora do Brasil, com cerca de 126 gêneros e 1.394 espécies (BARBOSA *et al*, 2015).

Os estudos fitoquímicos realizados com várias espécies de Rubiaceae nos últimos anos buscaram a caracterização, descrição e classificação das espécies incluindo estudos taxonômicos e determinação da sua origem botânica. A probabilidade de encontrar substâncias bioativas é facilitada através das informações botânicas e quimiotaxonômicas descritas uma vez que direciona a descoberta de novos medicamentos ou protótipos para futuros fármacos em estudos de bioprospecção de plantas (MARTINS & NUNEZ, 2015).

Dentre as classes químicas que podem ser encontradas em plantas desta família, estão os iridoides, alcaloides, antraquinonas, terpenoides (diterpenos e triterpenos), flavonoides e outros derivados fenólicos, com ênfase na produção de alcaloides com atividade biológica (FARIAS, 2006), que se destacam por serem metabólitos secundários que podem servir como modelos de drogas com efeitos farmacológicos importantes e usados para descobrir as respostas fisiológicas e mecanismos de ação (SIMÕES, 2004).

Essa família possui inúmeros gêneros de espécies com potenciais medicinais, algumas delas com valor histórico, como no caso da *Coffea* (DI STASI, 2003), onde a partir da *Coffea arabica* foi possível isolar a cafeína, substância que atua como estimulante do sistema nervoso central, bem como vasoconstritor, broncodilatador e diurético, além de ser um dos componentes de drogas contra enxaqueca. Ainda, do gênero *Cinchona*, da *Cinchona ledgeriana*, foi isolada a quinina, a qual possui propriedade antimalárica (VIEGAS *et al*, 2006).

Martins e Nunez (2015), através de uma revisão de estudos fitoquímicos realizados com espécies de Rubiaceae, apresentaram a diversidade de metabólitos já isolados da família, conforme observado na tabela 1.

Tabela 1: Exemplos de substâncias isoladas em espécies de Rubiaceae (MARTINS & NUNEZ, 2015)

<i>Gêneros</i>	<i>Classe</i>	<i>Substância</i>
<i>Cephaelis</i>	Alcaloide Alcaloide Alcaloide	Emetina Cefalina psicotrina
<i>Cinchona</i>	Alcaloide Triterpeno Triterpeno Alcaloide Alcaloide Alcaloide	Quinina ácido cinchólico ácido quinóvico quinidina cinconina cinconidina
<i>Coffea</i>	Metil-xantina Diterpeno Antraquinona Antraquinona Antraquinona	Caféina cafestol galiosina coapareolatina munjistina
<i>Corynanthe</i>	Alcaloide	yohimbina
<i>Galium</i>	Iridoide	mcedonina
<i>Genipa</i>	Monoterpeno	genipina
<i>Hedyotis</i>	Antraquinona	alizarina
<i>Landerbergia</i>	Alcaloide Alcaloide Alcaloide	quinidina cinconina cinconidina
<i>Morinda</i>	Antraquinona	alizarina
<i>Mussaenda</i>	Triterpeno	ácido arjunólico
<i>Oldenlandia</i>	Antraquinona	alizarina
<i>Psychotria</i>	Alcaloide	psicotrina
	Alcaloide	cefalina
<i>Relbunium</i>	Antraquinona	purpurina
<i>Remijia</i>	Alcaloide	quinidina
	Alcaloide	cinconina
	Alcaloide	cinconidina
<i>Rubia</i>	Antraquinona	purpurina
	Antraquinona	alizarina

2.2 O Gênero *Duroia*

Dentre os gêneros da família Rubiaceae, está o *Duroia*, que apresenta cerca de 30 espécies neotropicais, distribuídas desde a América Central, Colômbia, Guianas, Perú, Bolívia até o Brasil central. As espécies possuem frutos pistilados e solitários como característica exclusiva do gênero (TAYLOR *et al.*, 2004).

Nascimento (2013) realizou um levantamento de espécimes do gênero *Duroia*, sendo observado um total de 22 espécies de *Duroia* na Amazônia Brasileira sendo elas: *D. amapana*, *D. aquatica*, *D. duckei*, *D. eriopila*, *D. fusifera*, *D. genipoides*, *D. gransabanensis*, *D. hirsuta*, *D. hirsutissima*, *D. kotchubaeoides*, *D. longiflora*, *D. macrophylla*, *D. maguirei*, *D. micrantha*, *D. nitida*, *D. palustris*, *D. paraensis*, *D. petiulares*, *D. prancei*, *D. saccifera*, *D. triflora* e *D. velutina*.

De acordo com Taylor e colaboradores (2007), caracteristicamente o gênero apresenta árvores, arvoretas e arbustos, e ainda possui a presença de regiões ocas em seus ramos, que podem ser quadrangulares ou cilíndricas, e que servem de abrigo para várias espécies de formigas estabelecendo uma interação entre a planta e as mesmas, o que é geralmente comum em espécies do gênero *Duroia*.

Na literatura há poucos relatos de estudos fitoquímicos realizados com o gênero *Duroia*. Uma espécie já estudada é a *Duroia hirsuta*, onde foi isolado um iridoide lactona e flavonoides (AQUINO et al., 1999), assim como, um iridoide tetracíclico (PAGE, 1994). Ainda com a *D. hirsuta*, foi descrita a ação antibacteriana *in vitro*, sendo a mesma usada popularmente por agir como cicatrizante (LOPEZ, et al., 2001) e atividade contra o *Herpes simplex vírus* (KHAN et al., 2005). A figura 1 mostra as estruturas isoladas por Aquino e Page de *D. hirsuta*.

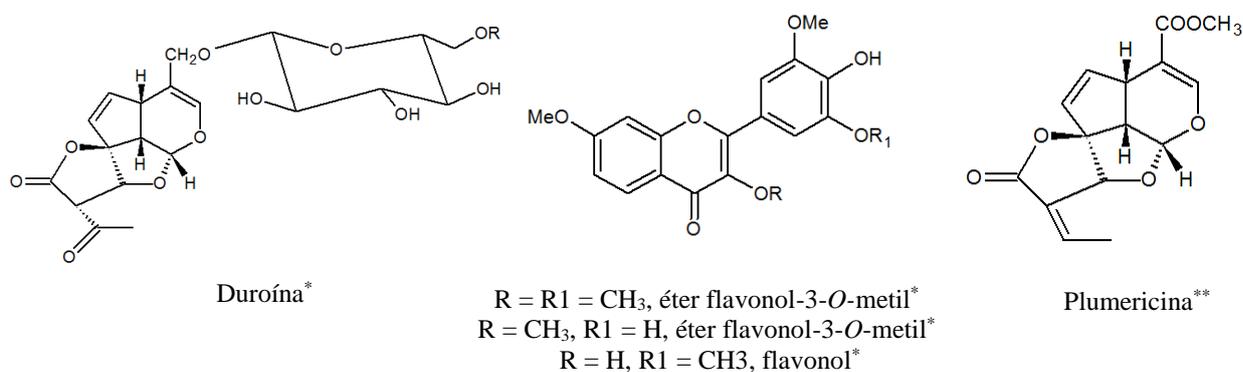


Figura 1: Substâncias isoladas a partir de *Duroia hirsuta* em estudos realizados por Aquino* e Page**.

Outra espécie desse gênero é a *D. macrophylla*, alvo do presente estudo.

2.3 A espécie *Duroia macrophylla* Huber

Popularmente conhecida como "cabeça-de-urubu", "apurui", ou "purui-grande-da-mata", esta espécie (figura 2) é encontrada na Região Amazônica, com ocorrência na porção centro-sul do Peru, Venezuela e Brasil. É uma espécie arbórea, frutífera comestível, não cultivada, presente em habitat de solo argiloso, úmido e margens de igarapé, e ainda em habitats diversos como em moitas de tucumã e cupiúba (NASCIMENTO, 2013).

Conforme descreve Taylor e colaboradores (2007), a espécie *D. macrophylla* apresenta as seguintes características morfológicas: árvores de 15 a 20 metros de altura, 12 a 25 centímetros de diâmetro, com tronco circular, base às vezes acanalada, digitada; ritidoma marrom a marrom avermelhado, levemente fissurado, escamoso; exterior da casca marrom ou bege, fibrosa, com 2 a 3 milímetros de espessura; casca internamente marrom, alaranjada ou rosada, com 3 a 5 milímetros de espessura; albarno bege ou alvo-alaranjado; odor forte; ramos quadrangulares, espessos, fistulosos, ferrugíneo-hirsutos; folhas ternadas, longamente pecioladas; pecíolo com 5 a 8,5 centímetros de comprimento; lâmina ovada a lanceolada com 30 a 40 × 14 a 24 centímetros, coriácea, ápice acuminado, base obtusa, face adaxial glabra exceto as nervuras seríceas, face abaxial pubérula com as nervuras tomentosas; nervuras laterais entre 18 e 21 pares, impressas na face adaxial; flores estaminadas pediceladas, corola creme; flores pistiladas não vistas; bagas solitárias, sésseis, subglobosas ou elipsóides, ferrugíneo-tomentosas; sementes orbiculares, comprimidas, e pubescentes. Algumas características estão ilustradas na figura 3.



Figura 2: Folhas de *Duroia macrophylla*. Foto: ZANCA, 2015

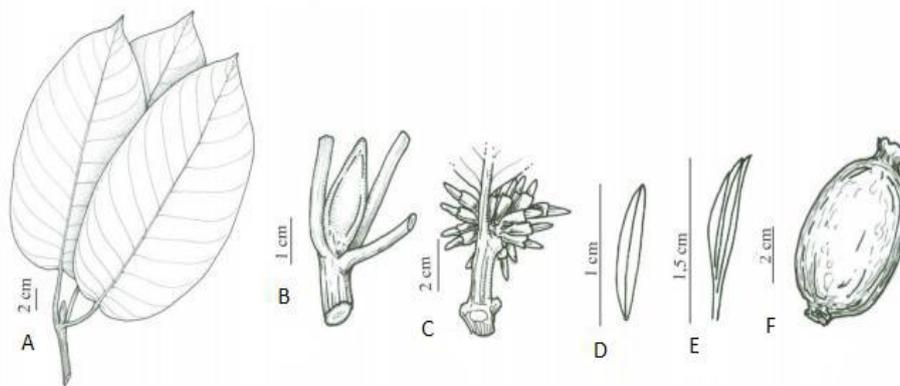


Figura 3: Características morfológicas de *Duroia macrophylla* Huber. A - ramo com folha ternada e estípula; B - estípula trisulcada; C - inflorescência; D - antera; E - estilete bífido; F - fruto com cálice persistente (NASCIMENTO, 2013).

A espécie *D. macrophylla* tem sido alvo de estudo do grupo de pesquisas “Sociedade-Natureza: bioprospecção, biotecnologia e dinâmicas econômicas e sociais”, do Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia, pertencente à Coordenação de Tecnologia e Inovação do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Como resultado foram isolados alcaloides indólicos a partir do extrato metanólico de folhas com ação tóxica contra *Artemia salina* (NUNEZ *et al.*, 2009), atividade antitumoral (NUNEZ & VASCONCELOS, 2012), dois triterpenos: o ácido oleanólico e ácido ursólico (figura 4), isolados dos extratos diclorometânicos das folhas, que apresentaram ação antimicrobiana contra *Mycobacterium tuberculosis*, agente causador da tuberculose (MARTINS *et al.*, 2013), assim como alcaloides indólicos isolados a partir de extratos metanólico e diclorometânico de galhos, que também apresentaram atividade contra o mesmo agente (MARTINS, *et al.*, 2014).

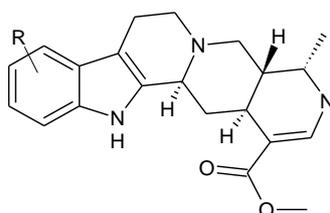


Figura 4: Estrutura química dos alcaloides indólicos isolados de extratos metanólicos de folhas com ação tóxica contra *A. salina* (NUNEZ *et al.*, 2009) e atividade antitumoral (NUNEZ & VASCONCELOS, 2012).

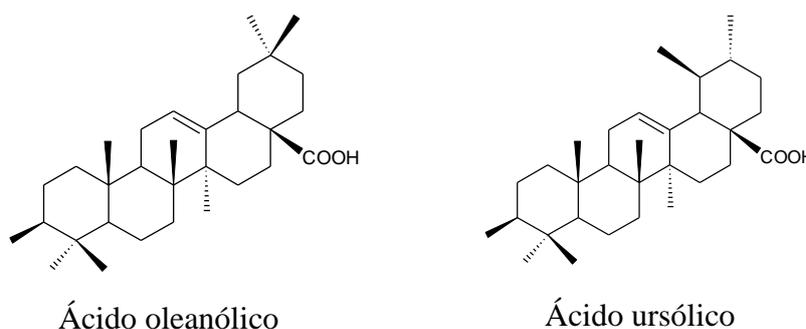


Figura 4: Triterpenos com atividade antimicrobiana isolados das folhas de *Duroia macrophylla* descritos pela primeira vez no gênero (MARTINS *et al.*, 2013).

Zanca (2016) realizou um estudo *in vitro* de indução de calos em explantes de folhas de *D. macrophylla*, preparação de extratos de calos de *D. macrophylla* e a análise química para verificar a presença de alcaloides e terpenos neles. Os calos foram extraídos com hexano e metanol e a presença de metabólitos secundários foi avaliada por cromatografia em camada fina e análise de RMN de ¹H. A análise química preliminar sugeriu que ambos os extratos dos calos não continham alcaloides, mas terpenos. Sendo assim, serão necessários mais estudos para induzir a produção de alcaloides nos calos de *D. macrophylla*, onde o uso de elicitores, ou outros métodos, poderiam induzir a produção desses metabólitos.

Com isso, a busca por moléculas inéditas e/ou conhecidas que apresentem propriedades biológicas tem levado o grupo de pesquisa a dar continuidade nos estudos de bioprospecção com *D. macrophylla*.

2.4 Metabólitos secundários e cultura de tecidos vegetais *in vitro*

Dentre as substâncias que podem ser encontradas nas plantas, as de interesse fitoquímico são produzidas a partir do metabolismo secundário, sendo estas produzidas em menor quantidade em relação ao metabolismo primário. Segundo Fumagali e colaboradores (2008), os metabólitos secundários têm sido sumariamente definidos como substâncias pouco abundantes, com uma frequência inferior a 1% do carbono total, ou pelo fato de sua estocagem ocorrer em órgãos ou células específicas.

Estas moléculas são produzidas por diversas rotas metabólicas e são respostas adaptativas de cada espécie ou grupo de plantas ao ambiente. Estes metabólitos podem apresentar atividades biológicas usadas pela planta no seu desenvolvimento, adaptação e/ou proteção. Esta característica adaptativa da planta, para alterar o seu metabolismo secundário, é o que proporciona a diversidade de metabólitos encontrados entre as mesmas. E isto, é o que justifica a constante busca por substâncias ativas. Alcaloides, terpenos e flavonoides são alguns exemplos de metabólitos secundários que possuem grande importância econômica devido à utilização na indústria farmacêutica (CEQUINEL FILHO & YUNES, 1998).

A produção dos metabólitos secundários é afetada pelos fatores ambientais aos quais a planta está exposta, como o local e época de coleta, polinizadores diferentes, exposição ao sol, entre outros fatores ambientais (GOBBO-NETTO & LOPES, 2007).

Para a produção de substâncias naturais de interesse em maiores escalas e padronizadas, as indústrias farmacêuticas buscam cada vez mais por novas tecnologias que correspondam econômica e qualitativamente às demandas. Uma alternativa eficaz para a obtenção destes produtos, neste contexto, é a tecnologia da cultura de células e tecidos vegetais *in vitro*, que assegura um controle mais rigoroso do rendimento e da qualidade da produção das substâncias bioativas, além da conservação dos recursos genéticos (ROBERTO & FRANCESCA, 2011).

O cultivo de tecidos trata-se de um conjunto de técnicas que permitem a cultura de órgãos, tecidos, células e protoplastos em condições assépticas, empregando meios nutritivos artificiais. Essas técnicas podem ser aplicadas para a obtenção de plantas livres de patógenos, propagação massiva de plantas, conservação de germoplasma, melhora por mutagênese *in vitro* e engenharia genética (MORAIS *et al.*, 2012).

Através da cultura de células de plantas, podem-se sintetizar metabólitos secundários dentro de um período de cultivo de poucas semanas, o que é bastante favorável quando comparado à produção na planta, em que o espaço de tempo para o acúmulo destes metabólitos pode variar de uma estação para plantas anuais ou diversos anos no caso das plantas perianuais, como as árvores, por exemplo (CROTEAU *et al.*, 2000). Estudos fitoquímicos de diversas espécies com potencial biológico podem ser facilitados por meio de culturas de células vegetais (SANTOS *et al.*, 2007).

2.5 Calogênese e Indução de calos *in vitro*

Na natureza, as plantas podem gerar calo em resposta a um estresse, causado por ferimento ou infecção patogênica. A formação de calo, também denominada calogênese, pode também ser induzida *in vitro* por níveis elevados de reguladores de crescimento, onde ocorre a desdiferenciação das células do explante, que são induzidas a retornarem ao estado inicial meristemático (VIJAYASREE, 2010).

As plantas, através de suas células somáticas, são capazes de desenvolver crescimento e/ou indiferenciação celular induzida pelo meio, para retomarem a divisão celular e produzirem novas plantas. Esta capacidade é explicada pelo conceito da totipotência, onde qualquer célula vegetal possui a capacidade de formar uma nova planta (CANHOTO, 2010).

Os grupos de células não diferenciadas podem ser chamadas de calo, onde correspondem a uma massa de células desorganizadas e parcialmente indiferenciadas que apresentam tipo, tamanho, conteúdo celular e espessura da parede variada (NARAYANASWAMY, 1977) e podem ser induzidos por meio de qualquer tecido vegetal, usado como explante (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

As regiões do explante que sofrem sinalização se estabelecem primeiramente na periferia do explante isolado e, de forma gradativa, em pontos internos do tecido, onde camadas e regiões de crescimento ativo, na forma de cunhas, passam a se formar e, dependendo do balanço dos reguladores de crescimento utilizados no meio de cultura, diversos tipos celulares do explante poderão se desdiferenciar, caracterizando assim o novo sistema que passa a ser chamado de calo (TERMIGNONI, 2005).

Conforme Aitchinson *et al.* (1977) e Stafford e Warren (1991), o estabelecimento da cultura de calos a partir de explantes como raízes, caules, folhas, flores, e outras partes vegetais, é dividido nas etapas de: indução, que é a preparação do tecido isolado com a ativação do metabolismo para a desdiferenciação e divisão celular (mitose); divisão propriamente dita, em que as células dividem-se ativamente em células de tamanho menor, iniciando pelas áreas periféricas e posteriormente ocupando a região central do explante; e desdiferenciação, onde o tecido perde sua identidade histológica, as células tornam-se maiores, vacuolizadas, a taxa de divisão celular diminui e então ocorre o equilíbrio entre a divisão e a expansão celular.

Para que o potencial da totipotência seja expresso na sua totalidade, é necessário fornecer ao explante as condições nutricionais e a devida sinalização hormonal. É normalmente utilizado como base, o meio de cultura desenvolvido por Murashige e Skoog (1962) (meio MS), composto de macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, ferro, EDTA, fonte de carbono e a presença ou não de um agente geleificante (para meios sólidos ou semi-sólidos).

O pH do meio também é importante, pois afeta a absorção dos nutrientes e reguladores de crescimento presentes no meio de cultura. Murashige e Skoog (1962) recomendam o ajuste do pH entre 5.7 e 5.8, porém algumas espécies como as bromeliáceas podem ter ajuste de pH entre 6.5 a 7.

Segundo Taiz e Zeiger (2013), as composições do meio de cultura, especialmente dos reguladores de crescimento, têm efeitos profundos sobre a resposta do explante nas diferentes fases do cultivo *in vitro*. Os reguladores de crescimento são responsáveis pela

determinação do desenvolvimento de células, tecidos ou plantas em meio de cultura. As auxinas e citocininas são as duas classes de reguladores de crescimento mais utilizadas. A concentração e combinação dos diferentes tipos de auxinas e citocininas para suplementar o meio de cultura, dependem principalmente da espécie da planta, do tipo de tecido ou órgão e do objetivo da pesquisa.

Esses reguladores de crescimento, auxinas e citocinas, são um grupo de moléculas de ocorrência natural nos tecidos vegetais e seus análogos sintéticos, que possuem ação de sinalizadores, influenciando os diferentes estágios do desenvolvimento da planta. Para a cultura de células e tecidos vegetais *in vitro*, a utilização de reguladores de crescimento adicionados ao meio de cultura é necessária para garantir que o objetivo do estudo seja alcançado (TAIZ & ZEIGER, 2013).

2.6 Atividade biológica em extratos vegetais

As doenças ou lesões ocasionadas por bactérias são resultado da presença de toxinas que estas produzem ou quando as mesmas invadem sítios anatômicos que são normalmente estéreis. Os mecanismos das interações entre um microrganismo infectante e o hospedeiro humano são complexos, a capacidade de aderência microbiana, o sítio de exposição e a habilidade do hospedeiro em responder ao micro-organismo, determinam o resultado da interação (VERONESI & FOCACCIA, 2002).

É importante a investigação e busca por novas substâncias com ação antimicrobiana a fim de inibir a resistência de muitos microrganismos a antibióticos, além de controlar ou diminuir a ação de muitos desses agentes patogênicos. Metabólitos secundários de plantas demonstraram seu potencial como antibacterianos quando usados sozinhos ou em sinergia com outros metabólitos, e ainda potencializadores de outros agentes antibacterianos. O uso de produtos fitoquímicos e extratos de plantas como agentes modificadores de resistência representa um tema de pesquisa cada vez mais ativo (DAVIES & DAVIES, 2010).

É possível identificar a propriedade de um extrato vegetal ou uma substância pura isolada a partir da verificação da sua atividade biológica. Até a produção de um novo medicamento, são realizadas etapas de suma importância, sendo elas: avaliação *in vitro*, pré-clínicas e clínicas, onde são realizadas em células, animais e seres humanos, respectivamente (HOUGHTON, 2000).

Assim, é de grande relevância o desenvolvimento e emprego de métodos iniciais de avaliação biológicas *in vitro*, que sejam reprodutíveis e rápidos e com isso, gerar resultados com um número de réplicas suficiente para efetuar a análise estatística, como o caso dos testes antibacterianos, antioxidantes e de toxicidade frente à *Artemia salina* (BRISKIN, 2000).

Tendo em vista o potencial biológico da espécie *Duroia macrophylla*, comprovado pelos estudos prévios realizados pelo grupo de pesquisas, sua abundância na região Amazônica e promissor potencial medicinal, esta espécie foi selecionada para este estudo.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Realizar o estudo químico e biológico do extrato hexânico das folhas e dos extratos acetato de etila e metanólico dos calos de *Duroia macrophylla* Huber.

3.2 Específicos

Realizar o estudo fitoquímico do extrato hexânico das folhas e dos extratos acetato de etila e metanólico dos calos de *D. macrophylla* Huber;

Realizar a avaliação da atividade antimicrobiana do extrato hexânico das folhas e dos extratos dos calos de *D. macrophylla* Huber.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os extratos hexânicos das folhas escolhidos para realizar este estudo foram provenientes da reunião de 12 extratos, oriundos de 12 coletas realizadas durante 1 ano, e os extratos dos calos obtidos *in vitro* de *Duroia macrophylla*, todos os extratos foram provenientes da dissertação de Sabrina Schumacker Zanca (2015).

4.1 Coleta do material vegetal (dissertação de Sabrina Schumacker Zanca)

As folhas da espécie *D. macrophylla* foram coletadas na Reserva Florestal A. Ducke, localizada a 26 km NE de Manaus, na rodovia AM-010, Amazonas, em parcelas diferentes da reserva (regiões em declive e em platô, localizados próximos à trilha,) realizadas mensalmente entre abril de 2013 e março de 2014. O material de cada coleta foi levado ao Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, recebeu uma numeração diferenciada e, conseqüentemente, resultou em extratos diferentes armazenados em geladeira.

A exsicata do material coletado foi armazenada no Herbário da Coordenação de Pesquisas em Botânica do INPA, número de depósito 259228 (figura 5), sendo a taxonomia da espécie confirmada pela especialista em rubiáceas Dra. Charlotte M. Taylor, do Missouri Botanical Garden, St. Louis – USA.



Figura 5: Exsicata de *Duroia macrophylla* depositada no herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, número de depósito 259228. Foto: ZANCA, 2015.

4.2 Preparação dos Extratos das folhas e calos

As folhas coletadas foram levadas ao Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), foram secas em estufa numa temperatura média de 40 °C por aproximadamente 2 dias e posteriormente trituradas em moinho de facas (Tecnal, Willye TE-650). Para o preparo dos extratos, o material vegetal foi extraído com solventes: hexano e metanol, de três a quatro vezes, utilizando-se ultrassom (Unique) por 20 minutos. Para a concentração dos extratos foi utilizado o rota-evaporador (Fisatom) sob pressão reduzida, em temperatura média de 40 °C (figura 6). Estes extratos foram preparados para a dissertação de Sabrina Schumacker Zanca (2015).

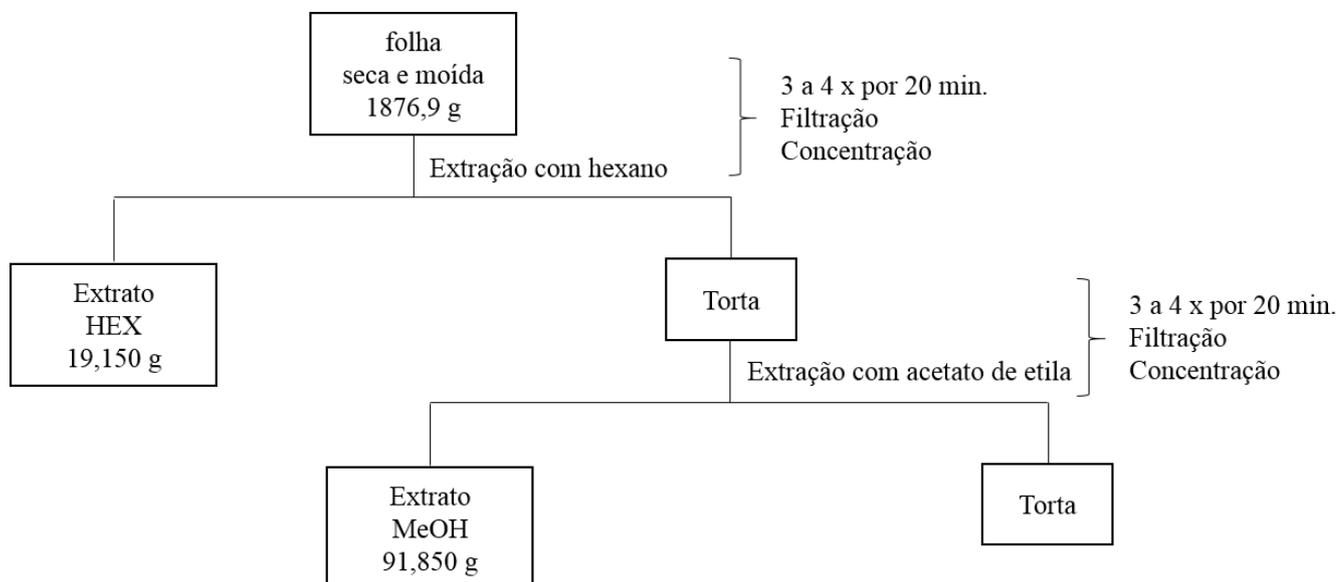


Figura 6: Fluxograma da preparação dos extratos das folhas

Os calos, obtidos de explantes foliares por meio de cultura de tecidos *in vitro*, foram reunidos e liofilizados, para a dissertação de Sabrina Schumacker Zanca (2015). Após a liofilização dos mesmos, foram realizadas extrações químicas com os solventes: hexano, acetato de etila e metanol, por três a quatro vezes, utilizando-se ultrassom (Unique) por 20 minutos. Para concentração dos extratos foi utilizado o rota-evaporador (Fisatom) sob pressão reduzida, em temperatura média de 40 °C (figura 7). Este procedimento foi realizado com dois cultivos diferentes de calos. O primeiro fez parte da dissertação de Sabrina Schumacker Zanca (2015) e o segundo foi realizado como parte desta dissertação.

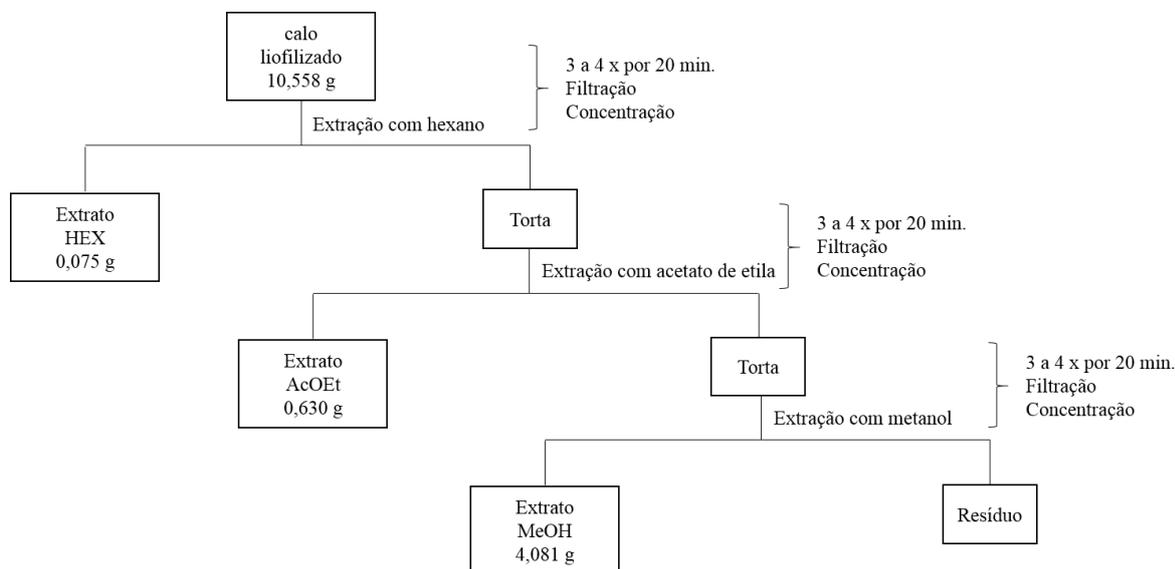


Figura 7: Fluxograma da preparação dos extratos dos calos

Tabela 2: Massa dos extratos das folhas e rendimentos.

Folhas secas e moídas: 1876,9 g		
Extrato	Massa (g)	Rendimento (%)
Hex	19,150	1,020
MeOH	91,850	4,893

Tabela 3: Massa dos extratos dos calos e rendimentos.

Calos liofilizados: 10,558 g		
Extrato	Massa (g)	Rendimento (%)
Hex	0,075	0,710
AcOEt	0,630	5,967
MeOH	4,081	38,653

4.3 Fracionamento do extrato hexânico das folhas (início do estudo químico)

O extrato hexânico das folhas de *D. macrophylla* (F HEX) foi analisado por CCDC, usando cromatofolhas de alumínio, com sílica gel 60 com indicador de fluorescência UV 254 nm (marca Macherey – NAGEL – MN), como fase estacionária e eluídas com misturas de solventes orgânicos em ordem crescente de polaridade.

Foram usados reveladores químicos como: anisaldeído sulfúrico, sulfato cérico e reagente de Dragendorff e os reveladores físicos: luz ultravioleta (254 e 365 nm), para

conhecer o perfil químico da amostra em diversos sistemas de eluição e com isto, estimar o seu comportamento em uma coluna cromatográfica.

Foram usados 12 g do extrato hexânico das folhas para fracionamento por meio de Cromatografia em Coluna (CC), com as dimensões de 60,0 cm por 5,0 cm, usando 240 g de gel de sílica 60 (230-400 mesh), figura 8. Como sistemas de eluição foram usadas misturas de solvente orgânicos: Hex, DCM, AcOEt, acetona e MeOH conforme a Tabela 4. O fracionamento resultou em 107 frações, que foram reunidas em 11 frações (Tabela 5) após serem analisadas por CCDC, as que se mostraram interessantes foram fracionadas. A figura 9 mostra o fluxograma geral do fracionamento do extrato hexânico das folhas de *D. macrophylla*.

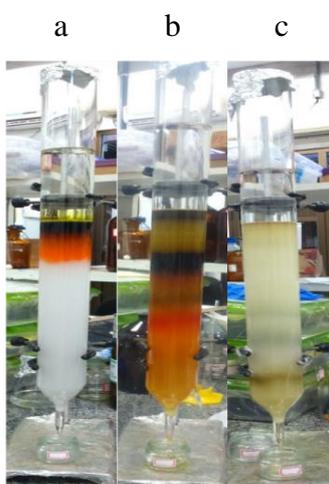


Figura 8: Coluna cromatográfica do extrato hexânico das folhas de *Duroia macrophylla*, durante as fases de início (a), meio (b) e fim (c).

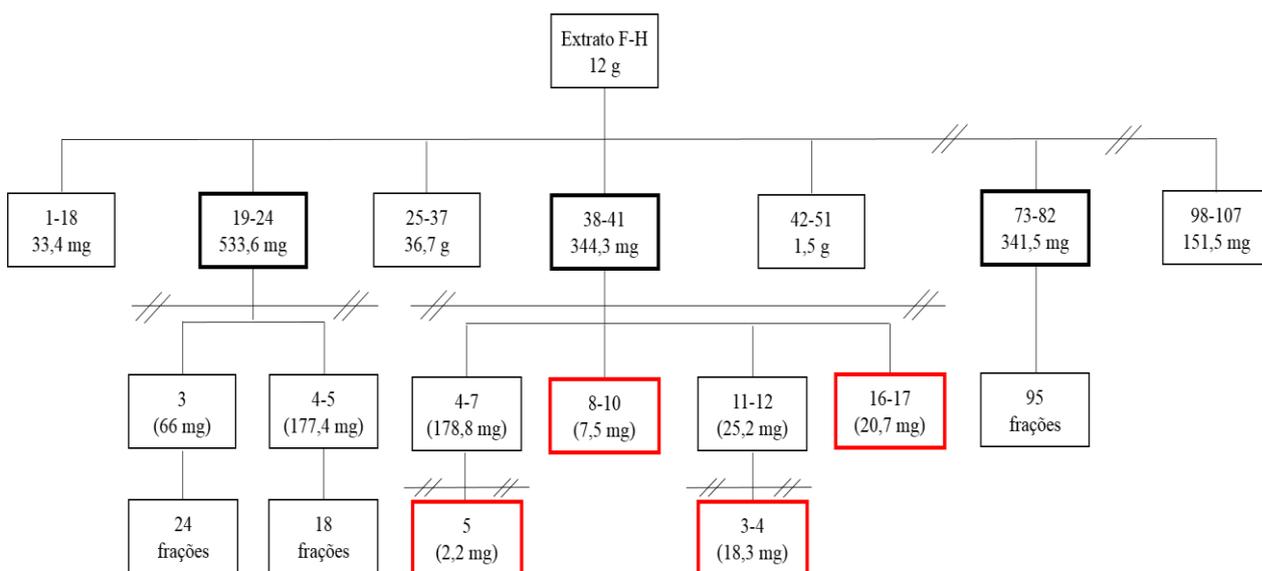


Figura 9: Fluxograma do fracionamento do extrato hexânico das folhas de *D. macrophylla*. Em destaque, as frações que foram enviadas para análise de RMN de ^1H .

Tabela 4: Sistemas de eluição utilizados no fracionamento do extrato hexânico das folhas

Sistemas de eluição	Volume	Frações coletadas
Hex 100%	400 mL	1-18
Hex/DCM 50:50	300 mL	19-32
DCM 100%	300 mL	22-43
DCM/AcOEt 50:50	400 mL	44-64
AcOEt 100%	200 mL	65-73
AcOEt/Acetona 50:50	200 mL	74-81
Acetona 100%	100 mL	82-86
Acetona/MeOH 50:50	100 mL	87-92
MeOH 100%	200 mL	93-107

Tabela 5: Massas das frações reunidas do fracionamento do extrato hexânico

Frações reunidas	Massa (g)
1-18	0,0334
19-24	0,5336
25-37	0,0367
38-41	0,3443
42-51	1,5
52-64	0,7895
65-72	2,1
73-82	0,3415
83-94	0,2934
95-97	0,4138
98-107	0,1515

As frações obtidas da primeira coluna do extrato hexânico das folhas, denominadas: FHEX 19-24 (fração 19-24; 533,6 mg), FHEX 38-41 (fração 38-41; 344,3 mg) e FHEX 73-82 (fração 73-82; 341,5 mg) foram analisadas por CCDC e então reunidas para um novo fracionamento como especificado na Tabela 6.

Tabela 6: Fracionamentos das frações reunidas 19-24, 38-41 e 73-82 do extrato hexânico das folhas

Fração	Adsorvente	Dimensões da coluna (h x ϕ)	Eluentes utilizados	Volume (eluente)	Frações coletadas
FHEX 19-24 (533,6 mg)	Sílica gel 60 (53,3 g)	29,3 x 2,5 cm	Hex 100%; Hex/AcOEt 95:05, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, 70:30, 65:35, 60:40, 50:50; AcOEt 100%, AcOEt/MeOH 80:20; MeOH 100%	400 mL	89
FHEX 38-41 (344,3 mg)	Sílica gel 60 (34,4 g)	28,6 x 2,1 cm	Hex 100%; Hex/AcOEt 95:05, 90:10, 80:20, 70:30, 50:50; AcOEt 100%; AcOEt/MeOH 50:50	75 mL	30
FHEX 73-82 (341,5 mg)	Sílica gel 60 (34,0 g)	29,3 x 2,5 cm	Hex 100%; Hex/AcOEt 95:05, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, 70:30, 65:35, 60:40, 50:50; AcOEt 100%, AcOEt/MeOH 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50; MeOH 100%	160 mL	95

O fracionamento da FHEX 19-24 (533,6 mg) gerou 89 frações que foram analisadas e reunidas por semelhança química em CCDC. A fração 3, denominada de FHEX 19-24(3) e a fração reunida 4-5 denominada de FHEX 19-24(4-5), apresentaram indícios de metabólitos secundários de interesse e foram fracionadas por meio de CC, conforme especificado na Tabela 7.

Tabela 7: Fracionamentos das frações 19-24 (3) e 19-24 (4-5)

Fração	Adsorvente	Dimensões da coluna (h x ϕ)	Eluentes utilizados	Volume (eluente)	Frações coletadas
FHEX 19-24 (3) (66,0 mg)	Sílica gel 60 (6,6 g)	11,3 x 1,4 cm	Hex 100%; Hex/AcOEt 95:05, 90:10, 80:20, 70:30, 50:50; AcOEt 100%; AcOEt/MeOH 90:10, 70:30; MeOH 100%	20 mL	24
FHEX 19-24 (4-5) (177,4 mg)	Sílica gel 60 (17,7 g)	31,8 x 2,5 cm	Hex 100%; Hex/AcOEt 95:05, 90:10, 85:15, 70:30, AcOEt 100%; AcOEt/MeOH 90:10	60 mL	18

A partir do fracionamento da fração FHEX 38-41 (344,3 mg) foram obtidas 30 frações que foram analisadas e reunidas por semelhança química em CCDC. As frações reunidas denominadas de FHEX 38-41(4-7), FHEX 38-41(11-12) tiveram seu fracionamento continuado (Tabela 8) e as frações reunidas denominadas de FHEX 38-41(8-10) e FHEX 38-41(16-17) foram enviadas para análise de RMN de ^1H .

Tabela 8: Fracionamentos das frações 38-41 (4-7) e 38-41 (11-12)

Fração	Adsorvente	Dimensões da coluna (h x ø)	Eluentes utilizados	Volume (eluyente)	Frações coletadas
FHEX 38-41(4-7) (178,8 mg)	Sílica gel 60 (17,88 g)	31,8 x 2,5 cm	Hex 100%; Hex/AcOEt 95:05, 90:10, 80:20; AcOEt 100%	40 mL	15
FHEX 38-41(11-12) (25,2 mg)	Sílica gel 60 (2,5 g)	20,0 x 0,6 cm	Hex 100%; Hex/AcOEt 95:05, 90:10, AcOEt 100%	20 mL	12

Após a análise de CCDC das frações resultantes dos fracionamentos realizados, foi enviada para análise de RMN de ¹H a fração 5, proveniente do fracionamento da fração FHEX 38-41 (4-7) e a fração reunida 3-4 proveniente do fracionamento da fração FHEX 38-41 (11-12).

Quanto ao fracionamento realizado com a fração FHEX 73-82 (341,5 mg) as frações obtidas foram analisadas e as que apresentaram perfil químico semelhante foram reunidas após a CCDC.

4.4 Análises Cromatográficas e fracionamento dos extratos dos calos

Os extratos hexânico (CHEX), acetato de etila (CAcOEt) e metanólico (CMeOH) dos calos de *D. macrophylla* foram analisados por CCDC, usando cromatofolhas de alumínio, com sílica gel 60 com indicador de fluorescência UV 254 nm (marca Macherey – NAGEL – MN), como fase estacionária e eluídas com misturas de solventes orgânicos em ordem crescente de polaridade.

Foram usados reveladores químicos como: anisaldeído sulfúrico e sulfato cérico e os reveladores físicos: luz ultravioleta (254 nm e 365 nm), para conhecer o perfil químico da amostra e definir o fracionamento cromatográfico.

O extrato hexânico dos calos foi fracionado por meio de CC conforme especificado na Tabela 9.

Tabela 9: Fracionamento do extrato hexânico dos calos de *D. macrophylla*

Fracionamento	Adsorvente	Dimensões da coluna (h x ø)	Eluentes utilizados	Volume (eluente)	Frações coletadas
CHEX (75,2 mg)	Sílica gel 60 (7,5 g)	13,5 x 2,5 cm	Hex 100%; Hex/AcOEt 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50; AcOEt 100%; AcOEt/Acetona 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50; Acetona 100%	20 mL	27
CHEX(2-6) (25,5 mg)	Alumina (3,0 g)	12,0 x 0,6 cm	Hex 100%; Hex/AcOEt 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50; AcOEt 100%, AcOEt/MeOH 90:10, 80:20, 60:40; MeOH 100%	12 mL	33

No fracionamento da fração CHEX(2-6), devido a amostra ser surpreendentemente muito polar interagindo fortemente com a sílica, e ficar retida na placa cromatográfica, foi utilizada alumina como fase estacionária.

As frações obtidas do fracionamento do extrato hexânico dos calos foram analisadas e as que apresentaram perfil químico semelhante foram reunidas após a CCDC.

Os extratos acetato de etila e metanólico dos calos de *D. macrophylla* foram submetidos a um processo de purificação em cartucho Sep-Pak C₁₈ de 50 mg cada um separadamente. O cartucho foi condicionado previamente com metanol 100% e foi usado o mesmo como solvente, obtendo-se 21 frações desse processo.

Da fração 1 (aproximadamente 72 mg) proveniente de cada extrato em que foi empregada a Sep-Pak, foi retirada uma alíquota de 2 mg que foi enviada para a análise de Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas (CL/EM).

Os 70 mg restantes da fração 1 proveniente do extrato acetato de etila foram fracionados por CC conforme especificado na Tabela 10:

Tabela 10: Fracionamento da fração 1 do extrato acetato de etila dos calos de *D. macrophylla*

Fracionamento Fração	Adsorvente	Dimensões da coluna (h x ø)	Eluentes utilizados	Volume (eluyente)	Frações coletadas
C AcOEt (1) (70,0 mg)	Sílica gel 60 (7,0 g)	21,6 x 2,7 cm	Hex/AcOEt 30:70, 40:60, 50:50; AcOEt 100%, AcOEt/MeOH 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50; MeOH 100%	10 mL	29

As frações obtidas foram analisadas por CCDC e as que apresentaram perfil químico semelhante foram reunidas. Destas, a fração reunida 2-3 e a fração 14, denominadas de C AcOEt (1) (2-3) e C AcOEt (1) (14), respectivamente, foram enviadas para análise de RMN de ^1H e ainda bidimensionais.

A figura 10 mostra o fluxograma geral do fracionamento realizado com os extratos dos calos de *D. macrophylla*.

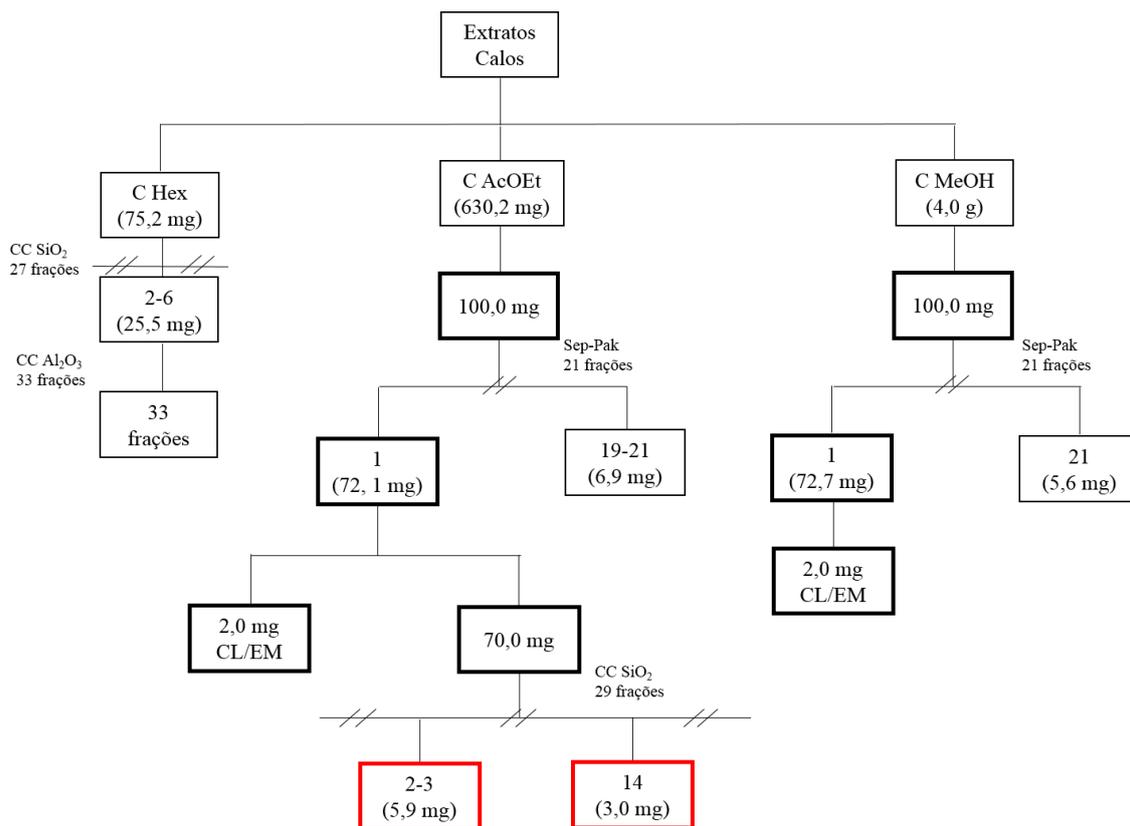


Figura 10: Fluxograma do fracionamento dos extratos dos calos de *D. macrophylla*. Em destaque, as frações que foram enviadas para análise de RMN de ^1H e bidimensionais.

4.5 Análises de RMN e CL/EM

Os extratos hexânico, acetato de etila e metanólico dos calos e as frações selecionadas para análise de RMN de ^1H provenientes do fracionamento do extrato hexânico das folhas e dos extratos dos calos de *D. macrophylla* foram realizados no espectrômetro Bruker Fourier 300, operando em 300 MHz. As amostras provenientes das folhas foram dissolvidas em clorofórmio deuterado e as amostras dos calos foram dissolvidas em DMSO- d_6 . Como padrão interno foi utilizado TMS.

Do extrato hexânico das folhas foram analisadas as frações FHEX 38-41(8-10), FHEX 38-41(16-17), FHEX 38-41(4-7)(5), e FHEX 38-41(11-12)(3-4). Em relação as frações dos extratos dos calos foram enviadas as frações: CAcOEt(1)(2-3) e CAcOEt(1)(14), do extrato acetato de etila.

Para a análise de CL/EM, as amostras foram analisadas em cromatógrafo Modelo Prominence UFLC (Shimadzu), equipado com bomba binária LC-20AT, detector de arranjo de diodos (DAD) SPD-20A e injetor automático SIL-20A. As condições usadas foram: coluna Luna $5\mu\text{m}$ C18(2) 250 x 4,6 cm; concentração de 1 mg/mL (ACN: MeOH); fluxo de 1 mL/min [Split de 0,15 mL (MS)/0,85mL (desc)]; volume de injeção = 8 μL ; pressão de 1529 psi; forno a 35 °C; Bomba A com H₂O 0,1% de ácido fórmico; Bomba B com ACN 0,1% de ácido fórmico e Injetor ACN. Os gradientes de eluição foram de: 2-40% (0-24 minutos), 40-100% (24-34 minutos), 100% (34-35 minutos), 100-2% (35-42 minutos) e 2% (42-44 minutos). O ácido fórmico foi usado como calibrante.

As amostras também foram analisadas em Espectrômetro de massas Marca Bruker, modelo micro TOF-Q II, analisador Time Of Flight. Fonte ESI em modo positivo e negativo. Resolução de 17500 (FWHM). Programa Compass, versão 4.1, para controle, aquisição e processamento de dados.

Os parâmetros de aquisição para o modo positivo foram: Source Type ESI; Focus Not active; Scan Begin 100 m/z ; Scan End 900 m/z ; Ion Polarity Positive; Set Capillary 4500 V; Set End Plate Offset -500 V; Set Collision Cell RF 100.0 Vpp; Set Nebulizer 5.0 Bar; Set Dry Heater 200 °C; Set Dry Gas 10.0 l/min; Set Divert Valve Waste. Para o modo negativo foram: Source Type ESI; Focus Not active; Scan Begin 100 m/z ; Scan End 900 m/z ; Ion Polarity Negative; Set Capillary 2600 V; Set End Plate Offset -500 V; Set Collision Cell RF 100.0 Vpp; Set Nebulizer 5.0 Bar; Set Dry Heater 200 °C; Set Dry Gas 10.0 l/min, Set Divert Valve Waste.

4.6 Ensaio antimicrobiano

O ensaio de atividade antimicrobiana foi realizado conforme a metodologia descrita na CLSI (2003) e Eloff (1998), para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foram utilizados o extrato hexânico das folhas de *D. macrophylla* e os extratos acetato de etila e metanólico de seus calos.

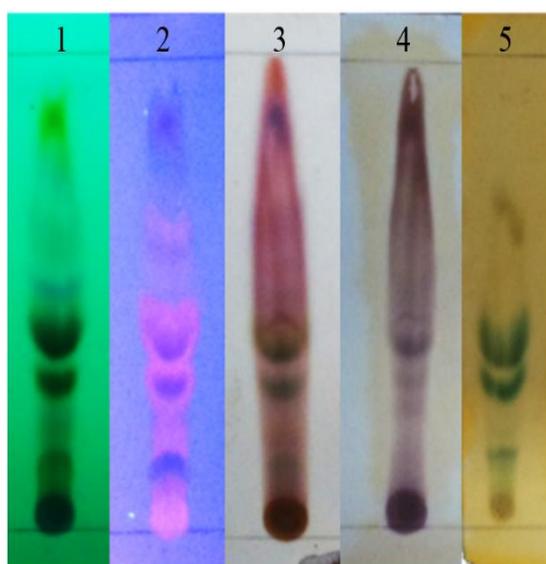
Para o ensaio antimicrobiano foram utilizadas cepas das seguintes bactérias: *Aeromonas hydrophila* (IOC/FDA 110-36), *Acinetobacter baumannii* (ATCC 19606), *Citrobacter freundii* (ATCC 8090), *Edwardsiella tarda* (ATCC 15947), *Enterobacter cloacae* (ATCC 13047), *Escherichia coli* (ATCC 11775), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Propionibacterium acnes* (ATCC 6919), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145), *Pseudomonas fluorescens* (ATCC 13525), *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076), *Staphylococcus aureus* (ATCC 12600), *Serratia marcescens* (ATCC 13880), *Yersinia enterocolitica* (ATCC 9610), e ainda, as leveduras *Candida albicans* (ATCC 10231) e *Candida parapsilosis* (ATCC 22019).

O extrato hexânico das folhas de *D. macrophylla* e os extratos acetato de etila e metanólico dos calos foram solubilizados em dimetilssulfóxido (DMSO) a 5%, seguido de diluições sucessivas em meio de cultura Caldo Mueller-Hinton, microplaca de 96 poços para a obtenção das concentrações de 1000, 500, 250, 125, 62,5 e 31,25 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. Como controle negativo usou-se o solvente para solubilizar o extrato mais o microrganismo. O controle positivo foi feito adicionando o antibiótico oxitetraciclina a 125 µg/mL. Em seguida, a placa foi incubada a 30 ou 37 °C, dependendo da necessidade do microrganismo. Após a incubação, as placas foram lidas em espectrofotômetro a 625 nm e os valores de crescimento das bactérias foram analisados conforme sua absorbância. O teste foi realizado em triplicata e o crescimento de cada amostra foi comparado com o controle.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise Cromatográfica e fracionamento do extrato hexânico das folhas e das suas frações

O extrato hexânico das folhas de *D. macrophylla* (FHEX) analisado pelo método cromatográfico de CCDC, mostrou a possível presença de terpenos ou esteroides quando as cromatoplasmas foram reveladas com os reagentes químicos anisaldeído sulfúrico e sulfato cérico, apresentando coloração roxa e marrom respectivamente. O extrato não apresentou indícios de alcaloides quando revelado com o reagente de Dragendorff (Figura 11).



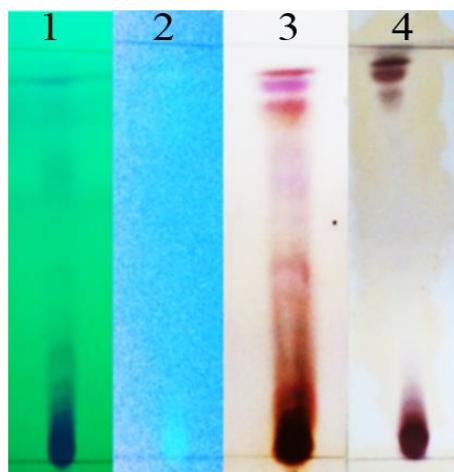
Legenda: Sistema de eluição:

Hex/AcOEt 80:20.

Reveladores: 1 - UV 254 nm; 2 - UV 365 nm; 3 - anisaldeído sulfúrico; 4 - sulfato cérico; 5 - Reagente de Dragendorff

Figura 11: Cromatoplasmas do extrato hexânico das folhas de *Duroia macrophylla*.

A análise por CCDC das frações provenientes do fracionamento do extrato hexânico das folhas de *D. macrophylla* possibilitou realizar a reunião das frações que apresentaram semelhança entre seus constituintes químicos. Nas cromatoplasmas foram verificadas colorações roxa e marrom frente aos reveladores químicos anisaldeído sulfúrico e sulfato cérico respectivamente, indicando a possível presença de terpenos ou esteroides. Nas ilustrações da figura 12, 13 e 14 é possível verificar o comportamento químico das frações reunidas que foram fracionadas.

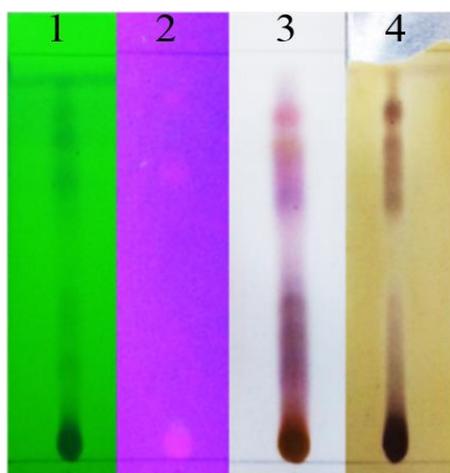


Legenda: Sistema de eluição:

Hex/AcOEt 90:10.

Reveladores: 1 - UV 254 nm; 2 - UV 365 nm; 3 - anisaldeído sulfúrico; 4 - sulfato cérico

Figura 12: Cromatoplasmas das frações reunidas FHEX 19-24.

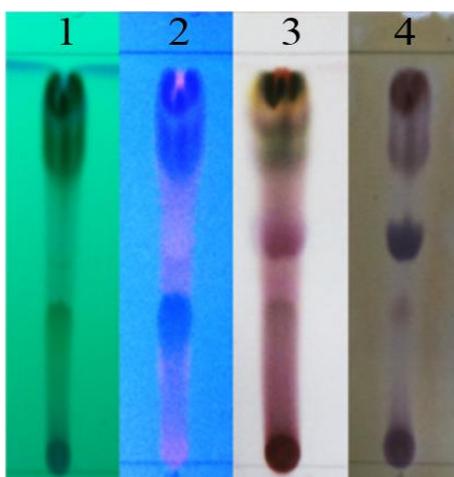


Legenda: Sistema de eluição:

Hex/AcOEt 90:10.

Reveladores: 1 - UV 254 nm; 2 - UV 365 nm; 3 - anisaldeído sulfúrico; 4 - sulfato cérico

Figura 13: Cromatoplasmas das frações reunidas FHEX 38-41.



Legenda: Sistema de eluição:

Hex/AcOEt 90:10.

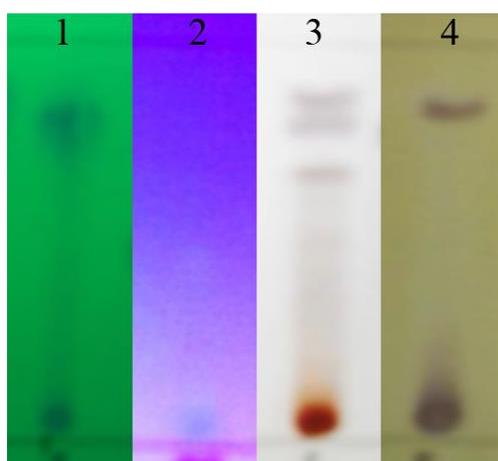
Reveladores: 1 - UV 254 nm; 2 - UV 365 nm; 3 - anisaldeído sulfúrico; 4 - sulfato cérico

Figura 14: Cromatoplasmas das frações reunidas FHEX 73-82.

5.2 Análise Cromatográfica e fracionamento dos extratos dos calos de *D. macrophylla*

Os extratos foram analisados em CCDC em diferentes sistemas de eluição, para a escolha do melhor sistema, de acordo com a polaridade da amostra, e assim, determinar a sua composição química e, conseqüentemente, estabelecer uma estratégia para a separação dos componentes.

Após análises em CCDC, foi verificado nas cromatoplasmas dos extratos hexânico (Figura 15), acetato de etila (Figura 16), e metanólico (Figura 17) coloração roxa e marrom frente aos reveladores químicos anisaldeído sulfúrico e sulfato sérico respectivamente, indicando a possível presença de terpenos ou esteroides.

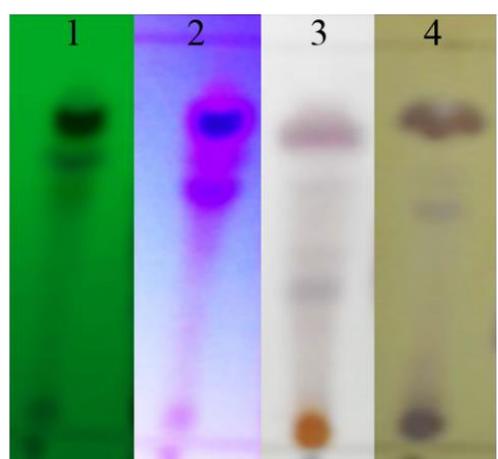


Legenda: Sistema de eluição:

Hex/AcOEt 90:10.

Reveladores: 1 - UV 254 nm; 2 - UV 365 nm; 3 - anisaldeído sulfúrico; 4 - sulfato cérico

Figura 15: Cromatoplasmas do extrato hexânico dos calos.

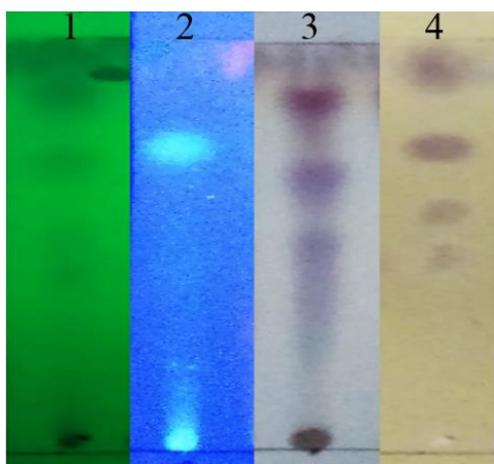


Legenda: Sistema de eluição:

AcOEt/Acetona 90:10.

Reveladores: 1 - UV 254 nm; 2 - UV 365 nm; 3 - anisaldeído sulfúrico; 4 - sulfato cérico

Figura 16: Cromatoplasmas do extrato acetato de etila dos calos.



Legenda: Sistema de eluição:

AcOEt/Acetona 90:10.

Reveladores: 1 - UV 254 nm; 2 - UV 365 nm;

3 - anisaldeído sulfúrico; 4 - sulfato cérico

Figura 17: Cromatoplasas do extrato metanólico dos calos.

5.3 Análise de RMN das frações do extrato hexânico das folhas

A análise dos espectros de RMN de ^1H das frações FHEX38-41(8-10), FHEX38-41(16-17) e FHEX38-41(11-12)(3-4) (Figuras 18, 19 e 20, respectivamente) indicou a presença de alguns constituintes químicos comuns (esteroides e triterpenos) de acordo com os sinais dos deslocamentos químicos observados:

- Sinais intensos entre δ 0,68 a 1,02 correspondentes a grupos metílicos característicos em esteroides, sinais entre δ 4 e 5 ppm referentes à hidrogênios ligados a carbonos carbinólicos, sinais entre δ 3,48 a 3,67 ppm comuns em hidrogênios olefínicos, sinais de multipletos em torno das faixas de δ 5 a 5,5 ppm indicando a presença de duplas ligações nas substâncias presentes, geralmente comuns em esteroides ou triterpenos.

Pode-se observar presença de alcanos e alcenos de cadeias longas (“graxa”), pelo sinal bem intenso em δ 1,25 ppm, referente aos hidrogênios de CH_2 de cadeias alifáticas longas. Os variados sinais no espectro indicam que as frações não estão puras, mas em mistura com ácido graxo.

A partir da observação dos sinais de deslocamentos químicos nos espectros de RMN de ^1H comparados com os dados da literatura (COSTA *et al.*, 2010), as frações do extrato hexânico das folhas de *D. macrophylla*, indicam a presença do esteroide sitosterol como metabólito presente nestas frações associado com ácidos graxos.

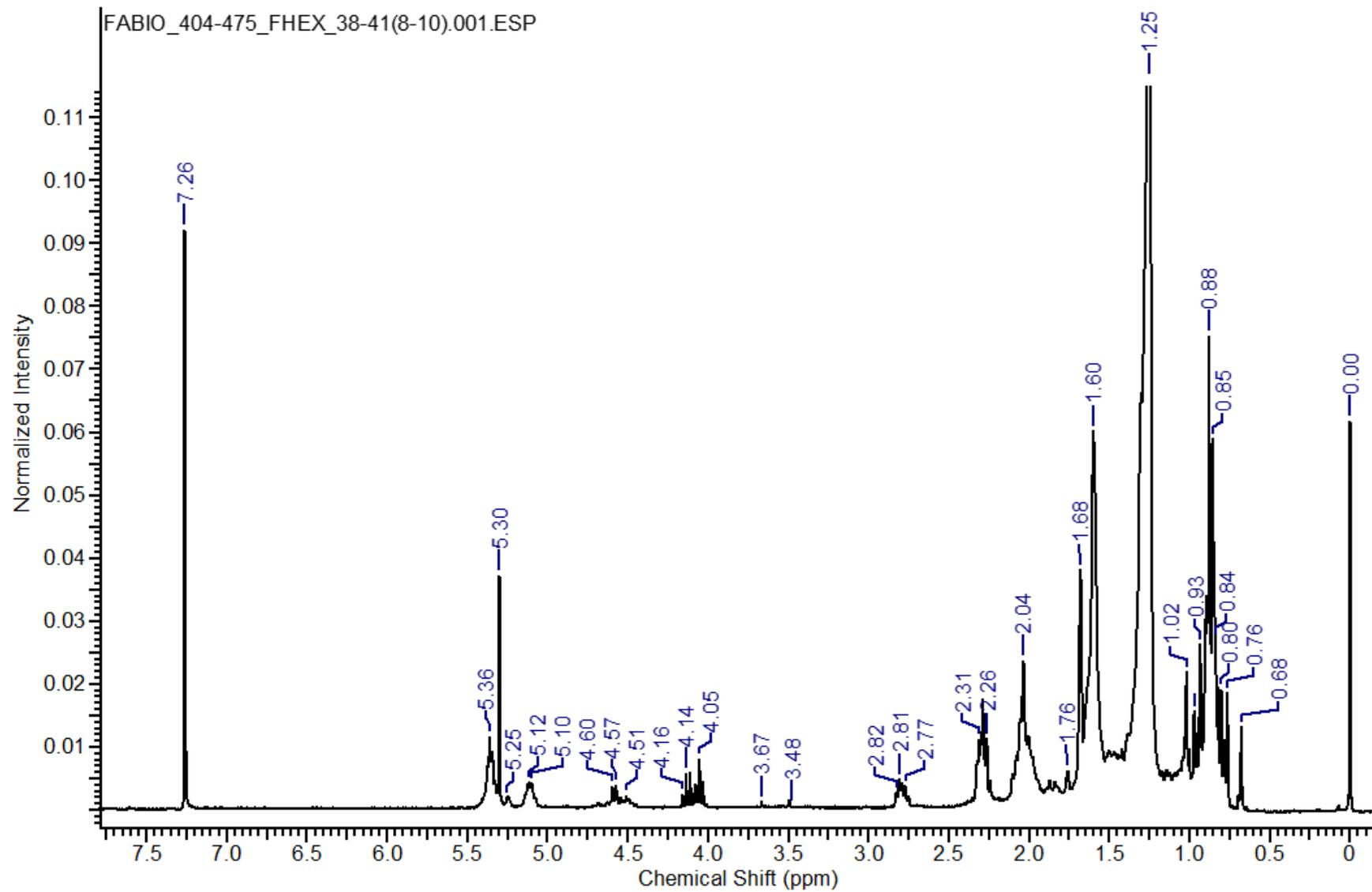


Figura 18: Espectro de RMN de ^1H (600 μL de CDCl_3 , 300 MHz) da fração FHEX38-41(8-10) do extrato hexânico das folhas de *Duroia macrophylla*.

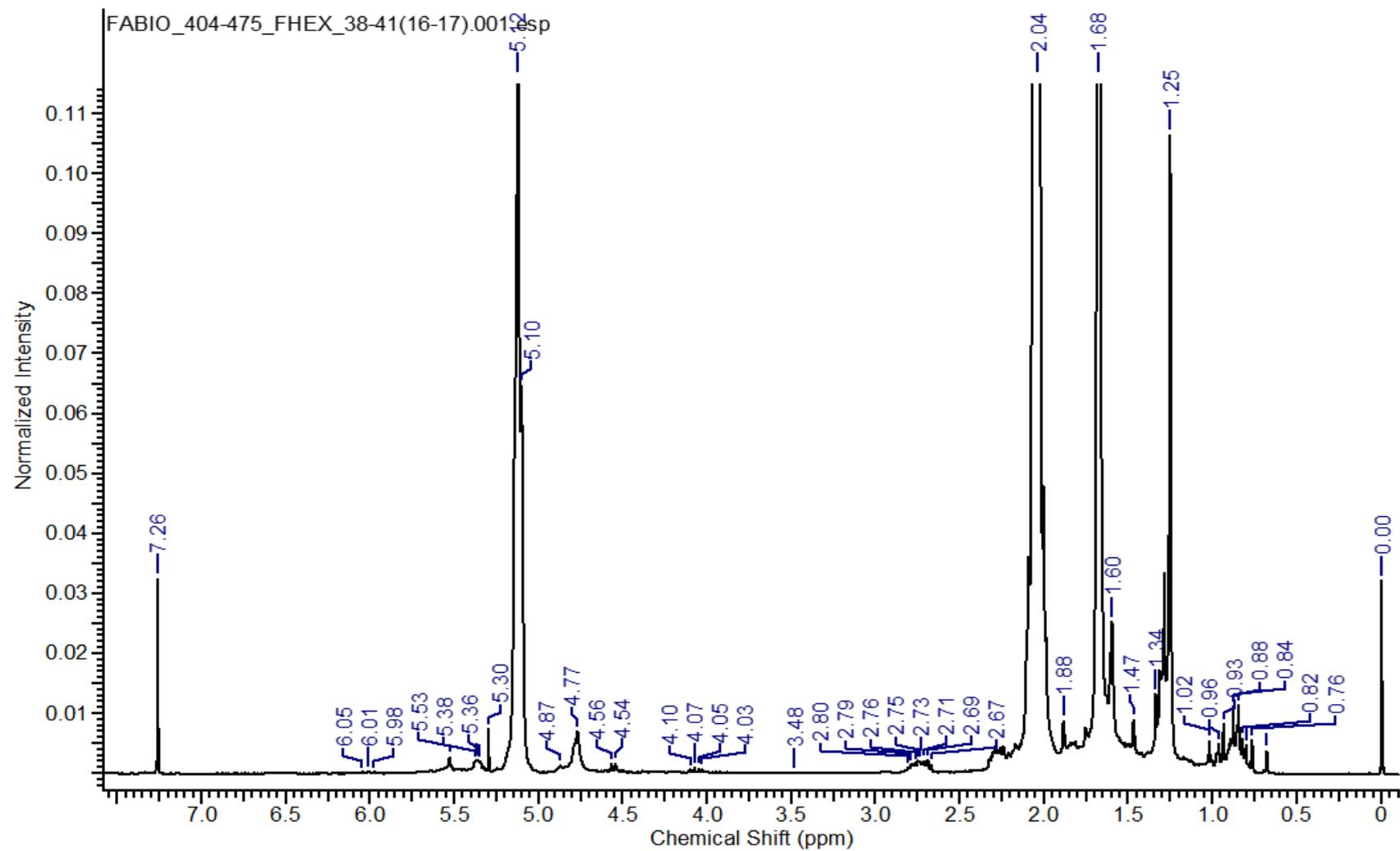


Figura 19: Espectro de RMN de ^1H (600 μL de CDCl_3 , 300 MHz) da fração FHEX38-4(16-17) do extrato hexânico das folhas de *Duroia macrophylla*.

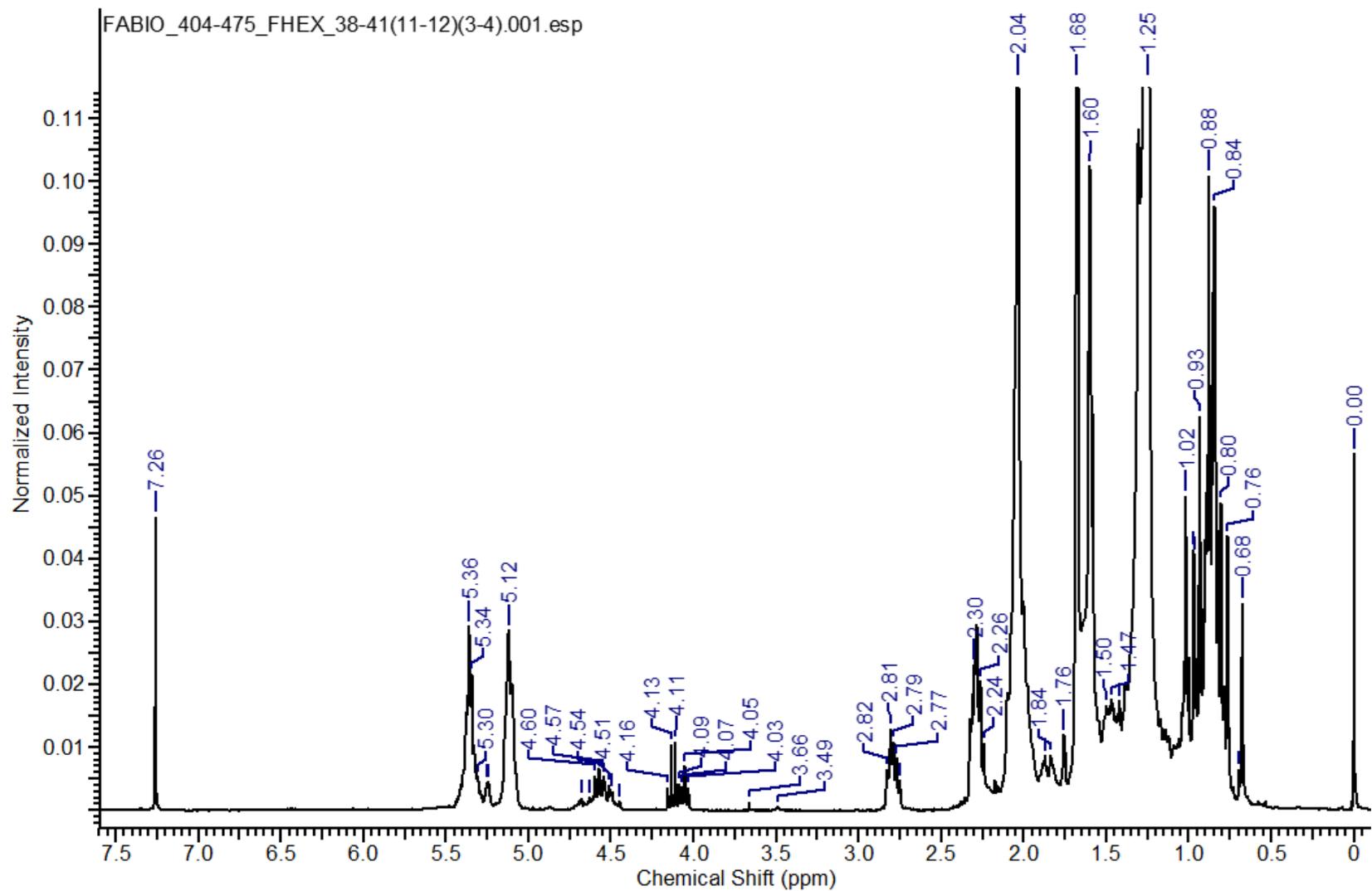


Figura 20: Espectro de RMN de ^1H (600 μL de CDCl_3 , 300 MHz) da fração FHEX38-41(11-12)(3-4) do extrato hexânico das folhas de *Duroia macrophylla*.

A análise em CCDC da fração FHEX38-41(4-7)(5) mostra a presença de uma substância com Rf de 0,8 quando eluída com hex/AcOEt 95:5, que revela com coloração roxa com anisaldeído e com sulfato cérico, o que é indicativo de terpeno. O espectro de RMN de ^1H (Figura 21) da fração mostra a presença de sinais de três metilas em δ 0,76 (*s*, 3H); 0,78 (*s*, 3H) e 0,93 (*s*, 3H) que aliadas à presença de sinais de uma ligação dupla em δ 5,3 (*sl*, 1H) e sinais de hidrogênios de carbonos carbinólicos em 4,50 (*dd*, 1H, $J = 10$ e 4 Hz) e 4,05 (*t*, 1H, $J = 6,7$ Hz) são indicativos da presença de um terpeno oxigenado (talvez epóxido pela baixa polaridade e possivelmente sesquiterpeno pela quantidade de metilas). Porém, esta fração está em mistura com uma cadeia alifática (“graxa”), como pode ser conferido pela presença da cadeia de CH_2 em δ 1,25 e do CH_3 em δ 0,85. No entanto, devido à pouca massa, não será possível realizar a purificação.

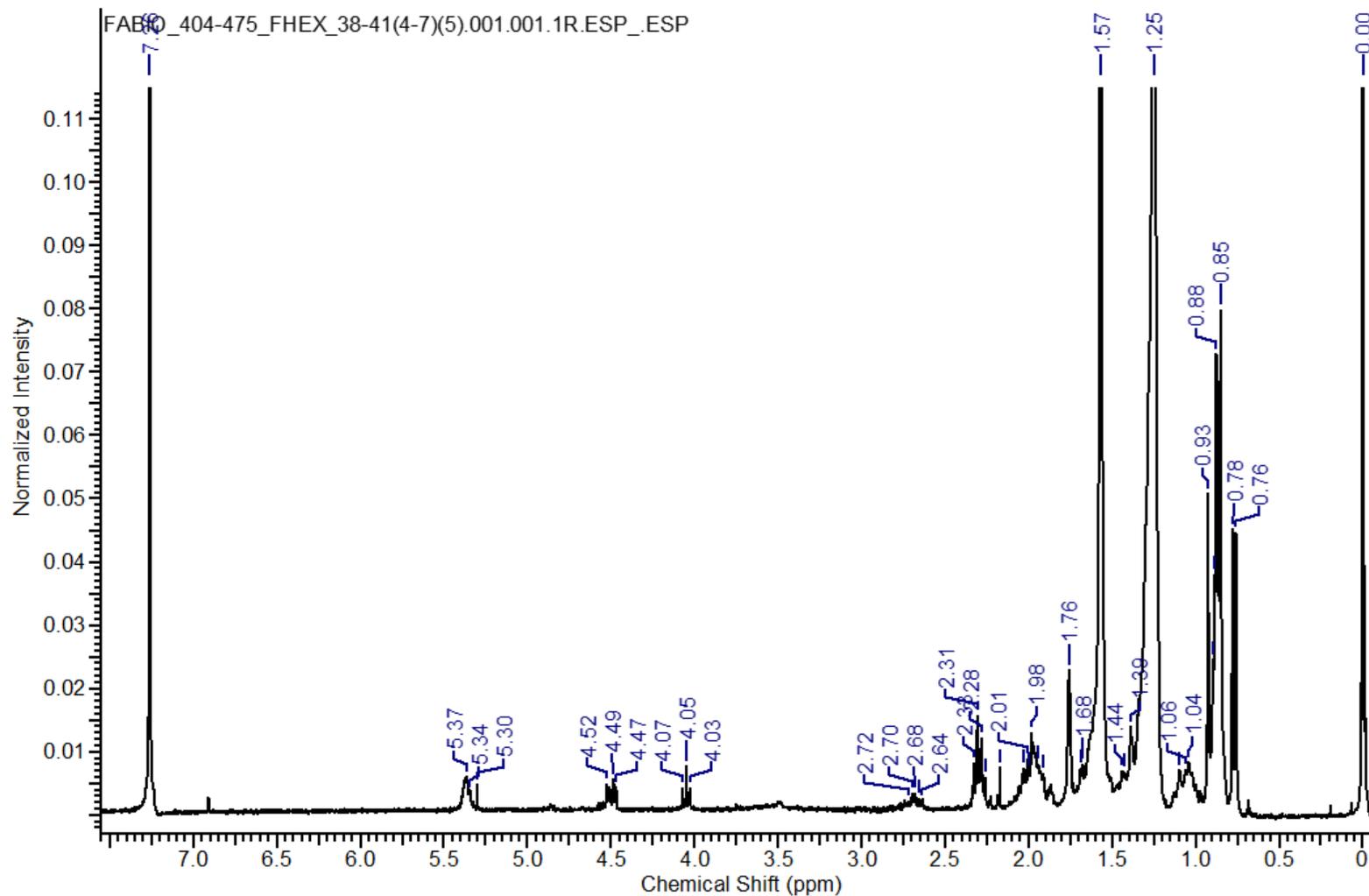


Figura 21: Espectro de RMN de ^1H (600 μL de CDCl_3 , 300 MHz) da fração FHEX38-41(4-7)(5) do extrato hexânico das folhas de *Duroia macrophylla*.

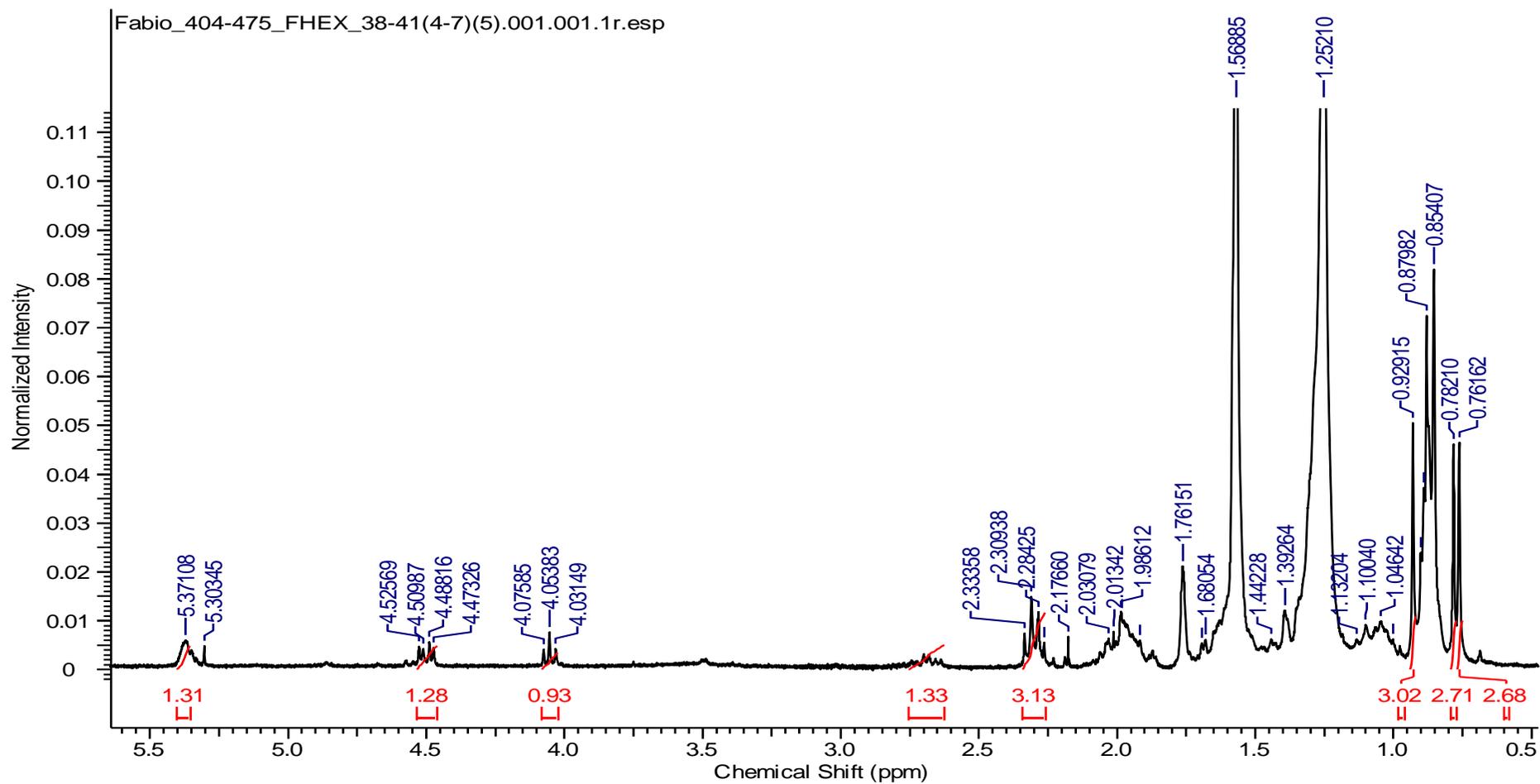


Figura 22: Expansão do espectro de RMN de ^1H (600 μL de CDCl_3 , 300 MHz) da fração FHEX38-41(4-7)(5) do extrato hexânico das folhas de *Duroia macrophylla*.

5.4 Análises de RMN dos extratos e das frações dos calos de *D. macrophylla*

A partir dos espectros de RMN de ^1H dos extratos hexânico, acetato de etila e metanólico dos calos (Figuras 23, 24 e 25), observar-se a possível presença de terpenos nos extratos dos calos, a partir da presença de sinais entre os deslocamentos de δ 0,7 e 1,2 nos espectros de RMN, sinais em torno das faixas de δ 5,13; 5,3-5,4 e 5,53, indicando a presença de duplas ligações dentre as substâncias presentes, como de esteroides e triterpenos e sinais entre δ 8,55, 8,60 e 8,70, indicando a possível presença de grupos aromáticos e heteroaromáticos. Conforme o estudo realizado por Martins (2013) com a planta *in natura*, estes sinais podem ser um indício de que os calos de *D. macrophylla* podem estar produzindo terpenos, sejam os mesmos que a planta ou não.

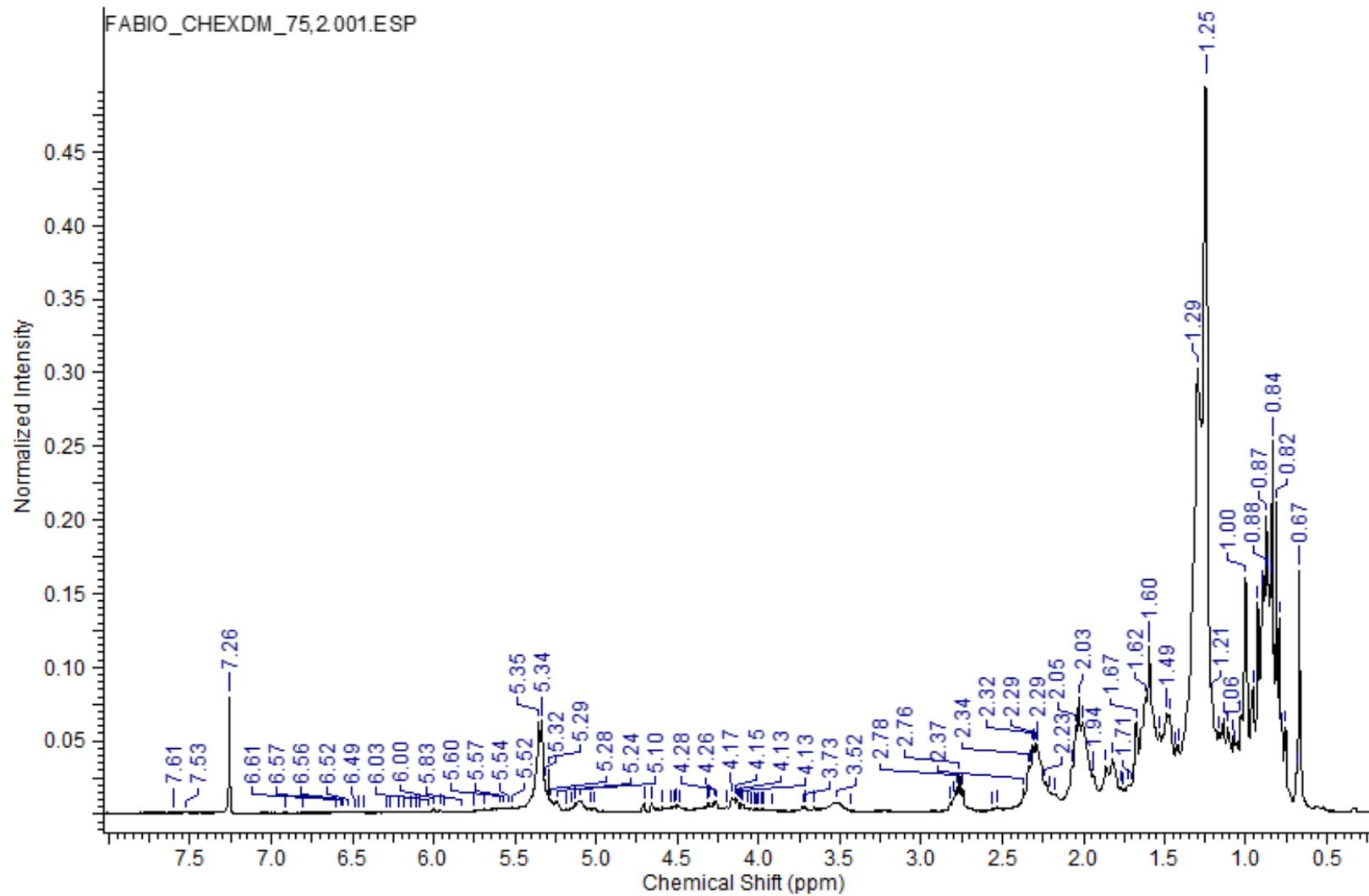


Figura 23: Espectro de RMN de ^1H (600 μL de CDCl_3 , 300 MHz) do extrato hexânico dos calos (40 mg) de *Duroia macrophylla* (CHEX).

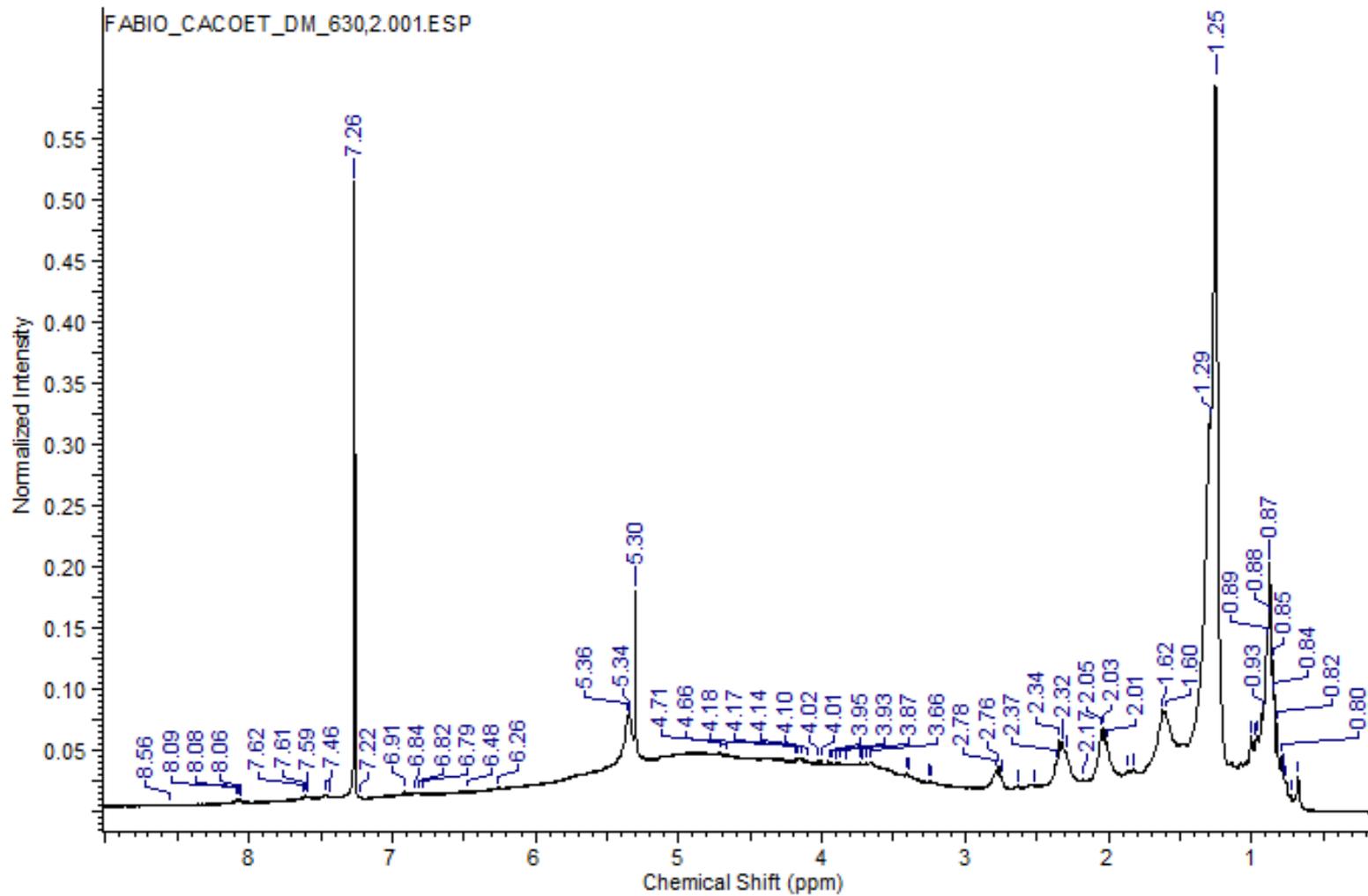


Figura 24: Espectro de RMN de ^1H (600 μL de CDCl_3 , 300 MHz) do extrato acetato de etila dos calos (40 mg) de *Duroia macrophylla* (CAcOEt).

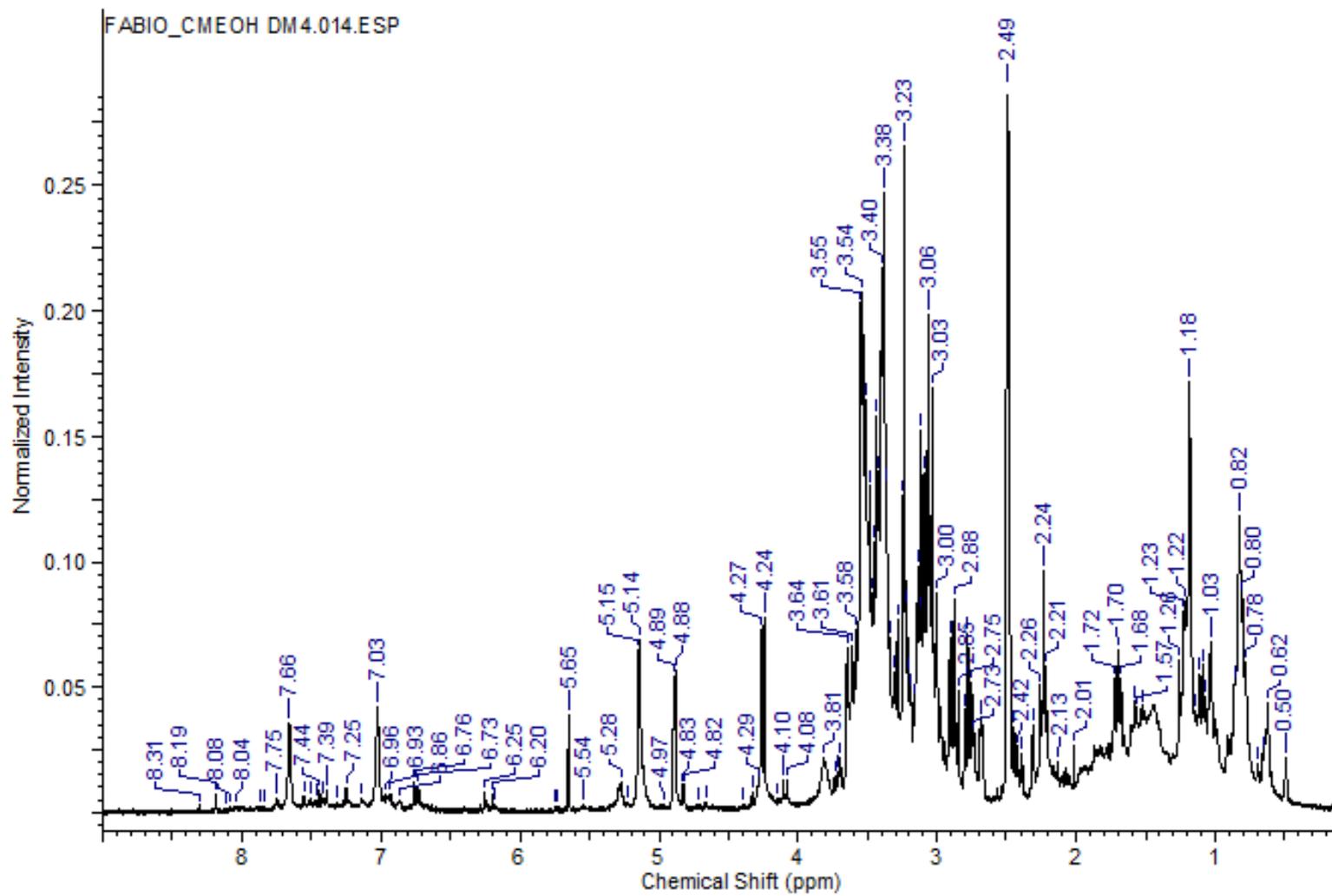


Figura 25: Espectro de RMN de ^1H (600 μL de DMSO-d_6 , 300 MHz) do extrato metanólico dos calos (40 mg) de *Duroia macrophylla* (CMeOH)

O fracionamento da fração 1 do extrato acetato de etila dos calos de *D. macrophylla* em cartucho Sep Pack gerou duas frações em maior grau de pureza, as frações CAcOEt(1)(2-3) e CAcOEt(1)(14) as quais foram analisadas por RMN (mono e bidimensionais).

A análise em CCDC da fração CAcOEt(1)(2-3) quando eluída em Hex/AcOEt 3:7 e revelada com anisalaldeído sulfúrico mostra a presença de duas manchas, uma rosa com Rf de 0,55 e outra amarela com Rf de 0,60 (e que revela forte fluorescência em UV 365 nm). No espectro de RMN de ^1H da fração CAcOEt(1)(2-3), é possível observar sinais de 8 metilas em δ 0,54 (*s*, 3H); 0,69 (*s*, 3H); 0,83 (*s*, 3H); 0,85 (*s*, 3H); 0,87 (*s*, 6H) as quais são indicativas de triterpenos (Figura 26). Não há a presença de sinais de ligações duplas conjugadas, que seriam esperadas pela forte fluorescência da mancha com Rf em 0,60. No entanto há outras duas metilas em δ 2,09 (*s*, 6H), as quais poderiam ser de metilas de grupamento acetato de etila (que são comuns esterificando triterpenos). No entanto, no mapa de contorno HSQC não há sinais referentes a carbonos de éster. O sinal da metila em δ 0,54 é muito protegido e não é comum para triterpeno, mas é mais comum em esteroides. No entanto, a massa *quasi*-molecular para a substância majoritária é 471,3469, condizente com a fórmula molecular $\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_4$. No levantamento bibliográfico realizado não foi encontrada nenhuma substância que possua os mesmos sinais observados nos espectros de RMN (HSQC e HMBC Figuras 27 e 28, respectivamente). A estrutura não pôde ser determinada a tempo de concluir este trabalho, a fração deveria ser purificada a fim de garantir que apenas os sinais do triterpeno estejam presentes, mas isso não foi possível a tempo.

A análise em CCDC da fração CAcOEt(1)(14) mostra apenas a presença de uma mancha marrom com Rf de 0,4 quando eluída em AcOEt/MeOH 9:1. O espectro de RMN de ^1H apresenta sinais de deslocamentos químicos entre δ 2,8 e 4,5 comuns em açúcares (Figura 29). O sinal em δ 4,12 (1H, *d*, $J = 7,8$ Hz) indica a presença do hidrogênio anomérico de açúcar na posição β . Foram obtidos espectros bidimensionais da fração, porém as informações obtidas não foram suficientes para permitir a identificação da substância presente na fração (Figuras 30 e 31).

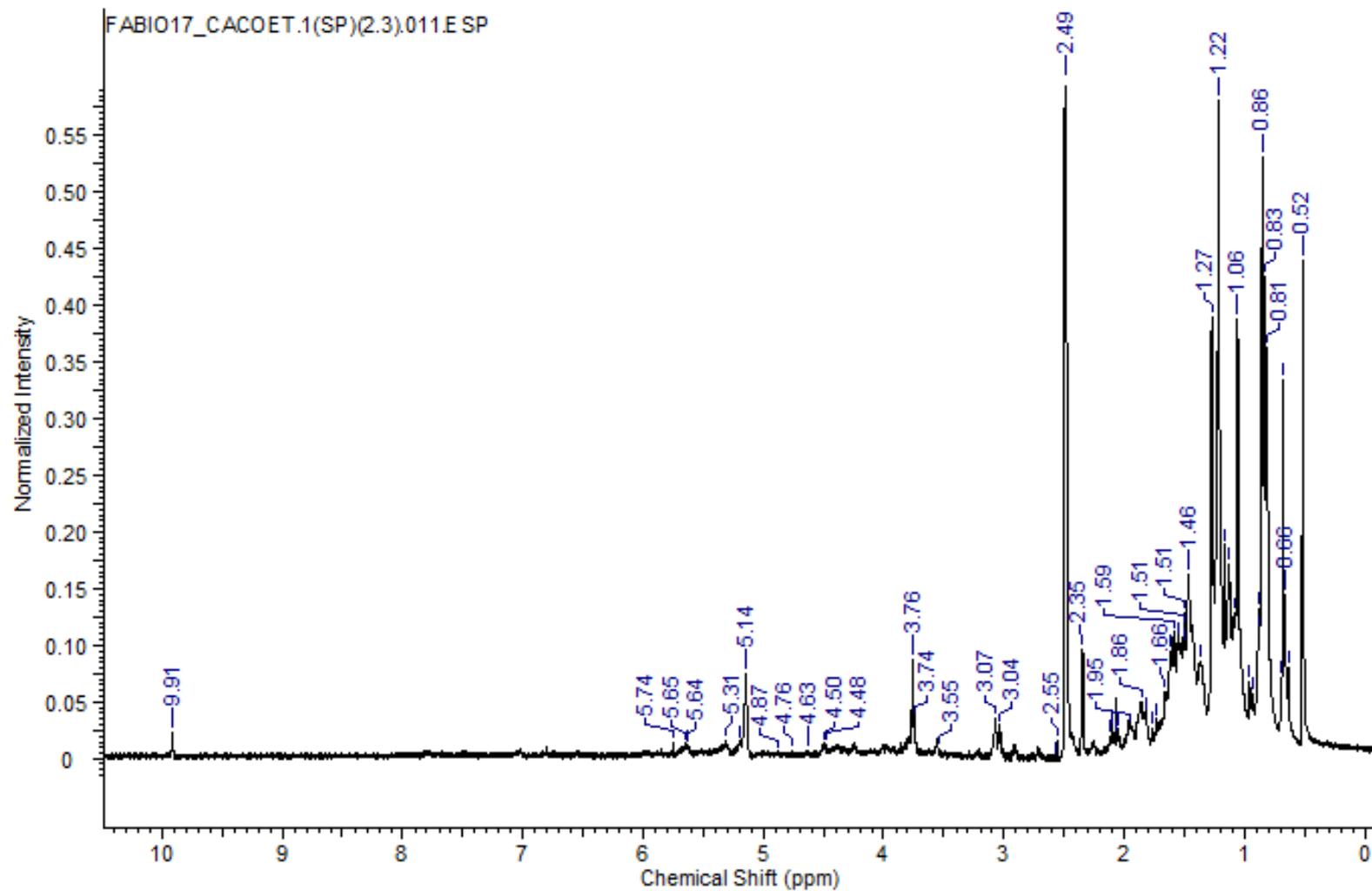


Figura 26: Espectro de RMN de ^1H (600 μL de DMSO_6 , 300 MHz) da fração CACOEt(1)(2-3) do extrato acetato de etila dos calos de *Duroia macrophylla*.

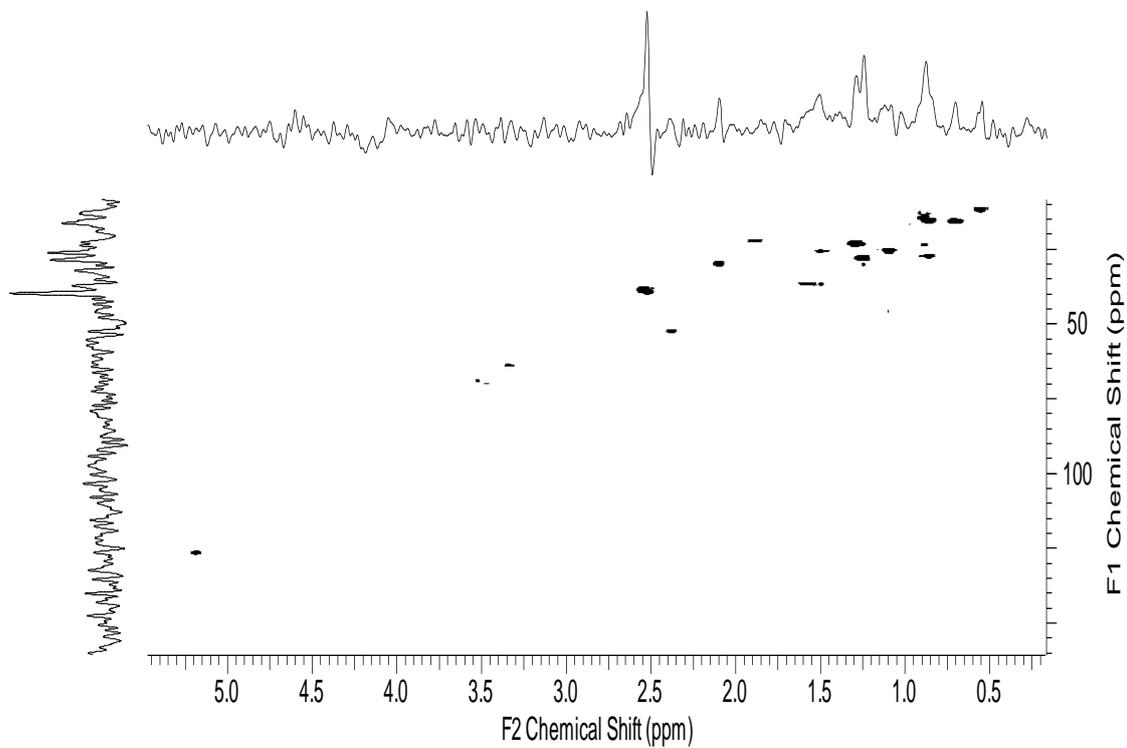


Figura 27: Mapa de contorno HSQC da fração CAcOEt(1)(2-3) do extrato acetato de etila dos calos de *Duroia macrophylla*.

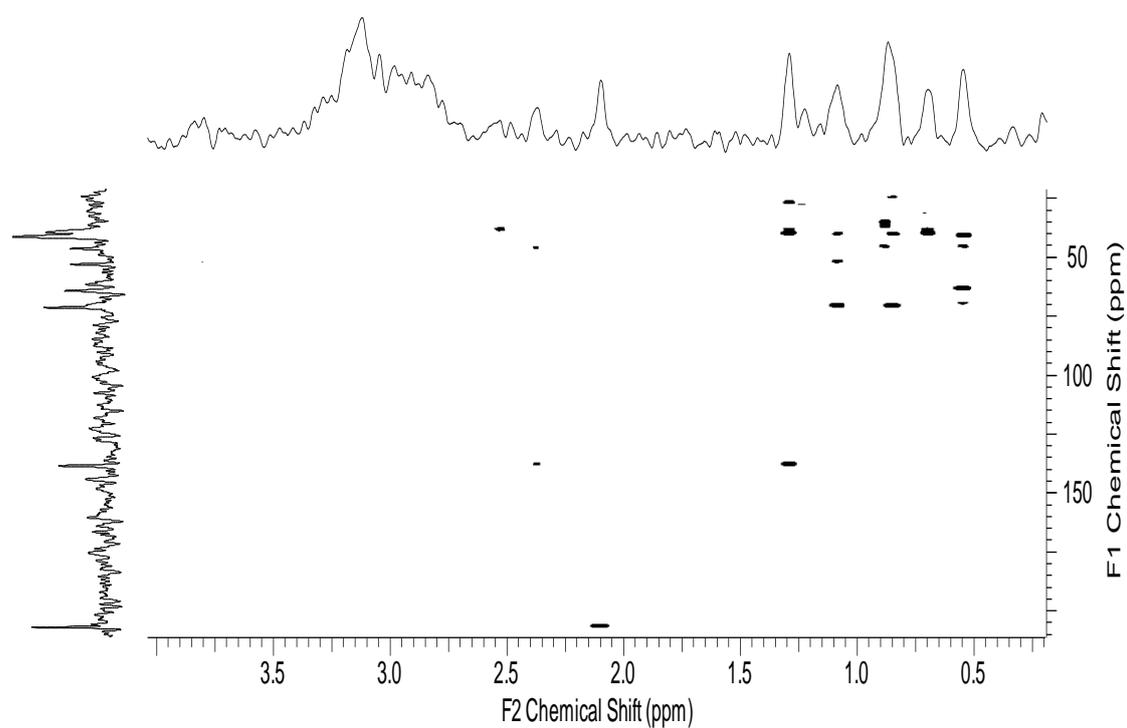


Figura 28: Mapa de contorno HMBC da fração CAcOEt(1)(2-3) do extrato acetato de etila dos calos de *Duroia macrophylla*.

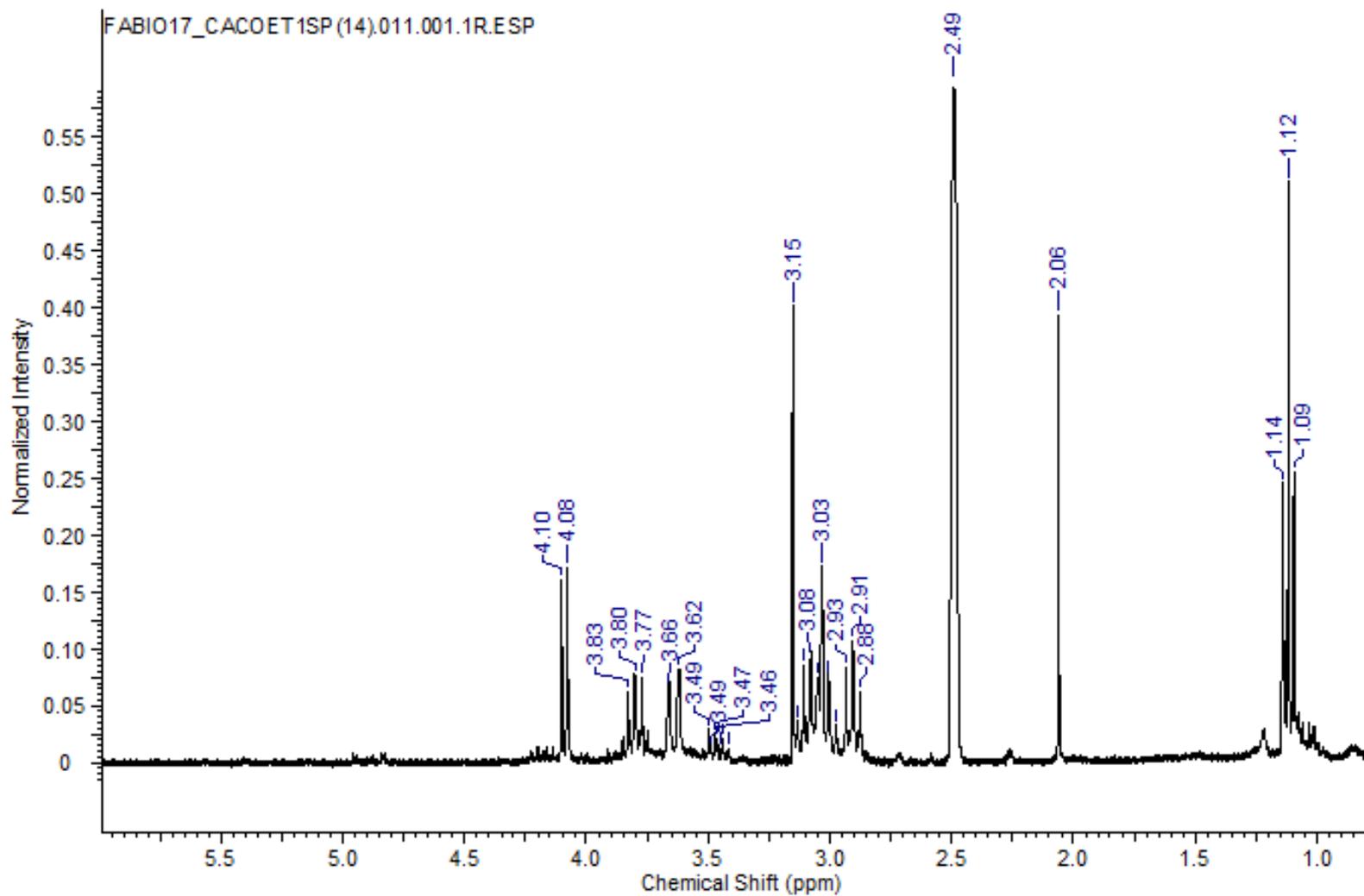


Figura 29: Espectro de RMN de ^1H (600 μL de DMSO-d_6 , 300 MHz) da fração $\text{CAcOEt}(1)(14)$ do extrato acetato de etila dos calos de *Duroia macrophylla*.

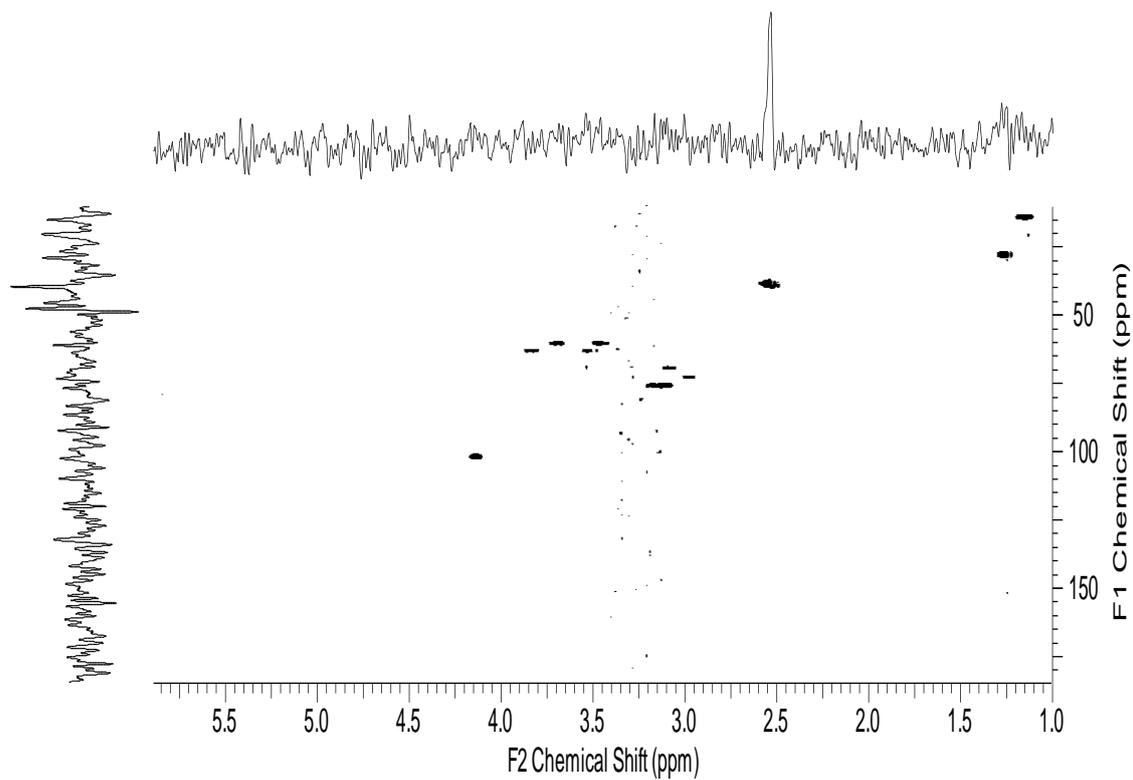


Figura 30: Mapa de contorno HSQC da fração CAcOEt(1)(14) do extrato acetato de etila dos calos de *Duroia macrophylla*.

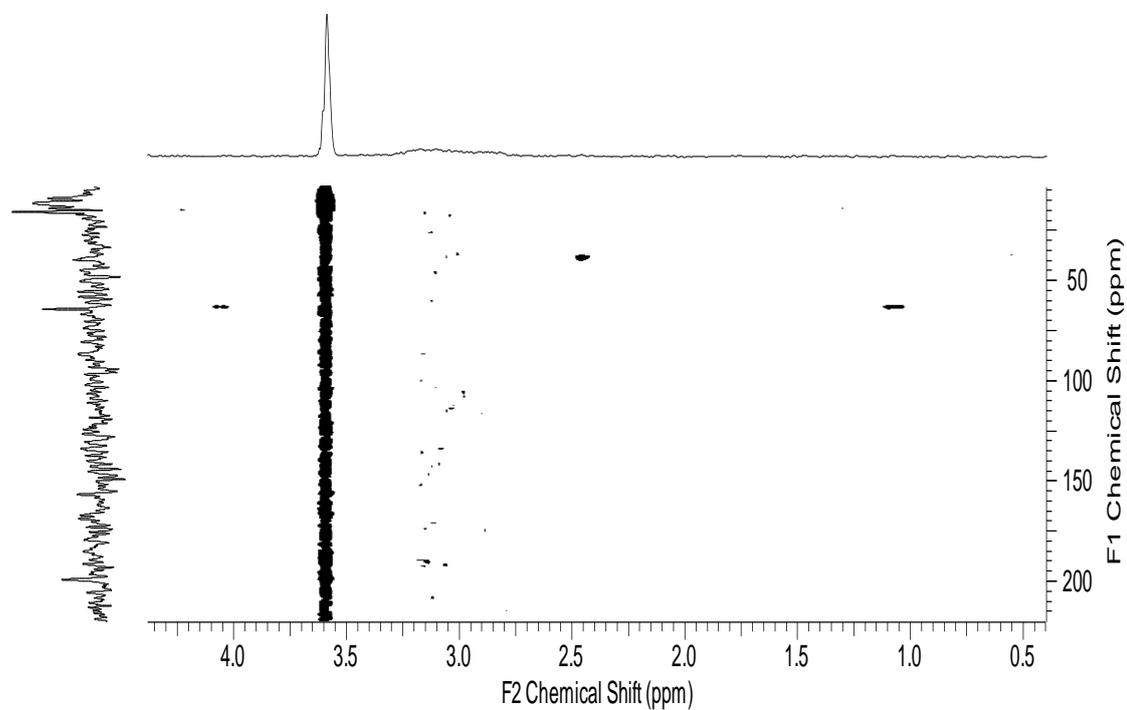


Figura 31: Mapa de contorno HMBC da fração CAcOEt(1)(14) do extrato acetato de etila dos calos de *Duroia macrophylla*.

5.5 Análise de CL/EM dos extratos dos calos de *D. macrophylla*

A fração 1 do extrato acetato de etila e a fração 1 do extrato metanólico ambos provenientes dos calos de *D. macrophylla* foram analisados por CL/EM, os cromatogramas e os espectros dos picos observados no espectro de massas estão mostrados nas figuras 32 a 64 para a fração 1 do extrato acetato de etila e nas figuras 65 a 87 para a fração 1 do extrato metanólico. Os comprimentos de onda de 325 e 254 nm foram escolhidos por serem aqueles onde as amostras apresentavam absorção.

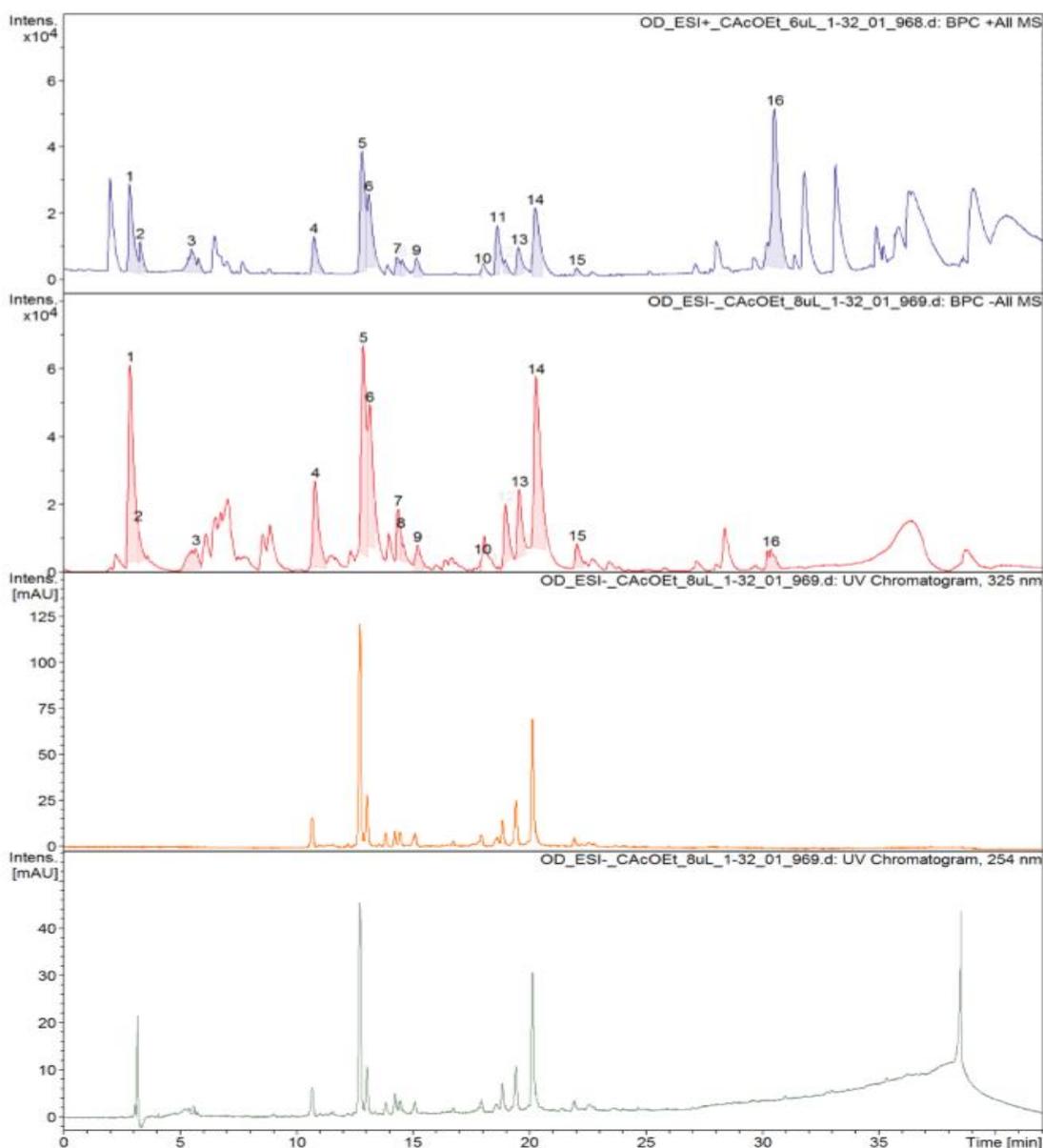


Figura 32: Cromatograma de íons totais da fração 1 do extrato acetato de etila dos calos de *Duroia macrophylla*, mostrando os comprimentos de ondas 325 e 254 nm.

Espectros de massas da fração 1 do extrato acetato de etila dos calos de *Duroia macrophylla*, mostrando os fragmentos nos picos encontrados.

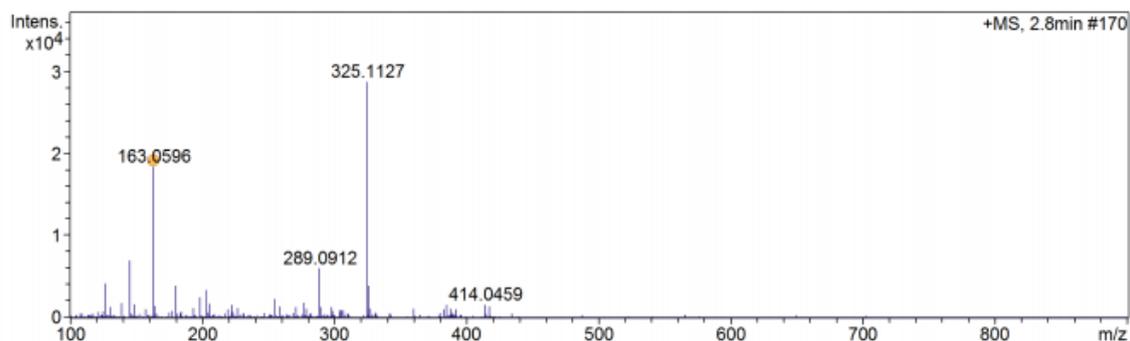


Figura 33: Fragmentograma m/z 163,0596, pico 1, modo positivo.

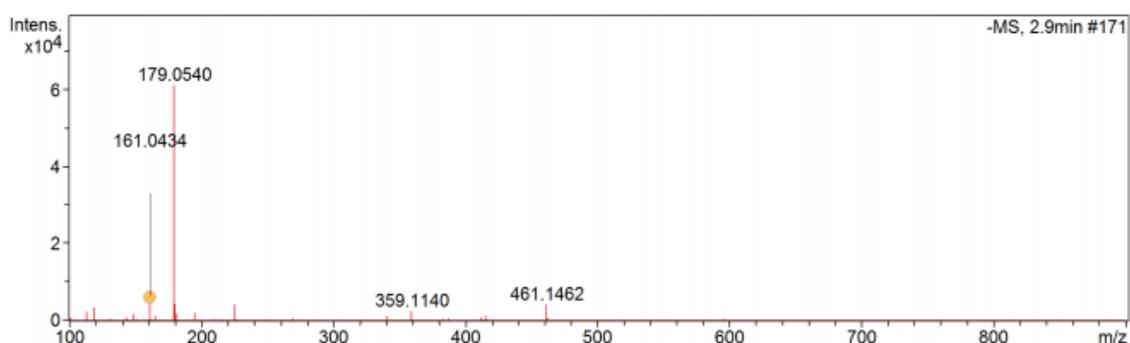


Figura 34: Fragmentograma m/z 161,0434, pico 1, modo negativo.

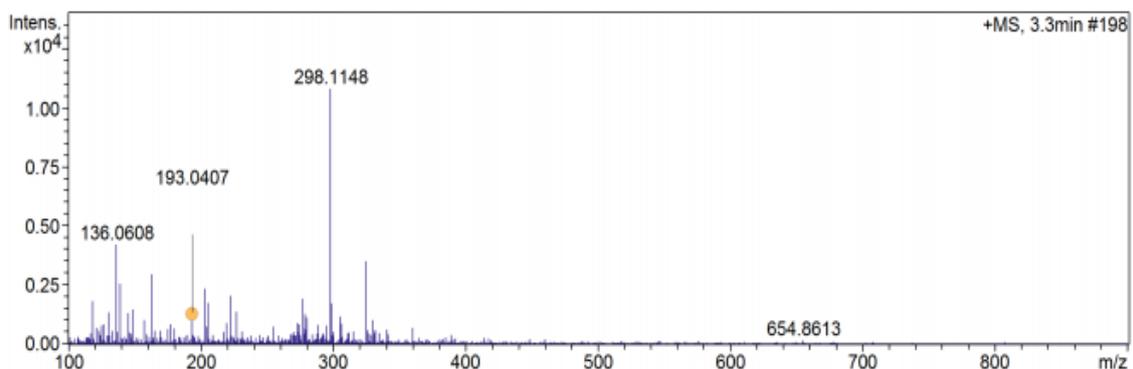


Figura 35: Fragmentograma m/z 193,0407, pico 2, modo positivo.

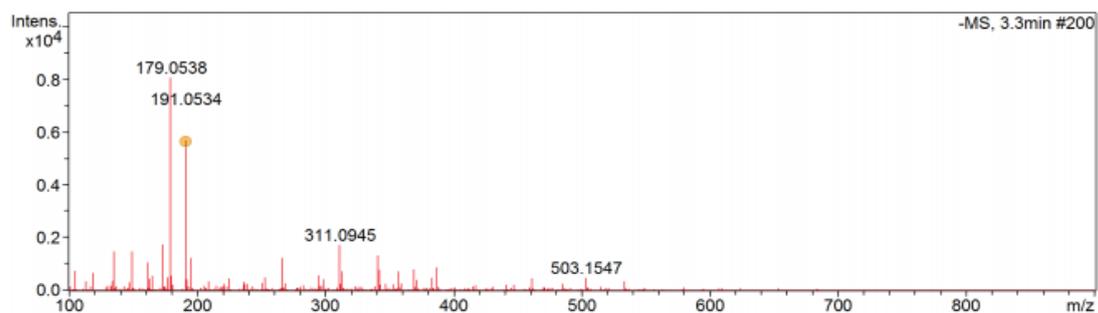


Figura 36: Fragmentograma m/z 191,0534, pico 2, modo negativo.

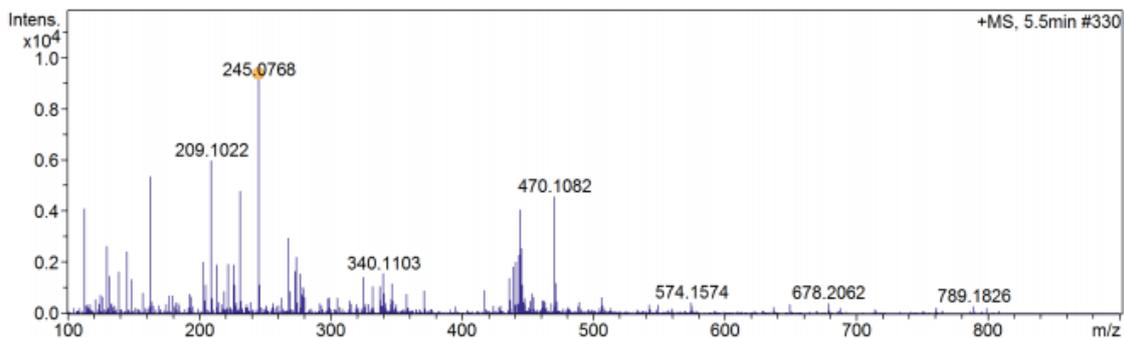


Figura 37: Fragmentograma m/z 245,0768, pico 3, modo positivo.

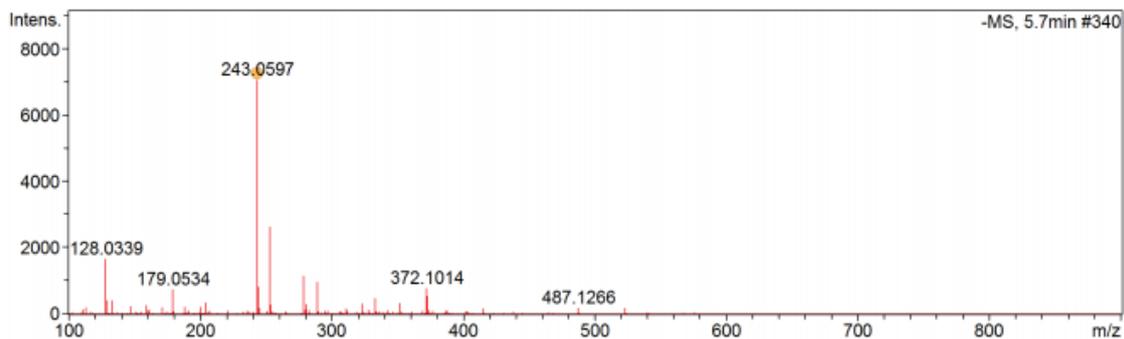


Figura 38: Fragmentograma m/z 243,0597, pico 3, modo negativo.

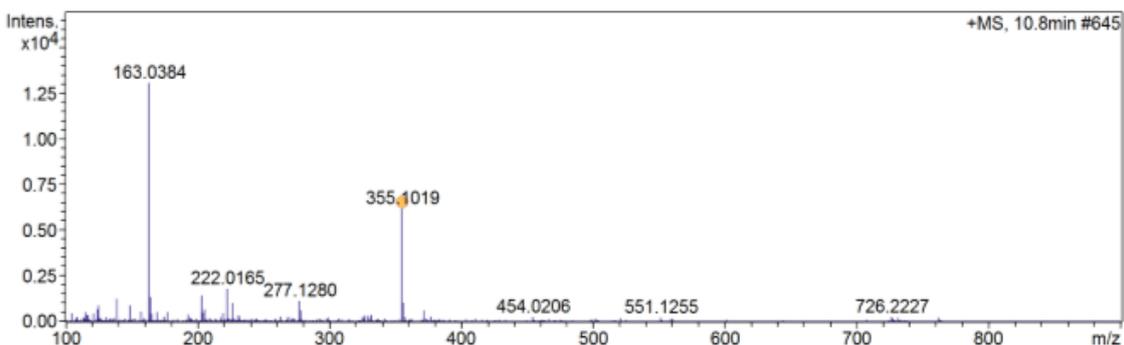


Figura 39: Fragmentograma m/z 355,1019, pico 4, modo positivo.

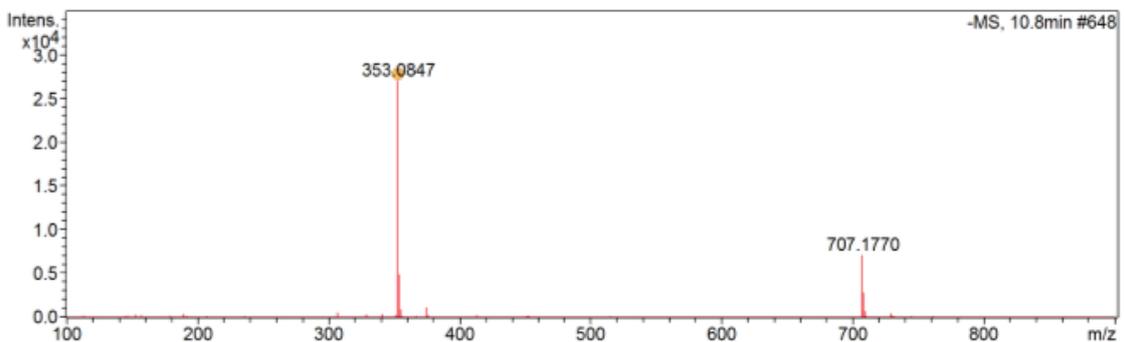


Figura 40: Fragmentograma m/z 353,0847, pico 4, modo negativo.

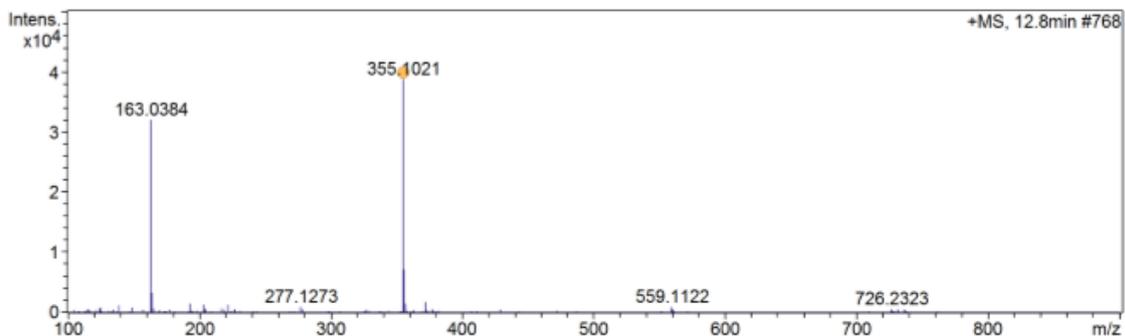


Figura 41: Fragmentograma m/z 355,1021, pico 5, modo positivo.

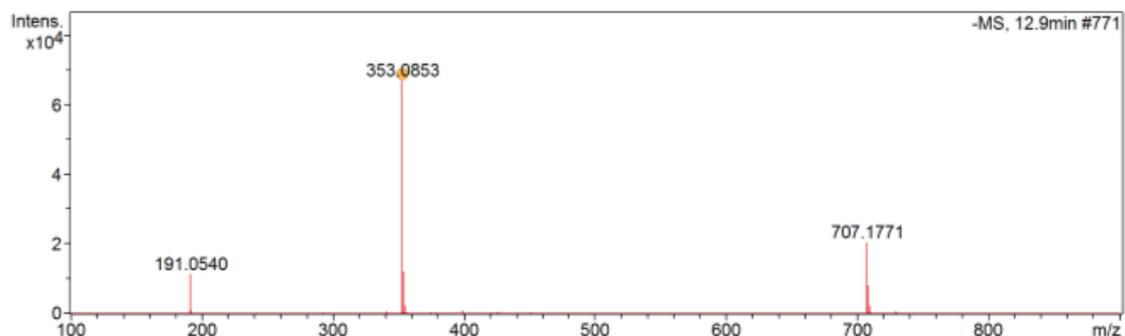


Figura 42: Fragmentograma m/z 353,0853, pico 5, modo negativo.

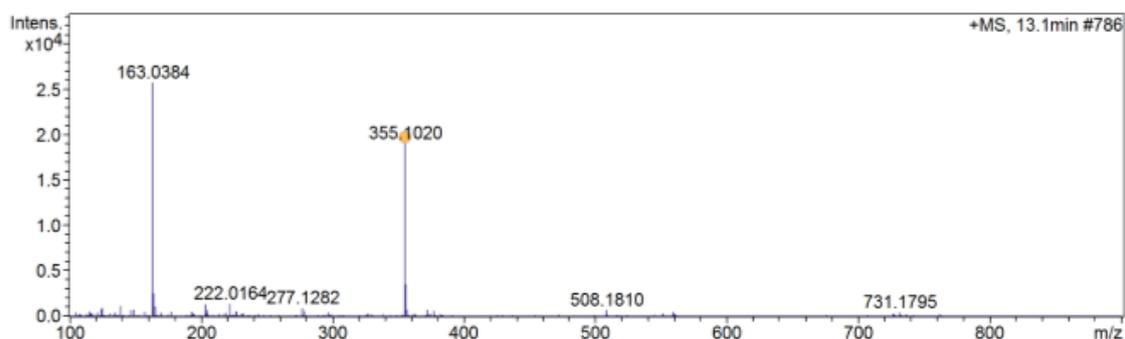


Figura 43: Fragmentograma m/z 355,1020, pico 6, modo positivo.

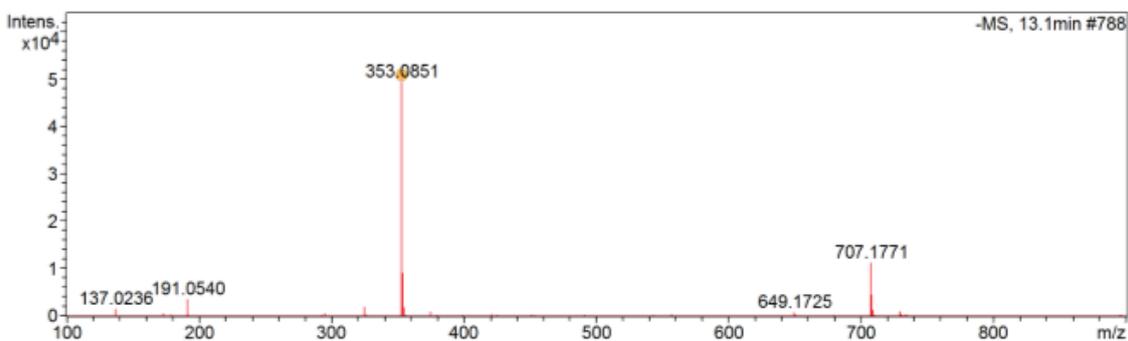


Figura 44: Fragmentograma m/z 353,0851, pico 6, modo negativo.

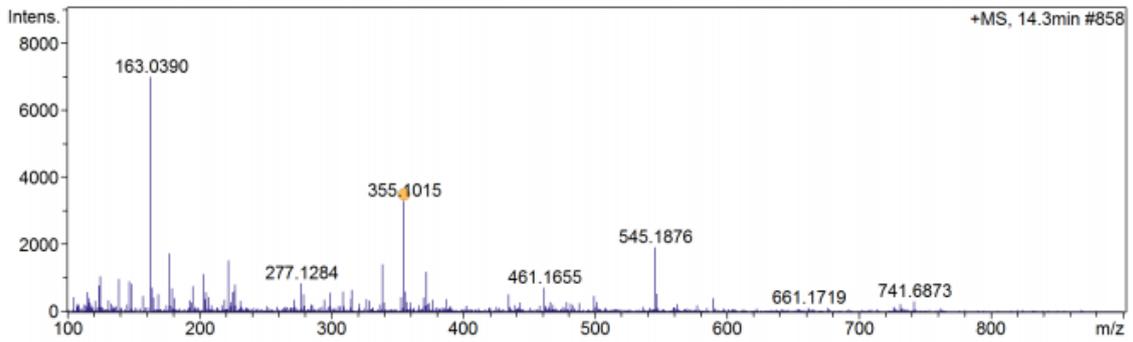


Figura 45: Fragmentograma m/z 355,1015, pico 7, modo positivo.

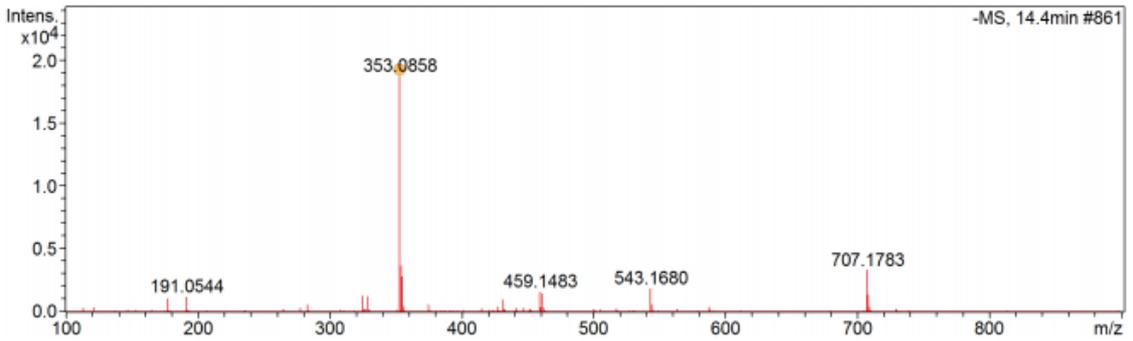


Figura 46: Fragmentograma m/z 353,0858, pico 7, modo negativo.

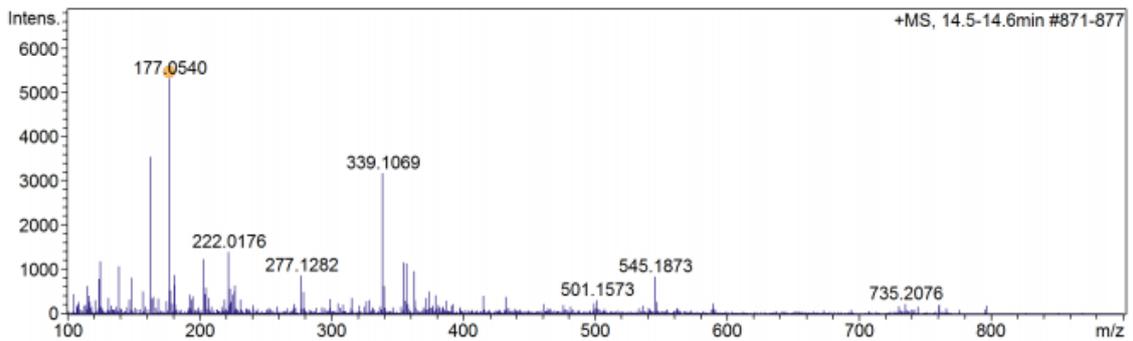


Figura 47: Fragmentograma m/z 177,0540, pico 8, modo positivo.

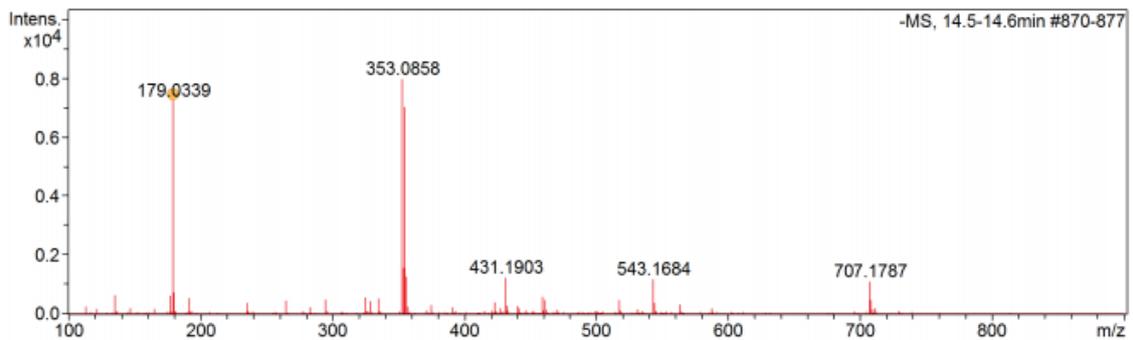


Figura 48: Fragmentograma m/z 179,0339, pico 8, modo negativo.

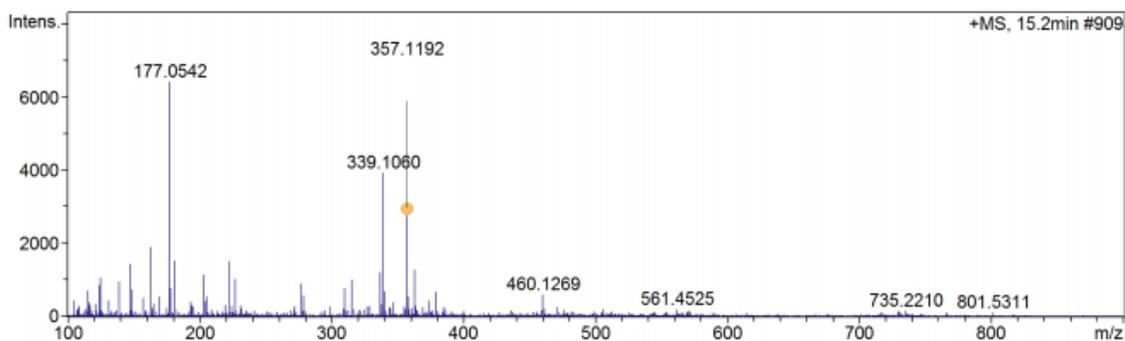


Figura 49: Fragmentograma m/z 357,1192, pico 9, modo positivo.

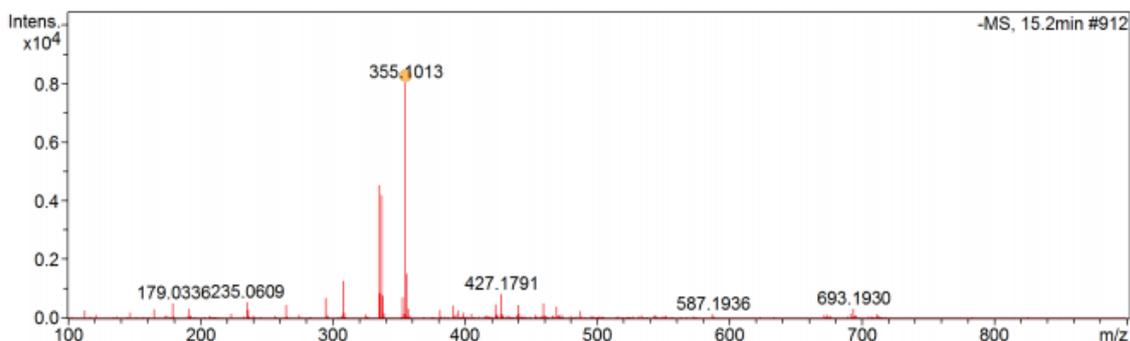


Figura 50: Fragmentograma m/z 355,1013, pico 9, modo negativo.

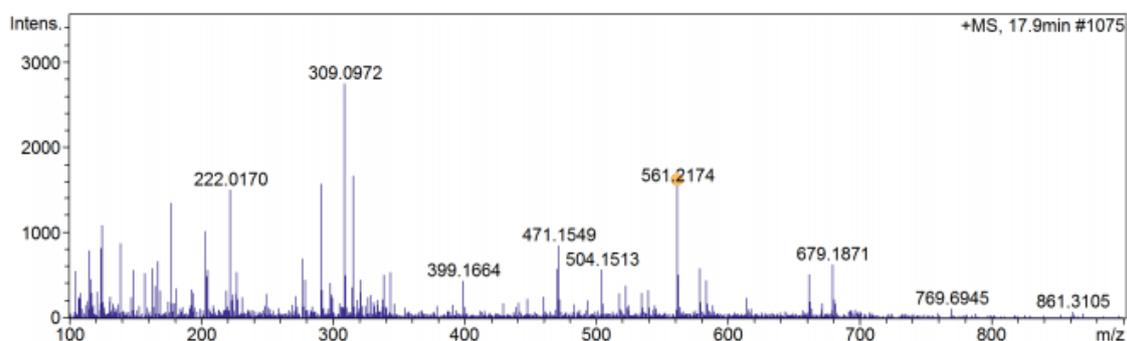


Figura 51: Fragmentograma m/z 561,2174, pico 10, modo positivo.

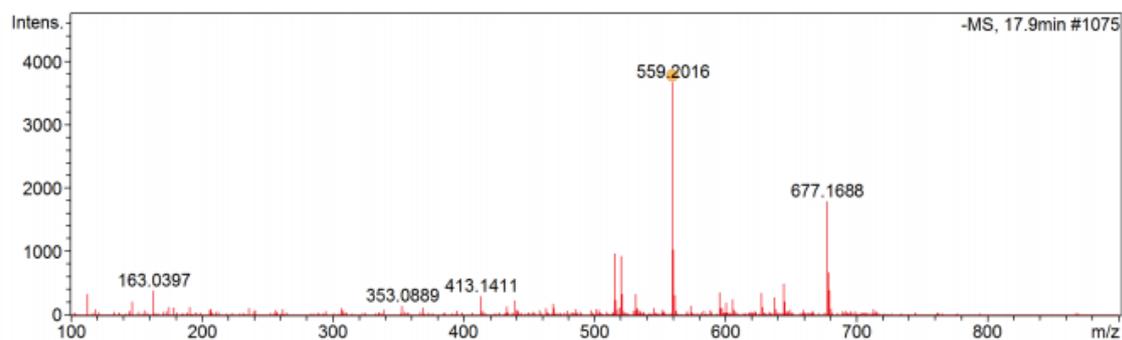


Figura 52: Fragmentograma m/z 559,2016, pico 10, modo negativo.

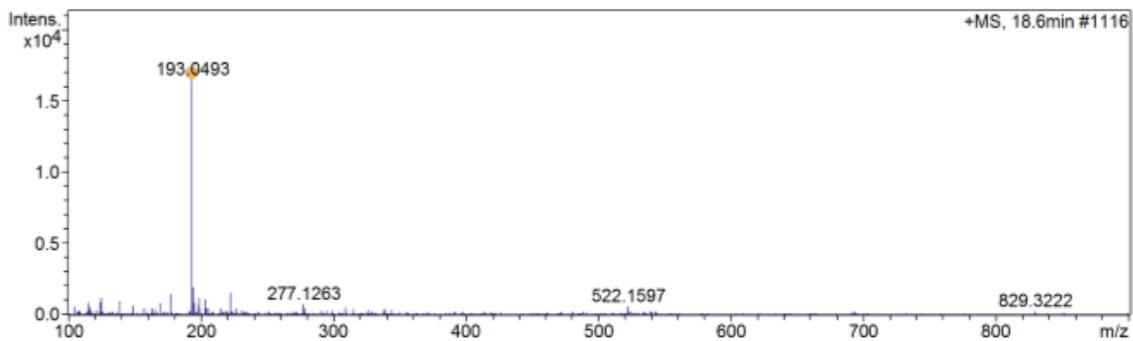


Figura 53: Fragmentograma m/z 193,0493, pico 11, modo positivo.

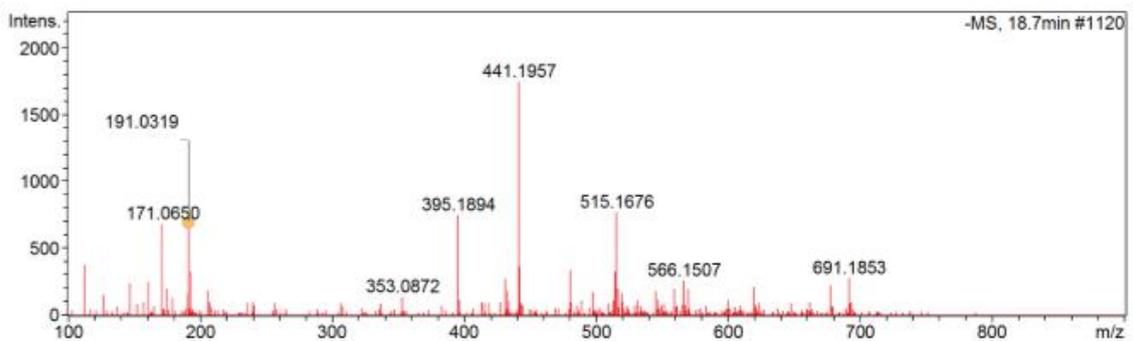


Figura 54: Fragmentograma m/z 191,0319, pico 11, modo negativo.

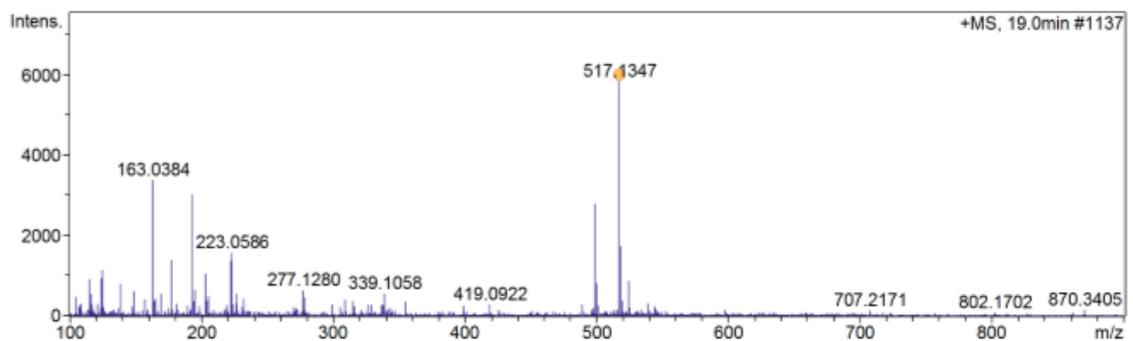


Figura 55: Fragmentograma m/z 517,1347, pico 12, modo positivo.

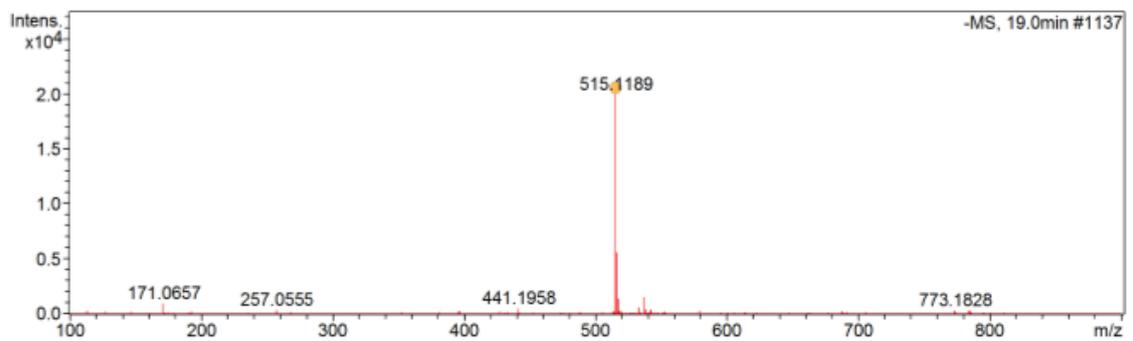


Figura 56: Fragmentograma m/z 515,1189, pico 12, modo negativo.

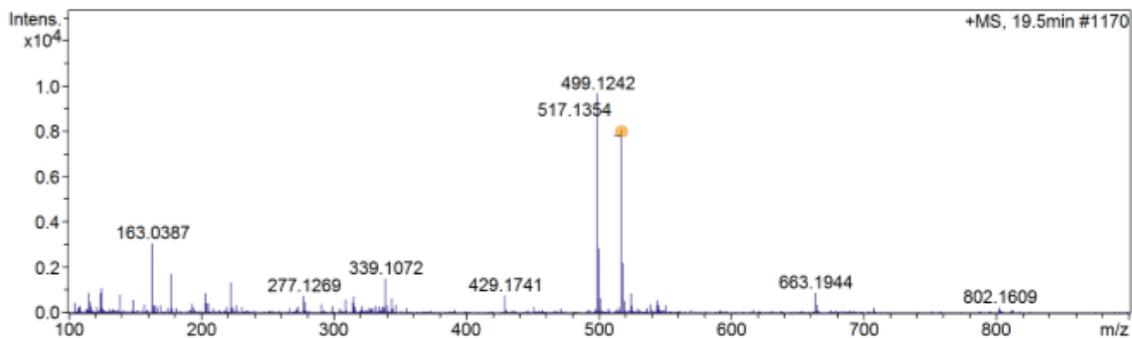


Figura 57: Fragmentograma m/z 517,1354, pico 13, modo positivo.

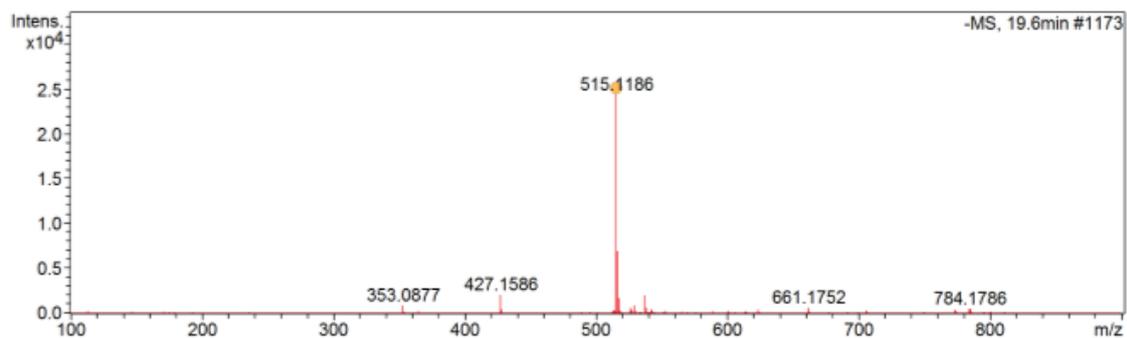


Figura 58: Fragmentograma m/z 515,1186, pico 13, modo negativo.

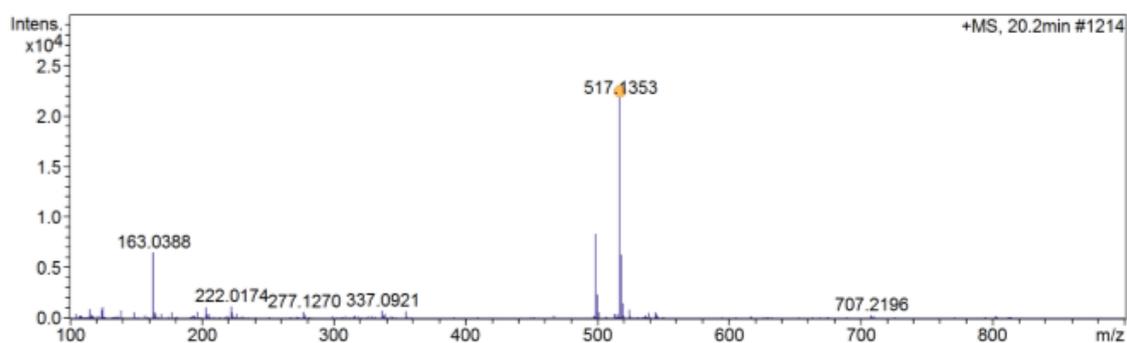


Figura 59: Fragmentograma m/z 517,1353, pico 14, modo positivo.

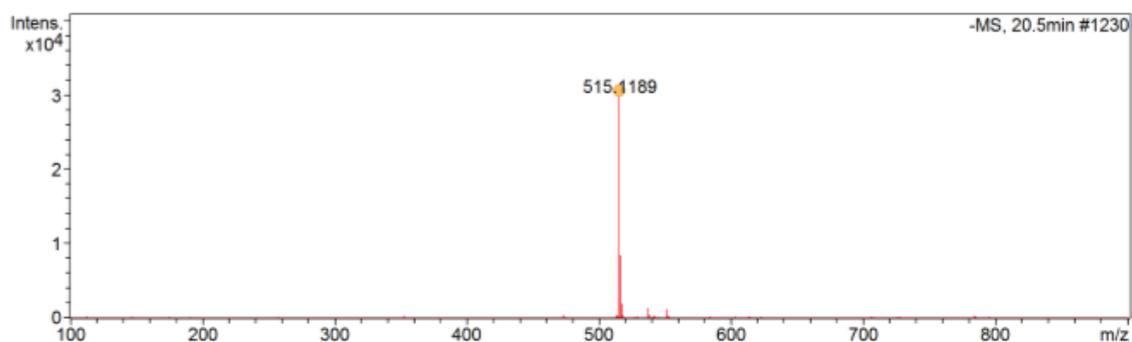


Figura 60: Fragmentograma m/z 515,1189, pico 14, modo negativo.

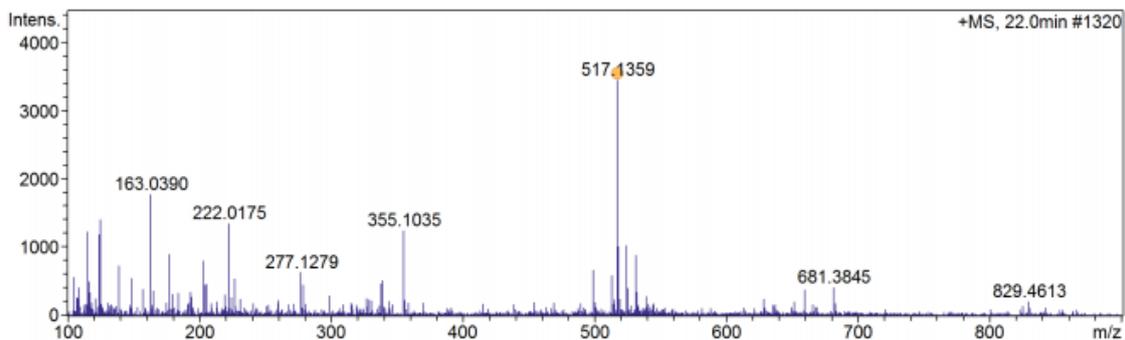


Figura 61: Fragmentograma m/z 517,1359, pico 15, modo positivo.

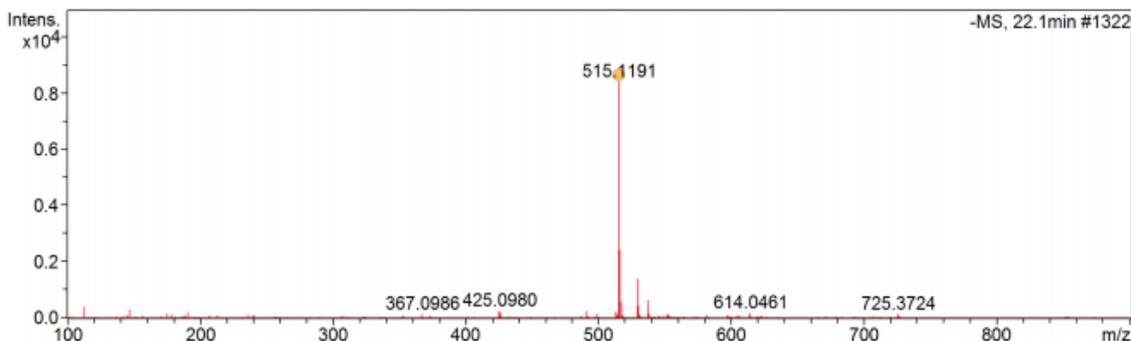


Figura 62: Fragmentograma m/z 515,1191, pico 15, modo negativo.

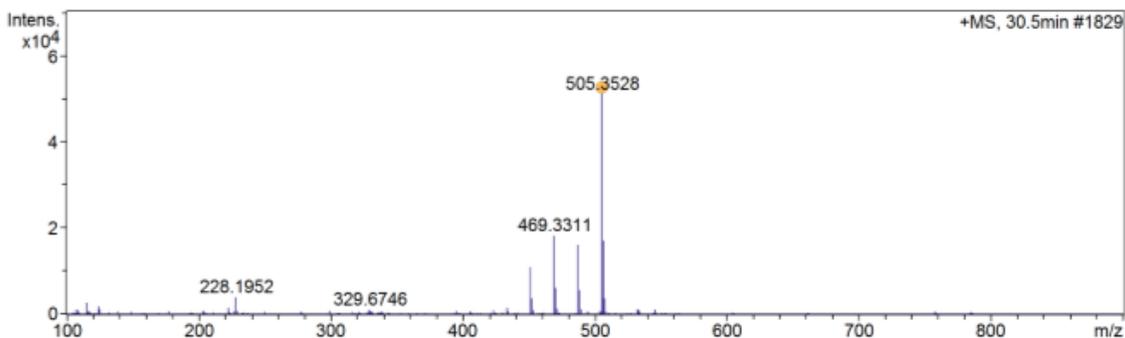


Figura 63: Fragmentograma m/z 505,3528, pico 16, modo positivo.

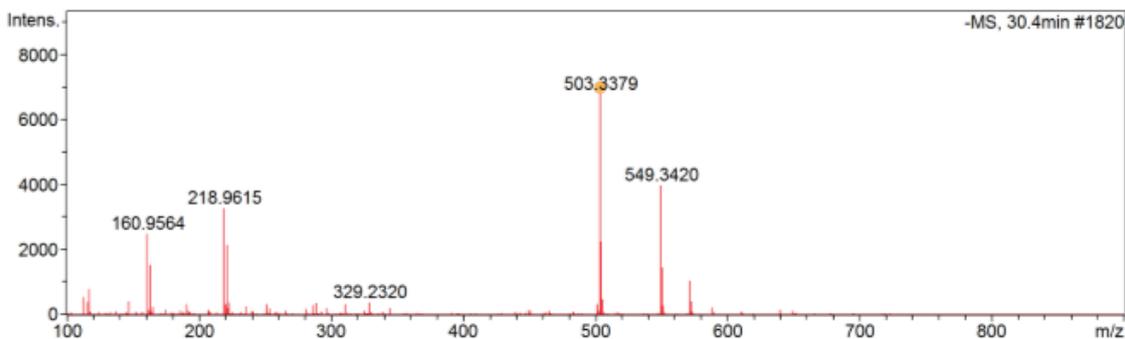


Figura 64: Fragmentograma m/z 503,3379, pico 16, modo negativo.

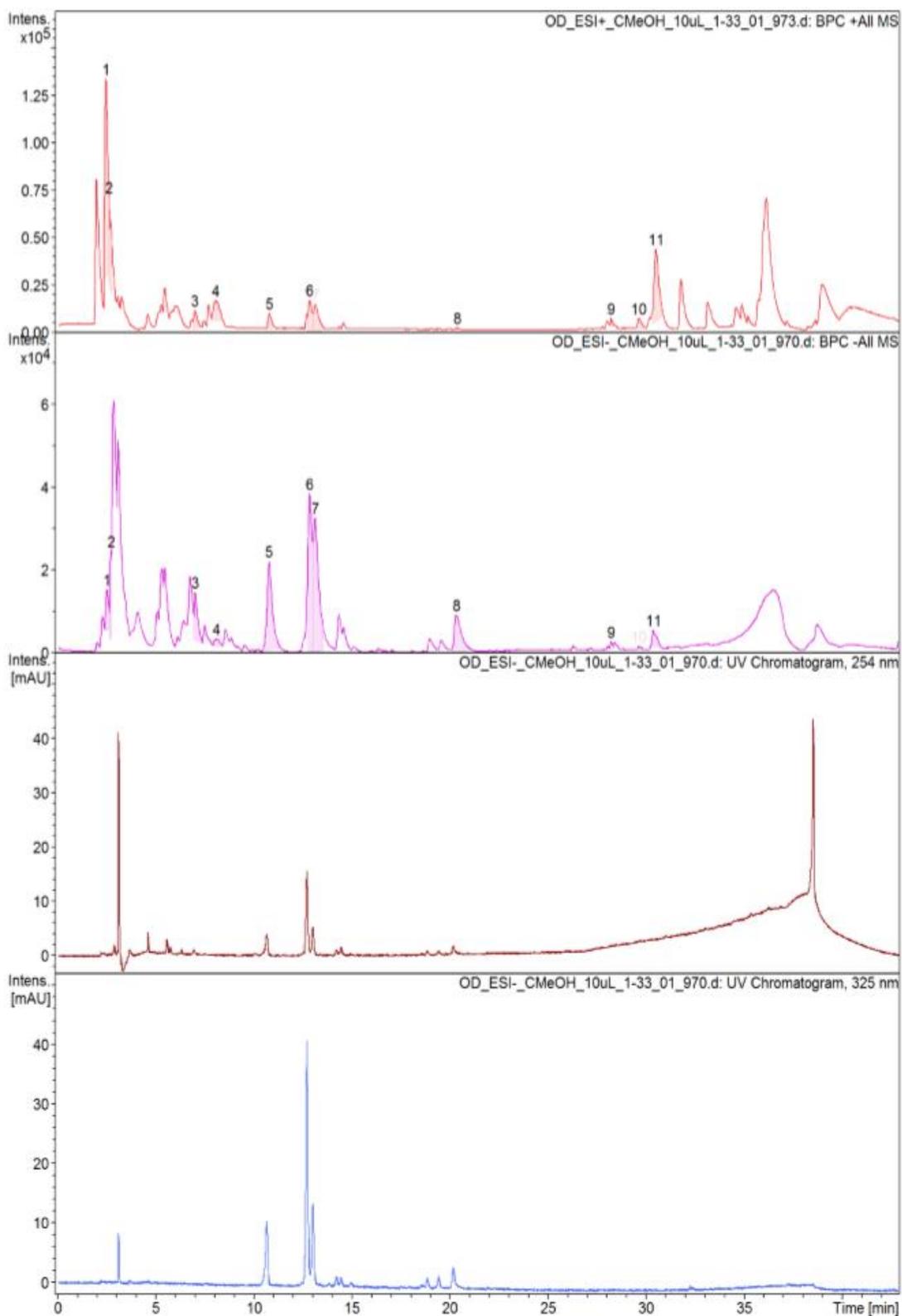


Figura 65: Cromatograma da fração 1 do extrato metanólico dos calos de *Duroia macrophylla*, mostrando os comprimentos de ondas 325 e 254 nm.

Espectros de massas da fração 1 do extrato metanólico dos calos de *Duroia macrophylla*, mostrando os fragmentos nos picos encontrados.

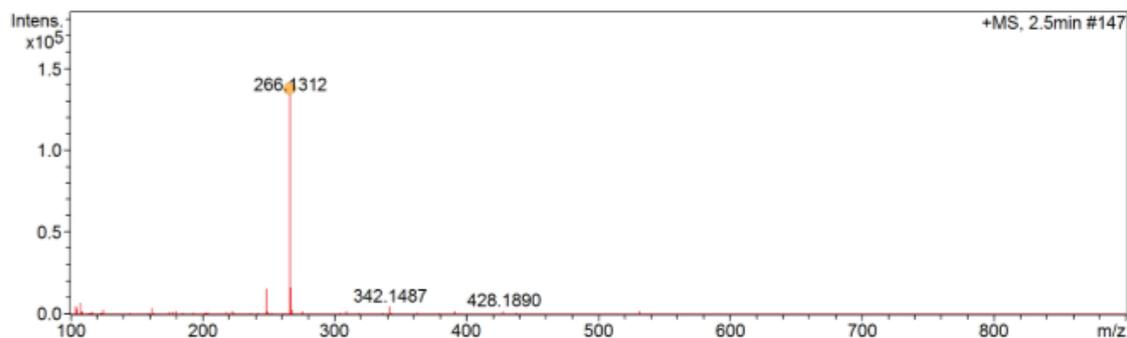


Figura 66: Fragmentograma m/z 266,1312, pico 1, modo positivo.

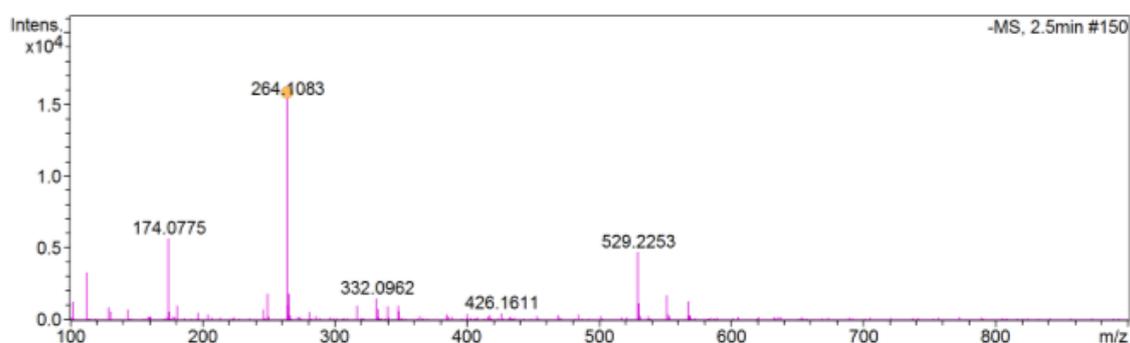


Figura 67: Fragmentograma m/z 264,1083, pico 1, modo negativo.

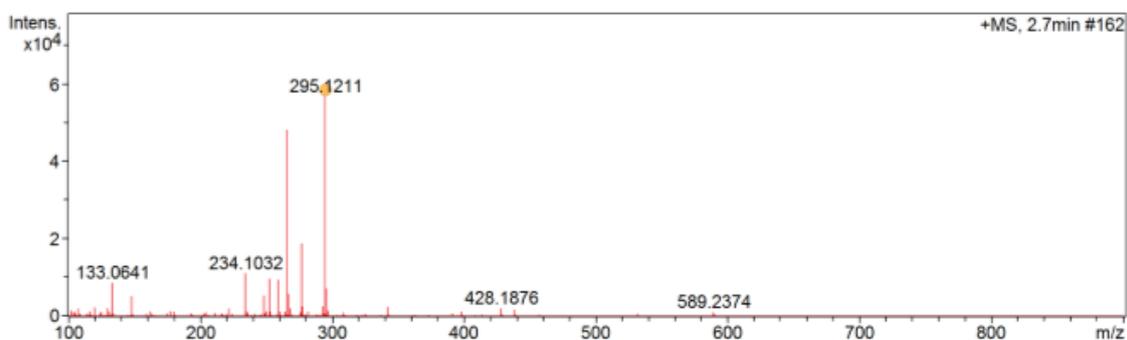


Figura 68: Fragmentograma m/z 295,1211, pico 2, modo positivo.

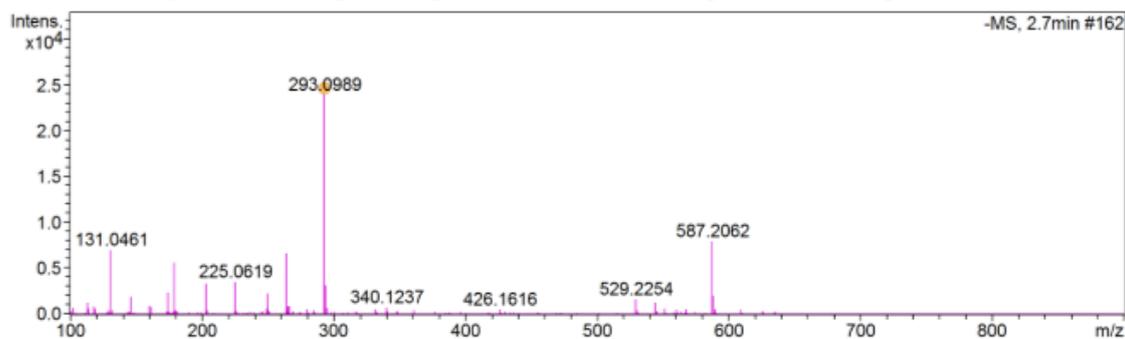


Figura 69: Fragmentograma m/z 293,0989, pico 2, modo negativo.

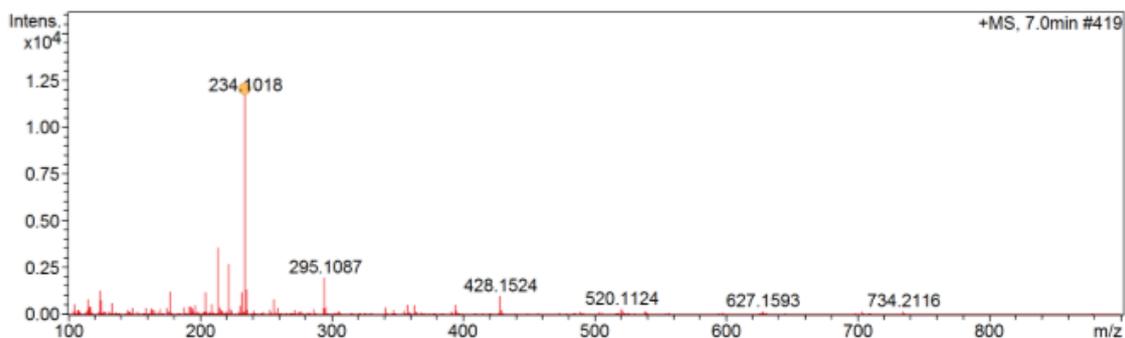


Figura 70: Fragmentograma m/z 234,1018, pico 3, modo positivo.

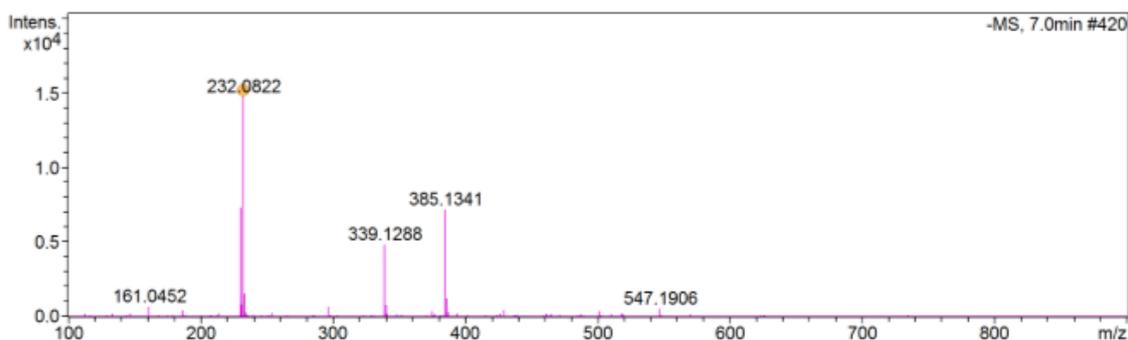


Figura 71: Fragmentograma m/z 232,0822, pico 3, modo negativo.

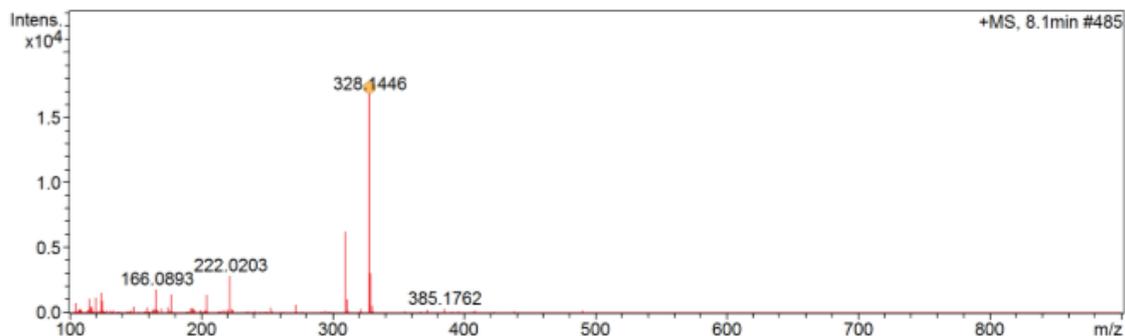


Figura 72: Fragmentograma m/z 328,1446, pico 4, modo positivo.

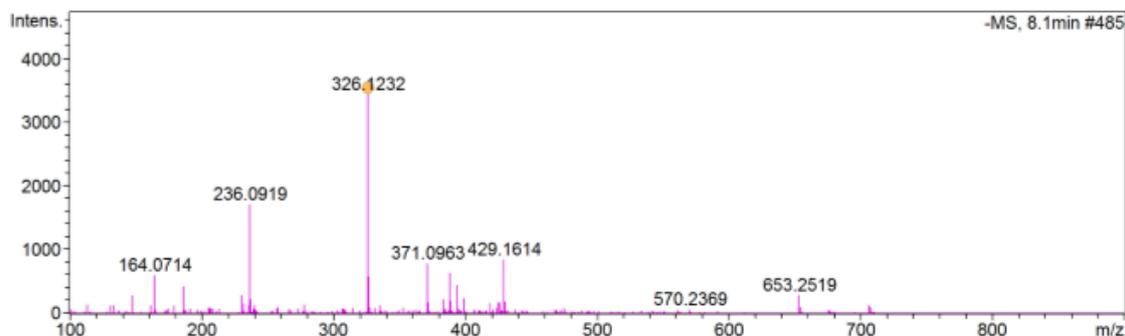


Figura 73: Fragmentograma m/z 326,1232, pico 4, modo negativo.

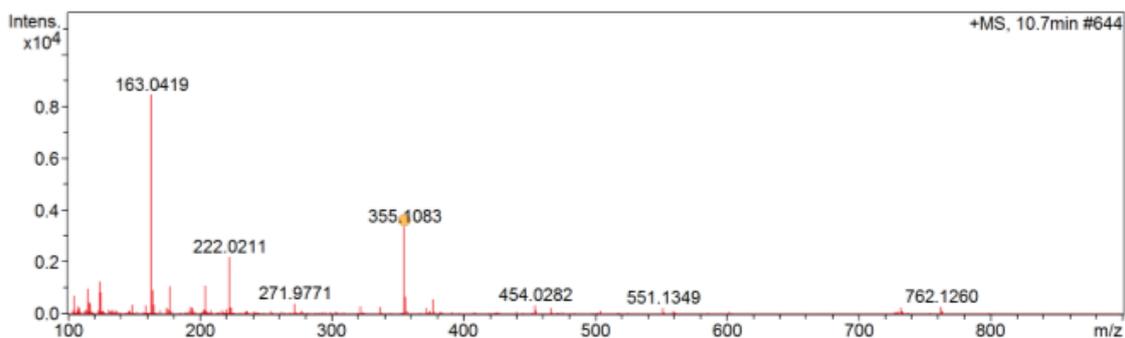


Figura 74: Fragmentograma m/z 355,1083, pico 5, modo positivo.

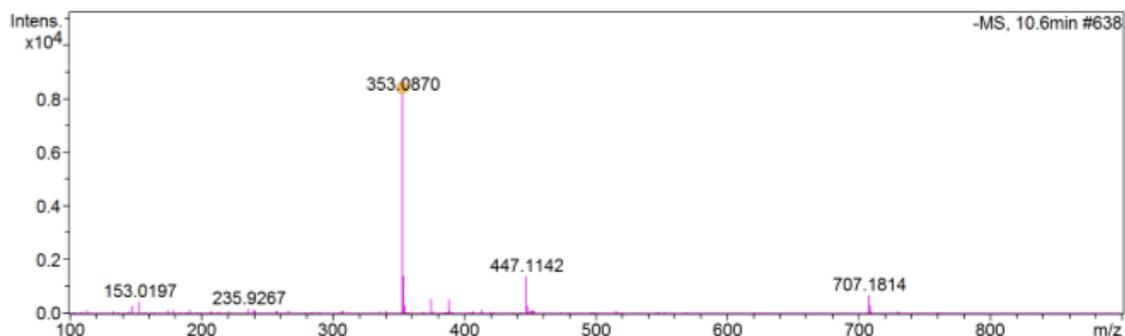


Figura 75: Fragmentograma m/z 353,0870, pico 5, modo negativo.

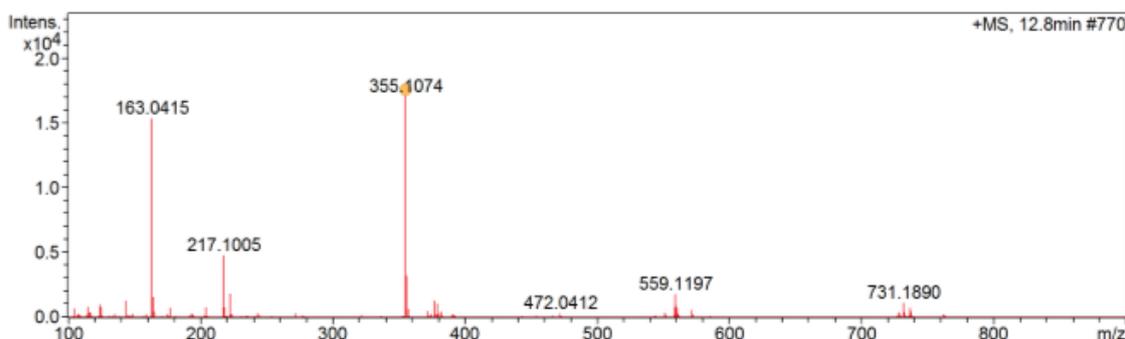


Figura 76: Fragmentograma m/z 355,1074, pico 6, modo positivo.

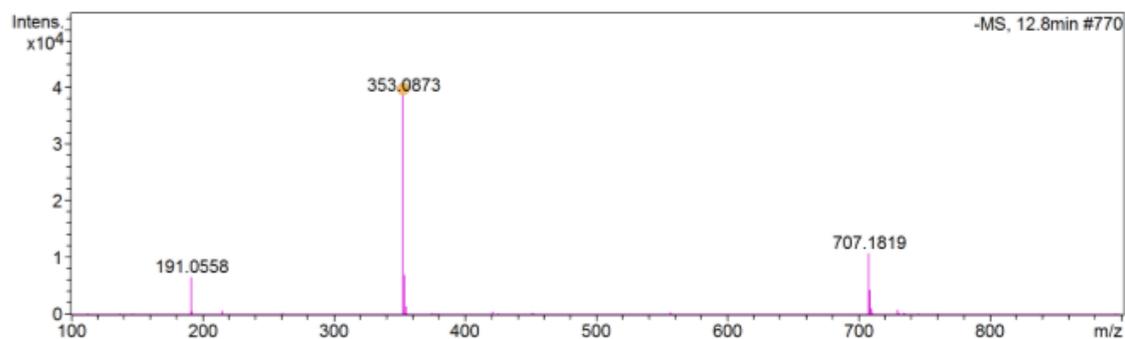


Figura77: Fragmentograma m/z 353,0873, pico 6, modo negativo.

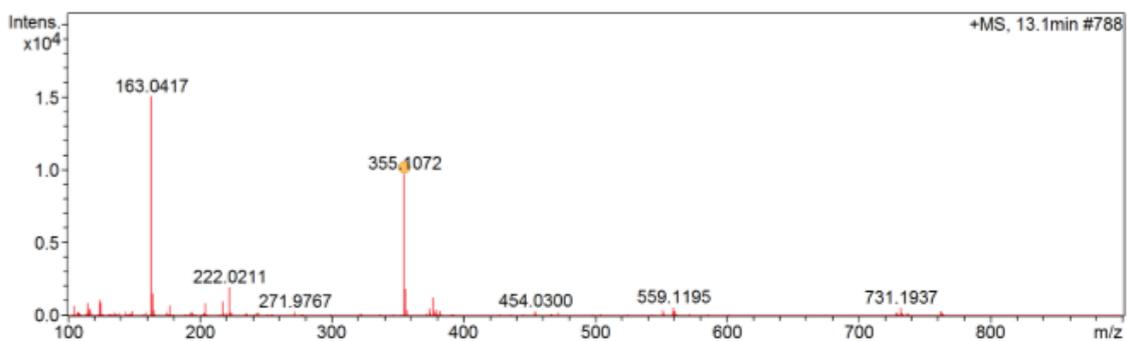


Figura 78: Fragmentograma m/z 355,1072, pico 7, modo positivo.

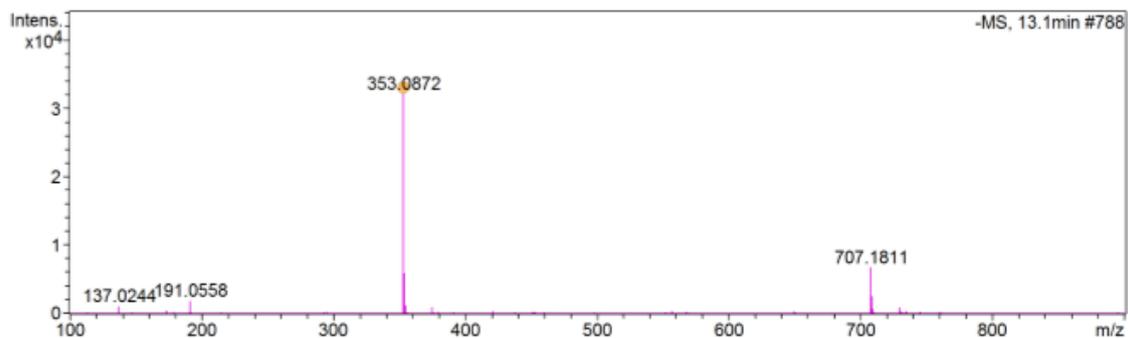


Figura 79: Fragmentograma m/z 353,0872, pico 7, modo negativo.

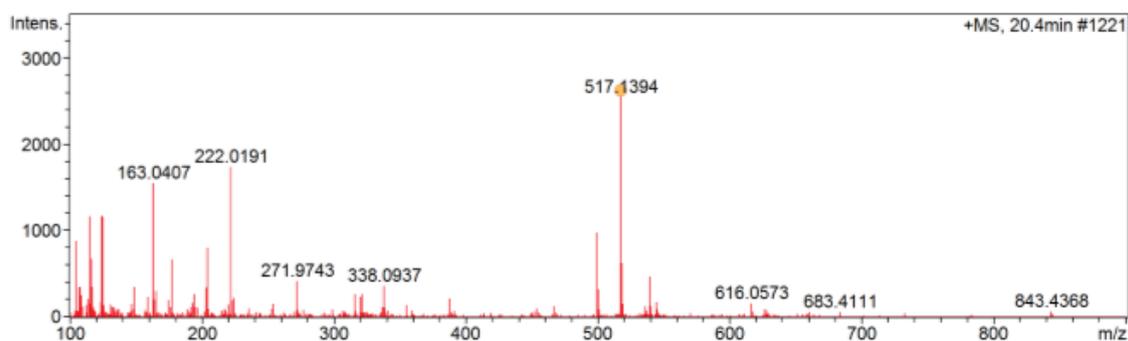


Figura 80: Fragmentograma m/z 517,1394, pico 8, modo positivo.

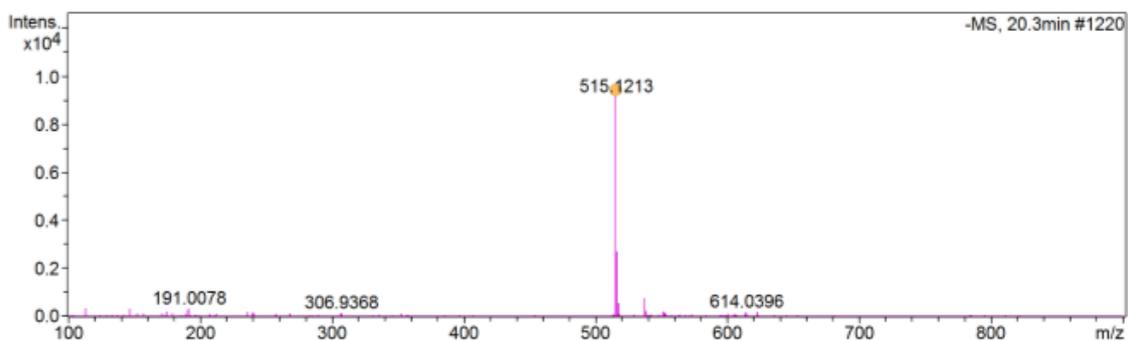


Figura 81: Fragmentograma m/z 515,1213, pico 8, modo negativo.

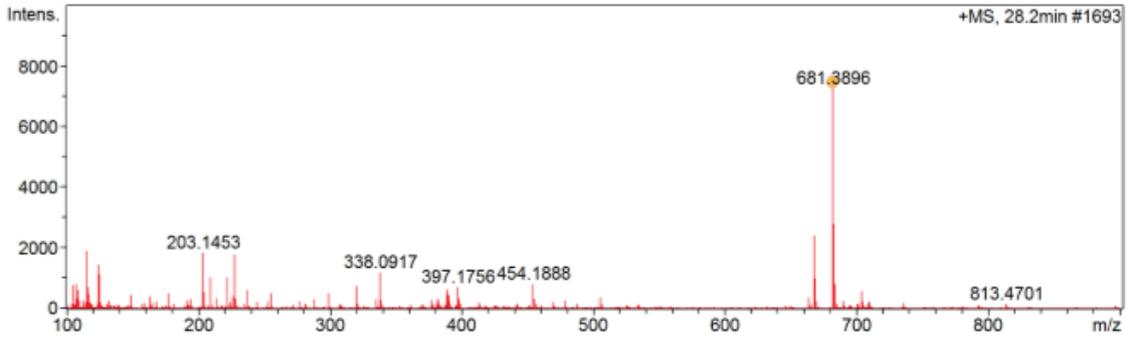


Figura 82: Fragmentograma m/z 681,1396, pico 9, modo positivo.

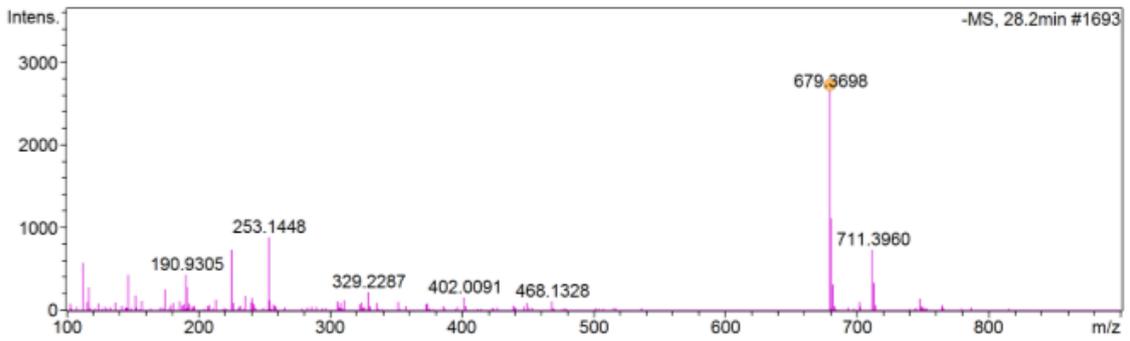


Figura 83: Fragmentograma m/z 679,3698, pico 9, modo negativo.

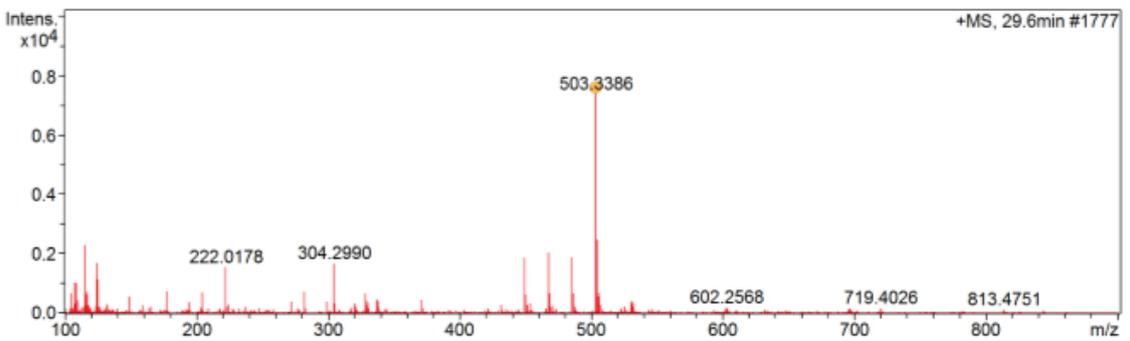


Figura 84: Fragmentograma m/z 503,3386, pico 10, modo positivo.

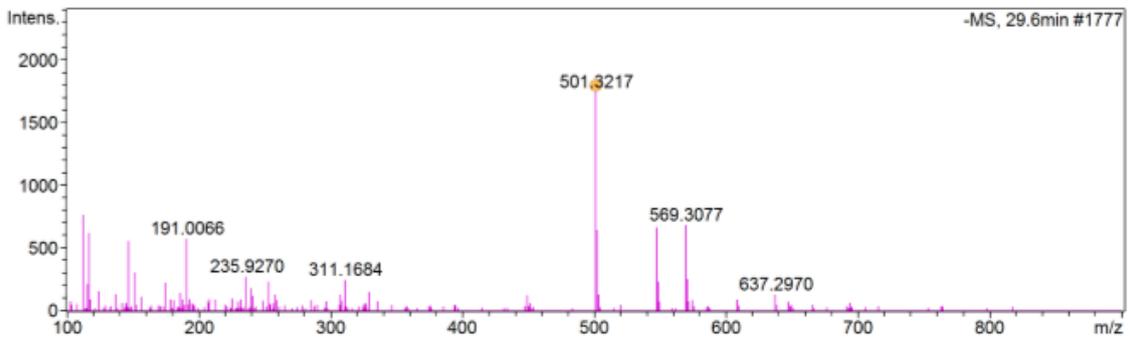


Figura 85: Fragmentograma m/z 501,3217, pico 10, modo negativo.

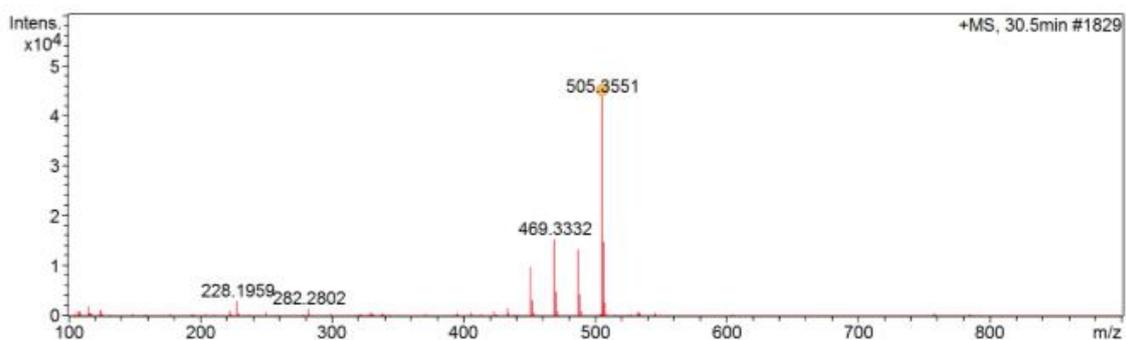


Figura 86: Fragmentograma m/z 505,3551, pico 11, modo positivo.

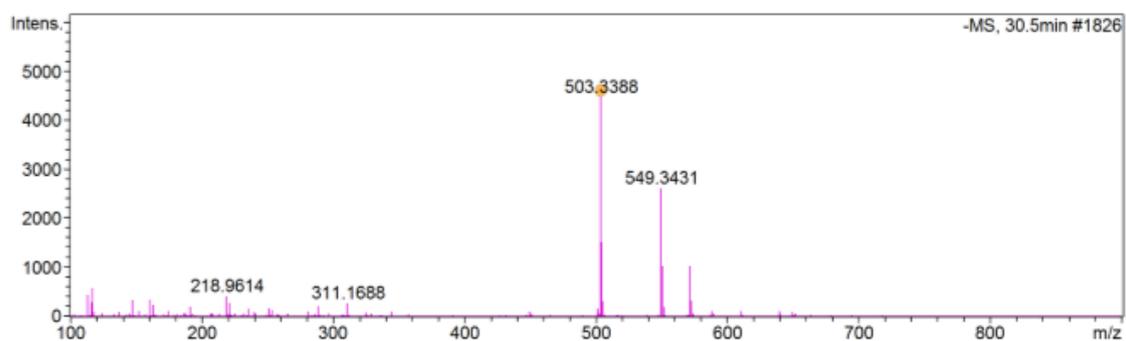


Figura 87: Fragmentograma m/z 503,3388, pico 11, modo negativo.

As tabelas 11, 12, 13 e 14 mostram as formulas moleculares propostas pelo software equipamento CL/EM (Compass for otofSeries 1.7 DataAnalysis Version 4.2 [Build 383.1]) para os picos encontrados nos espectros de massas dos extratos acetato de etila e metanólico dos calos de *D. macrophylla* no modo positivo e negativo.

Tabela 11. Fórmulas propostas pelo equipamento de CL/EM para os picos identificados no espectro de massas modo positivo, para a fração 1 do extrato acetato etila dos calos de *D. macrophylla*.

<i>m/z</i>	<i>t_R</i> (min)	Massa molecular	Fórmulas Possíveis	Erro (ppm)	m(Sigma)
Pico 1					
163,0596	2,8	163,0601	C₆H₁₁O₅	2,9	9,4
		163,0614	C ₇ H ₇ N ₄ O	11,1	15,2
Pico 2					
193,0407	3,3	193,0396	C ₁₂ H ₅ N ₂ O	-5,2	n.a.
Pico 3					
245,0768	5,5	245,0781	C₁₀H₉N₆O₂	5,5	9,1
		245,0768	C ₉ H ₁₃ N ₂ O ₆	0,1	9,7
		245,0755	C ₆ H ₅ N ₁₂	-5,4	14,1
Pico 4					
355,1019	10,8	355,1024	C₁₆H₁₉O₉	1,4	8,2
		355,0997	C ₁₂ H ₁₅ N ₆ O ₇	-6,2	9,2
		355,1010	C ₁₃ H ₁₁ N ₁₀ O ₃	-2,4	12,8
		355,0983	C ₉ H ₇ N ₁₆ O	-10,0	15,2
		355,0983	C ₁₁ H ₁₉ N ₂ O ₁₁	-9,9	19,5
		355,1037	C ₁₇ H ₁₅ N ₄ O ₅	5,2	21,8
		355,1050	C ₁₈ H ₁₁ N ₈ O	8,9	35,4
Pico 5					
355,1021	12,8	355,1024	C₁₆H₁₉O₉	0,6	3,7
		355,1010	C ₁₃ H ₁₁ N ₁₀ O ₃	-3,2	9,5
		355,1037	C ₁₇ H ₁₅ N ₄ O ₅	4,4	11,5
		355,0997	C ₁₂ H ₁₅ N ₆ O ₇	-6,9	17,3
		355,1050	C ₁₈ H ₁₁ N ₈ O	8,1	24,9
		355,0983	C ₁₁ H ₁₉ N ₂ O ₁₁	-10,7	29,8
Pico 6					
355,1020	13,1	355,1024	C₁₆H₁₉O₉	1,0	4,7
		355,1010	C ₁₃ H ₁₁ N ₁₀ O ₃	-2,8	10,3
		355,1037	C ₁₇ H ₁₅ N ₄ O ₅	4,8	10,9
		355,0997	C ₁₂ H ₁₅ N ₆ O ₇	-6,5	18,3
		355,1050	C ₁₈ H ₁₁ N ₈ O	8,6	24,3
		355,0983	C ₁₁ H ₁₉ N ₂ O ₁₁	-10,3	30,7
Pico 7					
355,1015	14,3	355,1024	C₁₆H₁₉O₉	2,5	31,8
		355,1037	C ₁₇ H ₁₅ N ₄ O ₅	6,2	36,3
		355,0997	C ₁₃ H ₁₁ N ₁₀ O ₃	-1,3	38,7

		355,0997	C ₁₂ H ₁₅ N ₆ O ₇	-5,1	38,7
		355,0983	C ₁₁ H ₁₉ N ₂ O ₁₁	-8,9	43,1
		355,1050	C ₁₈ H ₁₁ N ₈ O	10,0	44,5
		355,0978	C ₂₄ H ₁₁ N ₄	-10,3	62,7
Pico 8					
		177,0519	C ₆ H ₅ N ₆ O	-11,5	7,1
177,0540	6,0	177,0546	C ₁₀ H ₉ O ₃	3,7	9,5
		177,0506	C ₅ H ₉ N ₂ O ₅	-19,0	21,1
Pico 9					
		357,1167	C ₁₃ H ₁₃ N ₁₀ O ₃	-7,1	14,1
		357,1193	C ₁₇ H ₁₇ N ₄ O ₅	0,4	18,3
357,1192	15,2	357,1180	C₁₆H₂₁O₉	-3,3	20,7
		357,1207	C ₁₈ H ₁₃ N ₈ O	4,1	25,0
		357,1153	C ₁₂ H ₁₇ N ₆ O ₇	10,9	25,2
Pico 10					
		561,2205	C ₂₇ H ₂₉ N ₈ O ₆	5,5	18,6
		561,2178	C ₂₃ H ₂₅ N ₁₄ O ₄	0,7	20,3
		561,2191	C ₂₆ H ₃₃ N ₄ O ₁₀	3,1	20,8
561,2174	17,9	561,2178	C₂₅H₃₇O₁₄	0,7	28,2
		561,2191	C ₂₄ H ₂₁ N ₁₈	-3,1	30,2
		561,2146	C ₃₄ H ₂₅ N ₈ O	-5,0	49,9
		561,2173	C ₃₈ H ₂₉ N ₂ O ₃	-0,2	51,3
		561,2213	C ₄₃ H ₂₉ O	7,0	74,4
Pico 11					
		193,0495	C₁₀H₉O₄	1,3	22,0
193,0493	18,6	193,0509	C ₁₁ H ₅ N ₄	8,2	27,3
		193,0468	C ₆ H ₅ N ₆ O ₂	-12,6	29,9
		193,0455	C ₅ H ₉ N ₂ O ₆	-19,5	36,3
Pico 12					
		517,1354	C ₂₆ H ₂₁ N ₄ O ₈	1,4	3,1
		517,1340	C ₂₃ H ₁₃ N ₁₄ O ₂	-1,2	10,1
		517,1341	C ₂₅ H ₂₅ O ₁₂	-1,2	10,6
517,1347	19,0	517,1367	C ₂₇ H ₁₇ N ₈ O ₄	4,0	13,5
		517,1327	C ₂₂ H ₁₇ N ₁₀ O ₆	-3,8	14,6
		517,1314	C ₂₁ H ₂₁ N ₆ O ₁₀	-6,4	22,8
		517,1381	C ₂₈ H ₁₃ N ₁₂	6,6	28,8
		517,1335	C₃₈H₁₇N₂O	-2,2	62,8
Pico 13					
		517,1341	C ₂₅ H ₂₅ O ₁₂	-2,7	6,9
517,1354	19,5	517,1354	C ₂₆ H ₂₁ N ₄ O ₈	-0,1	7,7
		517,1327	C ₂₂ H ₁₇ N ₁₀ O ₆	-5,3	12,8
		517,1340	C ₂₃ H ₁₃ N ₁₄ O ₂	-2,7	14,2

		517,1367	$C_{27}H_{17}N_8O_4$	2,5	18,6
		517,1394	$C_{31}H_{21}N_2O_6$	7,7	29,0
		517,1381	$C_{28}H_{13}N_{12}$	5,1	34,5
		517,1335	$C_{38}H_{17}N_2O$	-3,7	66,4
Pico 14					
		517,1354	$C_{26}H_{21}N_4O_8$	0,1	7,0
		517,1341	$C_{25}H_{25}O_{12}$	-2,5	7,3
		517,1327	$C_{22}H_{17}N_{10}O_6$	-5,1	12,7
517,1353	20,2	517,1340	$C_{23}H_{13}N_{14}O_2$	-2,5	13,4
		517,1367	$C_{27}H_{17}N_8O_4$	2,7	17,9
		517,1314	$C_{21}H_{21}N_6O_{10}$	-7,7	19,7
		517,1381	$C_{28}H_{13}N_{12}$	5,3	33,7
		517,1335	$C_{38}H_{17}N_2O$	-3,5	65,8
Pico 15					
		517,1354	$C_{26}H_{21}N_4O_8$	-1,0	7,8
		517,1341	$C_{25}H_{25}O_{12}$	-3,6	10,3
		517,1340	$C_{23}H_{13}N_{14}O_2$	-3,6	13,6
517,1359	22,0	517,1327	$C_{22}H_{17}N_{10}O_6$	-6,2	14,6
		517,1367	$C_{27}H_{17}N_8O_4$	1,6	17,0
		517,1394	$C_{31}H_{21}N_2O_6$	6,8	27,4
		517,1381	$C_{28}H_{13}N_{12}$	4,2	32,2
		517,1335	$C_{38}H_{17}N_2O$	-4,6	64,4
Pico 16					
		505,3524	$C_{30}H_{49}O_6$	-0,8	2,9
505,3528	30,5	505,3510	$C_{27}H_{41}N_{10}$	-3,5	9,9
		505,3537	$C_{31}H_{45}N_4O_2$	1,9	10,9
		505,3497	$C_{26}H_{45}N_6O_4$	-6,1	15,0

Tabela 12. Fórmulas propostas pelo equipamento de CL/EM para os picos identificados no espectro de massas modo negativo, para a fração 1 do extrato acetato etila dos calos de *D. macrophylla*.

<i>m/z</i>	<i>t_R</i> (min)	Massa molecular	Fórmulas Possíveis	Erro (ppm)	<i>m</i> (Sigma)
Pico 1					
		161,0455	$C_6H_9O_5$	13,6	4,7
161,0434	2,9	161,0429	$C_2H_5N_6O_3$	-3,1	14,5
		161,0469	$C_7H_5N_4O$	21,9	16,5
		161,0397	$C_{13}H_5$	-22,9	13,5
Pico 2					

191,0534	3,3	191,0561	C ₇ H ₁₁ O ₆	14,4	8,4
		191,0548	C ₄ H ₃ N ₁₀	7,3	15,4
		191,0534	C ₃ H ₇ N ₆ O ₄	0,3	16,0
		191,0502	C ₁₄ H ₇ O	-16,4	45,1
Pico 3					
243,0597	5,7	243,0623	C ₉ H ₁₁ N ₂ O ₆	10,6	6,8
		243,0636	C₁₀H₇N₆O₂	16,1	12,0
		243,0609	C ₆ H ₃ N ₁₂	5,1	12,6
		243,0596	C ₅ H ₇ N ₈ O ₄	-0,4	19,6
		243,0564	C ₁₆ H ₇ N ₂ O	-13,5	38,0
Pico 4					
353,0847	10,8	353,0878	C₁₆H₁₇O₉	8,9	1,2
		353,0865	C ₁₃ H ₉ N ₁₀ O ₃	5,0	6,1
		353,0851	C ₁₂ H ₁₃ N ₆ O ₇	1,3	14,3
		353,0838	C ₁₁ H ₁₇ N ₂ O ₁₁	-2,5	27,4
		353,0819	C ₂₃ H ₁₃ O ₄	-7,8	41,7
		353,0833	C ₂₄ H ₉ N ₄	-4,0	55,2
Pico 5					
353,0853	12,9	353,0878	C₁₆H₁₇O₉	7,1	1,8
		353,0865	C ₁₃ H ₉ N ₁₀ O ₃	3,3	7,7
		353,0891	C ₁₇ H ₁₃ N ₄ O ₅	10,9	12,2
		353,0851	C ₁₂ H ₁₃ N ₆ O ₇	-0,5	15,6
		353,0838	C ₁₁ H ₁₇ N ₂ O ₁₁	-4,2	28,3
		353,0819	C ₂₃ H ₁₃ O ₄	-9,5	40,7
		353,0833	C ₂₄ H ₉ N ₄	-5,7	54,2
Pico 6					
353,0851	13,1	353,0878	C₁₆H₁₇O₉	7,7	3,4
		353,0865	C ₁₃ H ₉ N ₁₀ O ₃	3,9	9,5
		353,0851	C ₁₂ H ₁₃ N ₆ O ₇	0,1	17,0
		353,0838	C ₁₁ H ₁₇ N ₂ O ₁₁	-3,7	29,4
		353,0819	C ₂₃ H ₁₃ O ₄	-9,0	39,8
		353,0833	C ₂₄ H ₉ N ₄	-5,2	53,3
Pico 7					
353,0858	14,4	353,0878	C₁₆H₁₇O₉	5,6	67,2
		353,0891	C ₁₇ H ₁₃ N ₄ O ₅	9,4	69,0
		353,0819	C ₂₃ H ₁₃ O ₄	-11,1	72,0
		353,0865	C ₁₃ H ₉ N ₁₀ O ₃	1,8	74,0
		353,0851	C ₁₂ H ₁₃ N ₆ O ₇	-2,0	74,3
		353,0833	C ₂₄ H ₉ N ₄	-7,3	80,2
Pico 8					
179,0339	14,6	179,0350	C ₉ H ₇ O ₄	6,2	0,4
		179,0323	C ₅ H ₃ N ₆ O ₂	-8,8	13,5
		179,0363	C ₁₀ H ₃ N ₄	13,6	13,7
		179,0310	C ₄ H ₇ N ₂ O ₆	-16,3	26,8

Pico 9					
		355,1021	$C_{13}H_{11}N_{10}O_3$	2,2	11,3
		355,1048	$C_{17}H_{15}N_4O_5$	9,7	19,2
		355,1008	$C_{12}H_{15}N_6O_7$	-1,6	19,6
355,1013	15,2	355,1035	$C_{16}H_{19}O_9$	6,0	20,0
		355,0994	$C_{11}H_{19}N_2O_{11}$	-5,3	36,1
		355,0976	$C_{23}H_{15}O_4$	-10,6	43,6
		355,0989	$C_{24}H_{11}N_4$	-6,8	55,2
Pico 10					
		559,2032	$C_{25}H_{35}O_{14}$	2,8	10,6
		559,2046	$C_{26}H_{31}N_4O_{10}$	5,2	15,5
		559,2019	$C_{22}H_{27}N_{10}O_8$	0,4	16,8
		559,2005	$C_{21}H_{31}N_6O_{12}$	-2,0	20,1
		559,2032	$C_{23}H_{23}N_{14}O_4$	2,8	23,0
559,2016	17,9	559,2005	$C_{19}H_{19}N_{20}O_2$	-2,0	25,3
		559,1992	$C_{20}H_{35}N_2O_{16}$	-4,4	28,2
		559,2046	$C_{24}H_{19}N_{18}$	5,2	32,8
		559,1987	$C_{33}H_{27}N_4O_5$	-5,3	47,4
		559,2000	$C_{34}H_{23}N_8O$	-2,9	59,1
		559,2027	$C_{38}H_{27}N_2O_3$	1,9	70,3
Pico 11					
		191,0323	$C_6H_3N_6O_2$	1,8	4,6
191,0319	18,7	191,0350	$C_{10}H_7O_4$	15,9	14,0
		191,0310	$C_5H_7N_2O_6$	-5,2	17,1
Pico 12					
		515,1195	$C_{25}H_{23}O_{12}$	1,2	4,0
		515,1182	$C_{22}H_{15}N_{10}O_6$	-1,4	10,9
		515,1208	$C_{26}H_{19}N_4O_8$	3,8	11,1
		515,1168	$C_{21}H_{19}N_6O_{10}$	-4,0	15,6
515,1189	19,0	515,1195	$C_{23}H_{11}N_{14}O_2$	1,2	16,8
		515,1168	$C_{19}H_7N_{20}$	-4,0	17,7
		515,1222	$C_{27}H_{15}N_8O_4$	6,4	22,4
		515,1155	$C_{20}H_{23}N_2O_{14}$	-6,6	25,7
		515,1150	$C_{33}H_{15}N_4O_3$	-7,6	46,9
		515,1190	$C_{38}H_{15}N_2O$	0,2	70,4
Pico 13					
		515,1195	$C_{25}H_{23}O_{12}$	1,8	4,9
		515,1208	$C_{26}H_{19}N_4O_8$	4,4	9,3
		515,1182	$C_{22}H_{15}N_{10}O_6$	-0,8	11,2
515,1186	19,6	515,1195	$C_{23}H_{11}N_{14}O_2$	1,8	15,3
		515,1168	$C_{21}H_{19}N_6O_{10}$	-3,4	17,0
		515,1168	$C_{19}H_7N_{20}$	-3,4	17,8
		515,1222	$C_{27}H_{15}N_8O_4$	7,0	20,6

		515,1155	C ₂₀ H ₂₃ N ₂ O ₁₄	-6,0	27,4
		515,1150	C ₃₃ H ₁₅ N ₄ O ₃	-7,0	45,1
		515,1190	C₃₈H₁₅N₂O	0,8	68,7
Pico 14					
		515,1195	C ₂₅ H ₂₃ O ₁₂	1,1	4,1
		515,1208	C ₂₆ H ₁₉ N ₄ O ₈	3,7	8,1
		515,1182	C ₂₂ H ₁₅ N ₁₀ O ₆	-1,5	8,8
		515,1195	C ₂₃ H ₁₁ N ₁₄ O ₂	1,1	12,9
515,1189	20,5	515,1168	C ₁₉ H ₇ N ₂₀	-4,1	15,2
		515,1168	C ₂₁ H ₁₉ N ₆ O ₁₀	-4,1	16,4
		515,1222	C ₂₇ H ₁₅ N ₈ O ₄	6,3	19,7
		515,1155	C ₂₀ H ₂₃ N ₂ O ₁₄	-6,7	27,3
		515,1150	C ₃₃ H ₁₅ N ₄ O ₃	-7,7	44,8
		515,1190	C₃₈H₁₅N₂O	0,1	68,6
Pico 15					
		515,1195	C ₂₅ H ₂₃ O ₁₂	0,7	5,9
		515,1208	C ₂₆ H ₁₉ N ₄ O ₈	3,3	7,7
		515,1182	C ₂₂ H ₁₅ N ₁₀ O ₆	-1,9	11,5
		515,1195	C ₂₃ H ₁₁ N ₁₄ O ₂	0,7	13,8
515,1191	22,1	515,1168	C ₁₉ H ₇ N ₂₀	-4,5	17,8
		515,1168	C ₂₁ H ₁₉ N ₆ O ₁₀	-4,5	18,2
		515,1222	C ₂₇ H ₁₅ N ₈ O ₄	5,9	19,0
		515,1155	C ₂₀ H ₂₃ N ₂ O ₁₄	-7,1	28,9
		515,1190	C₃₈H₁₅N₂O	-0,3	67,2
Pico 16					
		503,3378	C₃₀H₄₇O₆	-0,2	1,2
503,3379	30,4	503,3365	C ₂₇ H ₃₉ N ₁₀	-2,9	8,2
		503,3392	C ₃₁ H ₄₃ N ₄ O ₂	2,4	12,0
		503,3351	C ₂₆ H ₄₃ N ₆ O ₄	-5,6	13,1

Tabela 13. Fórmulas propostas pelo equipamento de CL/EM para os picos identificados no espectro de massas modo positivo, para a fração 1 do extrato metanólico dos calos de *D. macrophylla*.

<i>m/z</i>	<i>t_R</i> (min)	Massa molecular	Fórmulas Possíveis	Erro (ppm)	<i>m</i> (Sigma)
Pico 1					
		266,1347	C ₉ H ₂₀ N ₃ O ₆	13,0	5
266,1312	2,5	266,1333	C ₆ H ₁₂ N ₁₃	7,9	9,6
		266,1288	C ₁₆ H ₁₆ N ₃ O	-9,1	37,7

Pico 2					
		295,1248	C ₉ H ₁₉ N ₄ O ₇	12,5	5,8
		295,1235	C ₆ H ₁₁ N ₁₄ O	7,9	10,1
295,1211	2,7	295,1176	C ₁₅ H ₁₉ O ₆	-11,9	23,2
		295,119	C ₁₆ H ₁₅ N ₄ O ₂	-7,4	36,8
		295,113	C ₂₁ H ₁₅ N ₂	6,2	63,3
Pico 3					
234,1018	7,0	234,0986	C₁₀H₁₂N₅O₂	-13,7	11,3
		234,1026	C ₁₅ H ₁₂ N ₃	3,5	36,6
Pico 4					
328,1446	8,1	328,1444	C ₂₁ H ₁₈ N ₃ O	-0,6	34,5
Pico 5					
		355,1122	C ₁₂ H ₁₁ N ₁₂ O ₂	11,1	16,7
355,1083	10,7	355,1050	C ₁₈ H ₁₁ N ₈ O	-9,2	18,2
		355,1077	C ₂₂ H ₁₅ N ₂ O ₃	-1,6	29,8
		355,1117	C ₂₇ H ₁₅ O	9,7	56,4
Pico 6					
		355,1037	C ₁₇ H ₁₅ N ₄ O ₅	-10,4	9,4
355,1074	12,8	355,1109	C ₁₁ H ₁₅ N ₈ O ₆	9,9	21,7
		355,1050	C₁₈H₁₁N₈O	-6,7	22,9
		355,1077	C ₂₂ H ₁₅ N ₂ O ₃	0,9	35,1
Pico 7					
		355,1037	C ₁₇ H ₁₅ N ₄ O ₅	-9,9	9,5
355,1072	13,1	355,1109	C ₁₁ H ₁₅ N ₈ O ₆	10,4	22,0
		355,1050	C₁₈H₁₁N₈O	-6,1	22,8
		355,1077	C ₂₂ H ₁₅ N ₂ O ₃	1,5	34,9
Pico 8					
		517,1426	C ₂₀ H ₂₁ N ₈ O ₉	6,1	7,1
		517,1413	C ₁₉ H ₂₅ N ₄ O ₁₃	3,6	10,2
		517,1413	C ₁₇ H ₁₃ N ₁₈ O ₃	3,5	13,7
		517,1399	C ₁₆ H ₁₇ N ₁₄ O ₇	0,9	14,8
		517,1399	C ₁₈ H ₂₉ O ₁₇	1,0	20,8
517,1394	20,4	517,1354	C ₂₆ H ₂₁ N ₄ O ₈	-7,8	28,5
		517,1367	C ₂₇ H ₁₇ N ₈ O ₄	-5,2	40,0
		517,1394	C₃₁H₂₁N₂O₆	0,0	51,7
		517,1381	C ₂₈ H ₁₃ N ₁₂	-2,6	59,5
		517,1408	C ₃₂ H ₁₇ N ₆ O ₂	2,6	63,3
		517,1434	C ₃₆ H ₂₁ O ₄	7,8	75,3

Pico 9					
		681,3930	C ₃₁ H ₅₃ N ₈ O ₉	5,0	14,0
		681,3917	C ₂₈ H ₄₅ N ₁₈ O ₃	3,0	19,9
		681,3858	C ₃₇ H ₅₃ N ₄ O ₈	-5,6	19,9
		681,3917	C ₃₀ H ₅₇ N ₄ O ₁₃	3,0	21,5
681,3896	28,2	681,3871	C₃₈H₄₉N₈O₄	-3,7	31,4
		681,3903	C ₂₉ H ₆₁ O ₁₇	1,0	31,5
		681,3898	C ₄₂ H ₅₃ N ₂ O ₆	0,3	42,7
		681,3885	C ₃₉ H ₄₅ N ₁₂	-1,7	43,0
		681,3912	C ₄₃ H ₄₉ N ₆ O ₂	2,2	54,5
Pico 10					
		503,3367	C ₃₀ H ₄₇ O ₆	-3,8	6,5
503,3386	29,6	503,3381	C₃₁H₄₃N₄O₂	-1,2	11,0
		503,3354	C ₂₇ H ₃₉ N ₁₀	-6,5	11,4
		503,3421	C ₃₆ H ₄₃ N ₂	6,8	32,9
Pico 11					
		505,3524	C ₃₀ H ₄₉ O ₆	-5,4	4,6
505,3551	30,5	505,3537	C₃₁H₄₅N₄O₂	-2,8	8,0
		505,3577	C ₃₆ H ₄₅ N ₂	5,2	31,9

Tabela 14. Fórmulas propostas pelo equipamento de CL/EM para os picos identificados no espectro de massas modo negativo, para a fração 1 do extrato metanólico dos calos de *D. macrophylla*.

<i>m/z</i>	t _R (min)	Massa molecular	Fórmulas Possíveis	Erro (ppm)	m (Sigma)
Pico 1					
		264,1089	C ₁₀ H ₁₈ NO ₇	2,3	1,1
264,1083	2,5	264,1075	C ₇ H ₁₀ N ₁₁ O	-2,8	6,7
		264,1102	C ₁₁ H ₁₄ N ₅ O ₃	7,3	12,8
		264,1062	C ₆ H ₁₄ N ₇ O ₅	-7,9	14,5
Pico 2					
		293,0990	C ₁₀ H ₁₇ N ₂ O ₈	0,5	6,8
		293,1004	C ₁₁ H ₁₃ N ₆ O ₄	5,1	8,8
293,0989	2,7	293,0977	C ₇ H ₉ N ₁₂ O ₂	-4,1	10,9
		293,0964	C ₆ H ₁₃ N ₈ O ₆	-8,7	20,3
		293,1017	C ₁₂ H ₉ N ₁₀	9,6	22,1
		293,0972	C ₂₂ H ₁₃ O	-5,8	62,5

Pico 3					
232,0822	7,0	232,0827	$C_9H_{14}NO_6$	1,9	0,8
		232,0813	$C_6H_6N_{11}$	-3,9	7,3
		232,0800	$C_5H_{10}N_7O_4$	-9,7	12,8
		232,0840	$C_{10}H_{10}N_5O_2$	7,7	14,7
Pico 4					
326,1232	8,1	326,1245	$C_{15}H_{20}NO_7$	4,0	2,4
		326,1232	$C_{12}H_{12}N_{11}O$	-0,2	6,8
		326,1218	$C_{11}H_{16}N_7O_5$	-4,3	11,4
		326,1259	$C_{16}H_{16}N_5O_3$	8,1	15,9
		326,1205	$C_{10}H_{20}N_3O_9$	-8,4	24,3
Pico 5					
353,0870	10,6	353,0878	$C_{16}H_{17}O_9$	2,1	3,9
		353,0865	$C_{13}H_9N_{10}O_3$	-1,7	9,4
		353,0851	$C_{12}H_{13}N_6O_7$	5,5	11,2
		353,0891	$C_{17}H_{13}N_4O_5$	-5,9	17,5
		353,0851	$C_{11}H_{17}N_2O_{11}$	-9,2	23,2
		353,0905	$C_{18}H_9N_8O$	9,7	31,1
		353,0833	$C_{24}H_9N_4$	-10,7	59,4
Pico 6					
353,0873	12,8	353,0878	$C_{16}H_{17}O_9$	1,3	2,3
		353,0865	$C_{13}H_9N_{10}O_3$	-2,5	9,2
		353,0891	$C_{17}H_{13}N_4O_5$	5,1	13,6
		353,0851	$C_{12}H_{13}N_6O_7$	-6,3	15,2
		353,0905	$C_{18}H_9N_8O$	8,9	27,1
		353,0838	$C_{11}H_{17}N_2O_{11}$	-10,1	27,5
Pico 7					
353,0872	13,1	353,0878	$C_{16}H_{17}O_9$	1,7	3,2
		353,0865	$C_{13}H_9N_{10}O_3$	-2,2	9,0
		353,0891	$C_{17}H_{13}N_4O_5$	5,4	11,6
		353,0851	$C_{12}H_{13}N_6O_7$	-5,9	16,8
		353,0905	$C_{18}H_9N_8O$	9,2	25,1
		353,0838	$C_{11}H_{17}N_2O_{11}$	-9,7	29,4
		353,0833	$C_{24}H_9N_4$	-11,2	53,3
Pico 8					
515,1213	20,3	515,1208	$C_{26}H_{19}N_4O_8$	-0,9	2,7
		515,1195	$C_{23}H_{11}N_{14}O_2$	-3,5	7,8
		515,1195	$C_{25}H_{23}O_{12}$	-3,5	9,2
		515,1182	$C_{22}H_{15}N_{10}O_6$	-6,1	11,8
		515,1222	$C_{27}H_{15}N_8O_4$	1,7	14,4
		515,1249	$C_{31}H_{19}N_2O_6$	6,9	26,1
		515,1235	$C_{28}H_{11}N_{12}$	4,3	30,1
		515,119	$C_{38}H_{15}N_2O$	-4,5	63,8
Pico 9					

		679,3712	$C_{37}H_{51}N_4O_8$	2,1	7,1
		679,3699	$C_{34}H_{43}N_{14}O_2$	0,1	13,4
		679,3699	$C_{36}H_{55}O_{12}$	0,1	13,7
679,3698	28,2	679,3726	$C_{38}H_{47}N_8O_4$	4,1	13,7
		679,3686	$C_{33}H_{47}N_{10}O_6$	-1,8	17,6
		679,3672	$C_{32}H_{51}N_6O_{10}$	-3,8	26,6
		679,3659	$C_{31}H_{55}N_2O_{14}$	-5,8	37,1
		679,3694	$C_{49}H_{47}N_2O$	-0,6	61,9
Pico 10					
		501,3235	$C_{31}H_{41}N_4O_2$	3,6	9,8
501,3217	29,6	501,3222	$C_{30}H_{45}O_6$	0,9	20,0
		501,3208	$C_{27}H_{37}N_1O$	-1,8	24,7
		501,3195	$C_{26}H_{41}N_6O_4$	-4,4	32,4
Pico 11					
		503,3378	$C_{30}H_{47}O_6$	-2,0	4,0
503,3388	30,5	503,3392	$C_{31}H_{43}N_4O_2$	0,6	8,8
		503,3365	$C_{27}H_{39}N_{10}$	-4,7	10,0
		503,3351	$C_{26}H_{43}N_6O_4$	-7,3	16,5

O software do equipamento de CL/MS gerou valores de erros correspondentes a precisão das massas expressas em ppm, e ainda, valores que relacionam o padrão isotópico teórico e medido do pico de massa de interesse (Sigma), que combinam o desvio padrão das massas e intensidades para todos os picos isotópicos. Os valores são dados em (miliSigma) e os números mais baixos indicam um ajuste melhor.

Mediante a observação dos parâmetros fornecidos pelo equipamento (erro e Sigma) associados às informações de mesma fórmula proposta nos modos positivo e negativo, aliadas aos menores erros, pode-se inferir que para a fração 1 do extrato acetato de etila dos calos tem-se as seguintes fórmulas moleculares associadas às substâncias presentes nos picos:

- pico 1: $C_6H_{11}O_5$;
- pico 3: $C_{10}H_8N_6O_2$;
- pico 4: $C_{16}H_{18}O_9$;
- pico 5: $C_{16}H_{18}O_9$;
- pico 6: $C_{16}H_{18}O_9$;
- pico 7: $C_{16}H_{18}O_9$;
- pico 9: $C_{16}H_{18}O_9$;
- pico 10: $C_{25}H_{35}O_{14}$;
- pico 11: $C_{10}H_8O_4$;
- pico 12: $C_{38}H_{16}N_2O$;
- pico 13: $C_{38}H_{16}N_2O$;
- pico 14: $C_{38}H_{16}N_2O$;

- pico 15: $C_{38}H_{16}N_2O$;
- pico 16: $C_{30}H_{46}O_6$.

Assim como, para a fração 1 do extrato metanólico dos calos pode-se inferir que:

- pico 3: $C_{10}H_{11}N_5O_2$;
- pico 6: $C_{18}H_{10}N_8O$;
- pico 7: $C_{18}H_{10}N_8O$;
- pico 8: $C_{31}H_{20}N_2O_6$;
- pico 9: $C_{38}H_{48}N_8O_4$;
- pico 10: $C_{31}H_{42}N_4O_2$;
- pico 11: $C_{31}H_{42}N_4O_2$.

5. 6 Ensaio antimicrobiano

Muitos microrganismos atuam numa diversidade de infecções no ser humano afetando regiões como: trato respiratório, circulação sanguínea, pele, tecidos moles, e outros, tornando-se um problema particular em unidades de terapia intensiva onde numerosos surtos têm sido extremamente difíceis de controlar (GORDON & WAREHAM, 2010). Além disso, outros organismos animais também podem padecer de enfermidades como consequência da ação de microrganismos, o que pode ocasionar surtos naturais em espécies levando à mortalidade em massa, como no caso de peixes por exemplo, o que é desvantajoso para a aquicultura (PARK *et al.*, 2017).

Um meio de combater ou curar os malefícios de microrganismos é a terapia com antibióticos, mas o desenvolvimento de cepas resistentes aos antibióticos pode impedir o uso da antibioticoterapia (YARAHMADI, *et al.*, 2016). Com isso, o aumento de enfermidades oportunistas e da resistência antimicrobiana de microrganismos patogênicos tem levado à descoberta e desenvolvimento de novas drogas que inibam esses agressores (RODRIGUES *et al.*, 2014).

O extrato hexânico das folhas e os extratos acetato de etila e metanólico dos calos de *D. macrophylla* foram testados contra as cepas das bactérias: *Aeromonas hydrophila*, *Acinetobacter baumannii*, *Citrobacter freundii*, *Edwardsiella tarda*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Propionibacterium acnes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella enteritidis*,

Staphylococcus aureus, *Serratia marcescens*, *Yersinia enterocolitica*, e dos fungos: *Candida albicans* e *Candida parapsilosis*.

Com relação ao ensaio de concentração inibitória mínima (CIM) do extrato hexânico das folhas de *D. macrophylla* (Tabela 15), os resultados indicaram que o extrato tem maior potencial para inibir o crescimento microbiano das cepas testadas *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* nas concentrações de 1000 µg/mL, respectivamente, e para *Edwardsiella tarda* na concentração de 250 µg/mL.

Para o ensaio de CIM dos extratos dos calos de *D. macrophylla* (Tabela 16) estes foram eficazes na redução do crescimento microbiano nas cepas de *Acinetobacter baumannii*, *Aeromonas hydrophila*, *Candida albicans* e *Candida parapsilosis*. O extrato acetato de etila dos calos foi capaz de inibir o crescimento microbiano na CIM de 1000 µg/mL frente as cepas de *Acinetobacter baumannii* e *Candida albicans*, para a cepa de *Candida parapsilosis* foi observada redução do crescimento em 60 µg/mL e para a cepa de *Aeromonas hydrophila* em 30 µg/mL. Para o extrato metanólico dos calos foi observada redução do crescimento em 125 µg/mL para a cepa de *Aeromonas hydrophila*, em 60 µg/mL para as cepas de *Acinetobacter baumannii* e *Candida parapsilosis* e em 30 µg/mL para a cepa de *Candida albicans*.

Tabela 15: Potencial antimicrobiano do extrato hexânico das folhas de *D. macrophylla* sobre diferentes cepas (CIM)

Microrganismos	FHEX (µg/mL)
<i>Edwardsiella tarda</i>	250
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1000
<i>Serratia marcescens</i>	1000

Tabela 16: Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos acetato de etila e metanólico dos calos de *D. macrophylla* sobre diferentes cepas

Microrganismos	CAcOEt (µg/mL)	CMeOH (µg/mL)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	1000	60
<i>Aeromonas hydrophila</i>	30	125
<i>Candida albicans</i>	1000	30
<i>Candida parapsilosis</i>	60	60

Os resultados encontrados em outros estudos com espécies da família Rubiaceae podem comprovar as atividades antimicrobianas observadas neste estudo. Niño e colaboradores (2006) observaram a atividade de outra Rubiaceae (*Gonzalagunia rosea*) frente à *Candida albicans*. Rodrigues e colaboradores (2014) verificaram a atividade antifúngica em espécies de Rubiaceae (*Ferdinandusa paraensis*, *Ferdinandusa hirsuta*, *Ferdinandusa goudotiana*, *Palicourea corymbifera* e *Palicourea guianensis*) frente à *Candida albicans* e *Candida parapsilosis*.

A família Rubiaceae se destaca pela produção de metabólitos secundários e entre as classes encontradas estão os terpenos (MARTINS e NUNEZ, 2015). Por exemplo, a espécie *Duroia macrophylla*, de onde foram isolados dois triterpenos, que apresentaram atividade contra *Mycobacterium tuberculosis* (MARTINS *et al.*, 2014).

Foram observados nos espectros de RMN de ^1H das frações do extrato hexânico e dos extratos acetato de etila e metanólico dos calos de *D. macrophylla*, sinais de deslocamentos químicos que sugerem a possível presença de substâncias terpênicas nos extratos fracionados. Segundo Dorman e Deans (2000), esta classe de metabólitos possui propriedade antibacteriana que pode estar relacionada às suas propriedades lipofílicas e suas interações com as bicamadas fosfolipídicas das células dos microrganismos, o que pôde ter gerado a diferença de atividades de inibição nos extratos avaliados neste estudo.

6 CONCLUSÃO

Por meio do estudo fitoquímico realizado com o extrato hexânico das folhas de *D. macrophylla* foi possível verificar a presença do esteroide sitosterol em mistura com ácidos graxos, conforme os sinais de deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN de ^1H das suas frações comparados com a literatura. Também a presença de um sesquiterpeno em mistura com uma cadeia alifática (“graxa”), devido à pouca massa não foi possível purificá-lo para permitir a identificação estrutural.

O estudo fitoquímico do extrato acetato de etila dos calos permitiu a obtenção de duas frações com elevado grau de pureza. Uma contendo um triterpeno e outra um açúcar. Porém, até o momento de concluir este trabalho, não foi possível realizar a identificação estrutural.

A partir da análise de Espectrometria de Massas realizadas com as frações dos extratos acetato de etila e metanólicos dos calos de *D. macrophylla*, foi possível inferir a fórmula molecular de 14 e 7 substâncias, respectivamente.

Em relação à atividade antimicrobiana o extrato hexânico das folhas de *D. macrophylla* mostrou apresentou atividade frente às bactérias *Edwardsiella tarda*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Serratia marcescens*, enquanto que os extratos acetato de etila e metanólico mostraram atividade frente às cepas de *Acinetobacter baumannii*, *Aeromonas hydrophila*, *Candida albicans* e *Candida parapsilosis*.

Este estudo foi possível conhecer um pouco mais sobre o perfil químico desta espécie, principalmente com relação aos extratos dos calos, e ainda, avaliar o potencial biológico dos extratos como agentes antimicrobianos.

7 REFERÊNCIAS

- AITCHISON, P.A.; MACLEOD, A.J.; YEOMAN, M.M. Growth patterns in tissue (callus) cultures. In: Plant tissue and cell culture. 2 ed. **Oxford: Blackwell Scientific Publications**. H.E. Street, 267-306, 1977.
- AQUINO, R.; DE TOMMASI, N.; TAPIA, M.; LAURO, M.R.; RASTRELLI, L. New 3-Methoxyflavones, and Iridoid Lactone and a Flavonol from *Duroia hirsuta*. **Journal of Natural Products**, 62 (4): 1999.
- ASTOLFI-FILHO, S.; SILVA, C. G. N.; BIGI, M. F. M. A. Ciência, tecnologia e inovação para o desenvolvimento da Amazônia Legal: bioprospecção e biotecnologia. Brasília, DF. **Parcerias Estratégicas**, 19 (38): 45-80, 2014.
- BARREIRO, E. J; BOLZANI, V. da S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química. Nova**, 32 (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. 2015. *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: 23/06/2017.
- BRISKIN, D. P. Medicinal Plants and Phytomedicines. Linking Plant Biochemistry and Physiology to Human Health. **Plant Physiology**, 124 (2): 507-514, 2000.
- CANHOTO, J.M. **Biotecnologia Vegetal: da Clonagem de Plantas à Transformação Genética**. Imprensa da Universidade de Coimbra, Coimbra, 2010.

- CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A. 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): 1998.
- CLARDY, J.; WALSH, C. Lessons from natural molecules. **Nature**, 32: 829-837, 2004.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard. Franklin Lakes, NJ: **CLSI**; (CLSI document M7-A6 CLSI). 6ed., 2003.
- COSTA, D. A. ; CHAVES, M. H.; SILVA, W. C. S.; COSTA, C. L. S. Constituintes químicos, fenóis totais e atividade antioxidante de *Sterculia striata* St. Hil. et Naudin. **Acta Amazônica**, 40 (1): 207–212. 2010.
- CROTEAU, R.; KUTCHAN, T.M.; LEWIS, N.G. Natural Products (Secondary Metabolites). In: BUCHANAN, B., GRUISSEM, W., JONES, R. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**, Rockville: **American Society of Plant Physiologists**, 1250-1318, 2000.
- DAVIES, J.; DAVIES, D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 74 (3): 417-433, 2010.
- DIAS, 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, antimicobacteriana e larvicida de *Duroia macrophylla* e *D. saccifera*. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, 1: 1, 2016.
- DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica. **UNESP**, 1 ed. São Paulo, SP, 2003.

- ELOFF, J. N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. **Planta Medica**, 64: 711-713, 1998.
- ENRÍQUEZ, G. Amazônia – Rede de inovação de dermocosméticos - Sub-rede de dermocosméticos na Amazônia a partir do uso sustentável de sua biodiversidade com enfoques para as cadeias produtivas da castanha-do-pará e dos óleos de andiroba e copaíba. **Parcerias Estratégicas**, 14: 28, 2010.
- FAIRBROTHERS, D. E. Chemosystematics with emphasis on systematic serology. In *Modern Methods in Plant Taxonomy*; Heywood, V.H., Ed.; **International Association for Plant Taxonomy**: Stockholm, Sweden, 18: 141–174. 1968
- FARIAS, F.M. *Psychotria myriantha* Müll Arg. (Rubiaceae): Caracterização dos alcalóides e avaliação das atividades anti-quimiotáxica e sobre o sistema nervoso central. Ph.D. Thesis, **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre, RS, Brazil, 2006.
- FUMAGALI, E.; GONÇALVES, R.A.C.; MACHADO, M.F.P.S.; VIDOTI, G.J.; OLIVEIRA, A. J.B. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: O exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, 18 (4), 2008.
- GIORDANI, R. B.; PAGLIOSA, L. B.; HENRIQUES, A. T.; ZUANAZZI, J. A. S. Investigação do potencial antioxidante e anticolinesterásico de *Hippeastrum* (Amaryllidaceae). **Química Nova**, 31 (8): 2042-2046, 2008.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas Medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, 30 (2): 374-381, 2007.
- GORDON, N. C., WAREHAM, D. W. Multidrug-resistant: mechanisms of virulence and resistance. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 35 (3): 219-226. 2010.

- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa-SPI/Embrapa- CNPH, 1: 183-260, 1998.
- HOUGHTON, P. J. Use of small scale bioassays in the discovery of novel drugs from natural sources. **Phytotherapy Research**, (14): 419-423, 2000.
- KHAN, M.T.H.; ATHER, A.; THOMPSON, K.D.; GAMBARI, R. Extracts and molecules from medicinal plants against *herpes simplex* viruses, **Antiviral Research**, 67 (2): 107–119, 2005.
- LOPEZ, A.; HUDSON, J.B.; TOWERS, G.H.N. Antiviral and antimicrobial activities of Colombian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, 77 (2-3): 189–196, 2001.
- MABBERLEY, D.J. The Plant-book: A Portable Dictionary of the Vascular Plants Utilizing Kubitzki's. The Families and Genera of Vascular Plants (1990-), Cronquist's An Integrated System of Classification of Flowering Plants (1981), and Current Botanical Literature, Arranged Largely on the Principles of Editions 1–6 (1896/97–1931) of Willis's A Dictionary of the Flowering Plants and Ferns, 2nd ed.; **Cambridge university press**: Cambridge, UK, 1997.
- 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**, 7: 2013.
- MARTINS, D; FACHIN-ESPINAR, M.T.; OLIVEIRA, T.A.; LIMA, K.C.S.; CAVALCANTI, R.M.; TELES B.R.; NUNEZ, C.V. Estúdio químico y biológico de *Duroia macrophylla*. **Journal of Pharmacy and Pharmacognosy Research**, 2 (6): 158-171, 2014.

- MARTINS, D. **Estudo químico e biológico de *Duroia macrophylla* Huber (Rubiaceae)**. Tese de doutorado, Manaus: UFAM, 2014.
- MARTINS, D.; NUNEZ, C. Secondary Metabolites from Rubiaceae Species. **Molecules**, 20: 13422-13495, 2015.
- MONGRAND, S.; BADOUC, A.; PATOUILLE, B.; LACOMBLEZ, C.; CHAVENT, M.; BESSOULE, J.J. Chemotaxonomy of the Rubiaceae family based on leaf fatty acid composition. **Phytochemistry**, 66: 549–559. 2005
- MORAIS, T.P., LUZ, J.M.Q., SILVA, S.M., RESENDE, R.F., SILVA, A.S. Aplicações da cultura de tecidos em plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**. Botucatu, 14 (1): 110-121, 2012.
- MURASHIGE, T. & F. SKOOG. A revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures. **Physiologia Plantarum**, 15 (3): 473-497, 1962.
- 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; 2103.
- NARAYANASWAMY, S. Regeneration of plants from tissue cultures. In: REINERT, J.; BAJAJ, Y.P.S. **Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue, and organ culture**. Berlin: Spring-Verlag, 10: 179-206, 1977.
- NUNEZ, C.V.; SANTOS, P. A.; ROUMY, V.; HENNEBELLE, T.; MESQUITA, A.S.S.; BAILLEUL, F.; Indole alkaloids from *Duroia macrophylla* (Rubiaceae). **Planta Med.**, 75: 1037-1037, 2009.
- NUNEZ, C.V.; VASCONCELOS, M.C. 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, 2012.

- PAGE, J. E.; MADRINAN, S.; TOWERS, G. H. N.; Identification of a plant growth inhibiting iridoid lactone *Duroia hirsuta* the allelopathic tree of the 'Devil's Gardens'. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 50 (9): 840-842, 1994.
- PARK, S. B., NHO, S. W., JANG, H. B., CHA, I. S., LEE, J. H., AOKI, T., & JUNG, T. S. Phenotypic and genotypic analysis of *Edwardsiella tarda* isolated from olive founder (*Paralichthys olivaceus*) and Japanese eel (*Anguilla japonica*). **Aquaculture**, 473: 449-455, 2017.
- ROBERTO, T.; FRANCESCA, M. Sustainable sourcing of natural food ingredients by plant cell cultures. **Agro Food Industry Hi Tech**, 22 (2): 26-28, 2011.
- RODRIGUES, K.; RAMOS, D. F.; CARRION, L. L.; CURSINO, LORENA M. C.; JEFFREYS, M. F.; PEDROZA, L. S.; OSORIO, M. I. C V.; C.; OLIVEIRA, J. L.; ANDRADE, J. I. A.; FERNANDES, C. C.; NUNEZ, C. V.; SILVA, P. E. A. Antifungal activity of brazilian amazon plants extracts against some species of *Candida spp.* **International Journal of Phytopharmacology**, 5: 445-453, 2014.
- SANTOS, A.S.; ARAÚJO, S.F.; GOULART, H.F.; CAETANO, L.C.; ARRUDA, M.S.P.; SANTOS, L.S.; SANTA´ANA, A.E.G. A dehydrorotenoid produced by callus tissue culture and wild plant roots of *Boerhaavia coccinea*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 17: 538-541, 2007.
- SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. *Farmacognosia: Da planta ao medicamento*, 6th ed; **UFSC University Press**: Florianópolis, Brazil. 1104p, 2004.
- SOUZA, G. H. B. de; MELLO, J. C. P. de; LOPES, N. P. **Farmacognosia**: Coletânea científica. Ouro Preto: UFOP, 372p, 2012.

- SOUZA, V.C.; LORENZI, H. Botânica sistemática: Guia ilustrado para identificação de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II; **Instituto Plantarum**: Nova Odessa, Brazil, 2008.
- STAFFORD, A.; WARREN, G. Plant cell and tissue culture. **Melksham: Red Wood Press**, 251p, 1991.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia Vegetal. 4ª Ed., **Artmed**, Porto Alegre, 2013.
- TAYLOR, C.M.; STEYERMARK, J.A.; DELPRETE, P.; PERSSON, C.; COSTA, C.; VICENTINI, A.; CORTÉS, R. **Rubiaceae**. In: STEYERMARK, J. A; et al. Flora of the Venezuelan Guayana. 8: 497-847, 2004.
- TAYLOR, C.M.; CAMPOS, M.T.V.A.; ZAPPI, D. Flora da Reserva Ducke, Amazonas, Brasil: Rubiaceae. **Rodriguésia**, 58 (3): 549-616, 2007.
- TERMIGNONI, R. R. Cultura de Tecidos Vegetais. **Editora da UFRGS**, Porto Alegre, 182p, 2005.
- THE PLANT LIST. Disponível em <<http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Rubiaceae/>> Acesso em: 20/06/2017.
- VERONESI, R.; FOCACCIA, R. **Tratado de infectologia**. 2. ed. [S.l.]: atheneu, 1: 2002.
- VIEGAS, J. C.; BOLZANI, V. D. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, 29 (2): 326-337, 2006.
- VIJAYASREE, N., UDAYASRI, P., ASWANI, K. Y., RAVI, B. B., PHANI, K.Y., VIJAY, V. M. Advancements in the Production of Secondary Metabolites. **Journal of Natural Products**, 3: 112-123, 2010.
- YARAHMADI, P., FARSANI, H. G., KHAZAEI, A., KHODADADI, M., RASHIDIYAN, G., & JALALI, M. A. Protective effects of the prebiotic on the

immunological indicators of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) infected with *Aeromonas hydrophila*. **Fish & Shellfish Immunology**, 54: 589-597, 2016.

YING, P.; YICUN, C.; QINGNAN, L.; XIAOYU, Y.; JINZHI, W.; JINHONG, Z. The Synthesis and Evaluation of Novel Hydroxyl Substituted Chalcone Analogs with *in Vitro* Anti Free Radicals Pharmacological Activity and *in Vivo* Anti-Oxidation Activity in a Free Radical-Injury Alzheimer's Model. **Molecules**, 18: 1693-1703, 2013.

ZANCA, S. S. **Análise fitoquímica sazonal e cultura de tecidos *in vitro* de *Duroia macrophylla* Huber**. Dissertação de Mestrado, Manaus: INPA, 2015.

ZANCA, S. S; COSTA, R. C.; NUNEZ, C. V.; *In Vitro* Callus Inducion of *Duroia macrophylla* Huber. Chemical Prospection and Biotechnological Potentialities of Its Extracts. **Scientific Pages Bot**, 1:1, 2016.