

Tamizaje fitoquímico y evaluación de las actividades biológicas de *Duroia macrophylla* (Rubiaceae)

[Phytochemical prospection and biological activity of *Duroia macrophylla* (Rubiaceae)]

Daiane Martins^a, Maria T. Fachin-Espinar^a, Taciane Almeida de Oliveira^{a,b}, Karen C. S. Lima^a, Rodrigo M. Cavalcanti^a, Beatriz R. Teles^b, Cecilia V. Nunez^{a*}

^aLaboratório de Bioprospecção e Biotecnologia, Coordenação de Tecnologia e Inovação, ^bLaboratório de Entomologia Agrícola, Coordenação de Biodiversidade. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Av. André Araújo, 2936, 69067-375, Manaus, AM, Brazil.

*E-mail: cecilia@inpa.gov.br

Abstract

Context: *Duroia macrophylla* (Rubiaceae) is endemic from the Amazon Rainforest.

Aims: To perform phytochemical profile of *Duroia macrophylla* extracts and to evaluate them as antioxidant, insecticidal and cytotoxic.

Methods: Dichloromethane and methanol extracts of leaves and branches (collected three times) were subjected to phytochemical screening by comparative thin layer chromatography and NMR analyses. The extracts were assayed to antioxidant (DPPH and Fe-phenanthroline, at 10 µg/mL), insecticidal on *Sitophilus zeamais* (by ingestion of stored grains and contact, both at 10 mg/mL) and toxic activities on *Artemia salina* (1000 µg/mL).

Results: There were found evidences of terpenes, phenolic substances (phenols and flavonoids) and alkaloids, with differences between the vegetal part, collection period and solvent used. Antioxidant evaluations showed three of twelve were active and two were considered moderately active, with a relationship dependently of concentration. All methanol extracts showed the presence of phenolic substances (phenols and flavonoids) but one showed only phenols. For insecticidal activity, there were three most active extracts, two of which showed only presence of terpenes and the other, besides terpenes, phenolic substances (phenols and flavonoids). For *Artemia salina* toxicity assay, the five most active were all from the 2nd and 3rd collections.

Conclusions: The active extracts of *D. macrophylla* in each test were different. Three methanol extracts showed antioxidant activity; three extracts showed insecticidal activity and the presence of terpenic substances and five extracts presented cytotoxic activity, but it was not possible to correlate it with any specific secondary metabolite.

Keywords: Alkaloids; antioxidant; *Artemia salina* toxicity; insecticidal; phenolic substances; terpenes.

Resumen

Contexto: *Duroia macrophylla* (Rubiaceae) es endémica de la selva amazónica.

Objetivos: Obtener el perfil fitoquímico de los extractos de *Duroia macrophylla* y evaluarlos frente a las actividades antioxidantes, insecticida y citotóxica.

Métodos: Extractos diclorometánicos y metanólicos de hojas y ramas (colectados tres veces) fueron analizados por cromatografía en capa fina comparativa y RMN. Los extractos fueron ensayados para determinar las actividades antioxidante (DPPH y Fe-fenantrolina, en 10 µg/mL), insecticida sobre *Sitophilus zeamais* (por ingestión de granos almacenados y por contacto, ambos en 10 mg/mL) y tóxica sobre *Artemia salina* (1000 µg/mL).

Resultados: Se encontraron evidencias de terpenos, sustancias fenólicas (fenoles y flavonoides) y alcaloides, con diferencias entre las partes vegetales, periodo de colecta y disolvente usado. Las evaluaciones de la actividad antioxidante mostraron que tres de doce extractos fueron activos y dos fueron considerados moderadamente activos, de un modo dependiente de la concentración. Todos los extractos metanólicos mostraron la presencia de sustancias fenólicas (fenoles y flavonoides) pero uno sólo fenoles. Para la actividad insecticida, de los tres más activos, dos presentaron terpenos y el otro, además de terpenos, sustancias fenólicas (fenoles y flavonoides). Para la toxicidad sobre *Artemia salina*, los cinco más activos fueron todos de las 2^a y 3^a colectas.

Conclusiones: Los extractos activos de *D. macrophylla* en cada ensayo fueron diferentes. Tres de los extractos metanólicos mostraron actividad antioxidante; en los tres extractos que presentaron actividad insecticida se encontraron terpenos y cinco extractos presentaron actividad citotóxica, pero no fue posible correlacionarla con ningún metabolito secundario específico.

Palabras Clave: Alcaloides; antioxidante; insecticida; sustancias fenólicas; terpenos; toxicidad sobre *Artemia salina*.

ARTICLE INFO

Received | Recibido: June 18, 2014.

Received in revised form | Recibido en forma corregida: October 7, 2014.

Accepted | Aceptado: November 2, 2014.

Available Online | Publicado en Línea: November 15, 2014.

Declaration of interests | Declaración de Intereses: Los autores declaran no poseer conflicto de interés.

Funding | Financiación: CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico: con los proyectos CT-Agro y PPBio), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), FAPEAM (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas) y CENBAM/CNPq/MCTI (Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Estudos Integrados da Biodiversidade Amazônica).



INTRODUCCIÓN

En la búsqueda de nuevos fármacos, los productos naturales se destacan por su diversidad estructural, pues presentan estructuras químicas privilegiadas, las cuales evolucionaron durante su proceso de biosíntesis (Feher y Schmidt, 2003). Las plantas son una de las principales fuentes de moléculas biológicamente activas, por tal motivo, muchos de los laboratorios de Productos Naturales han incluido dentro de sus rutinas de separación, purificación e identificación de estructuras, diversos ensayos químicos y biológicos, con la finalidad de seleccionar extractos y monitorear el estudio fitoquímico.

La actividad antioxidante es una de las actividades atribuidas a diversos metabolitos secundarios de las plantas, y tienen la capacidad de inhibir los procesos de oxidación, así como evitar el envejecimiento de los tejidos. Gran parte de los compuestos fenólicos presentan actividad antioxidante y pueden administrarse para prevenir y tratar algunas enfermedades (Cunha y Graça, 2005).

Las investigaciones de plantas con actividad insecticida para el control de plagas han ido en aumento, debido a los efectos adversos de los insecticidas sintéticos. Esta es la principal motivación para la búsqueda de nuevas alternativas, como los métodos naturales (orgánicos) que puedan ser incorporados en programas de manejo integrado de plagas (Vendramim y Castiglioni, 2000). Entre las principales plagas, que afectan a los granos que son almacenados, está *Sitophilus zeamais*, que causa grandes pérdidas económicas a los productores (Loeck, 2002).

Otro ensayo bastante utilizado en la búsqueda de sustancias bioactivas es el ensayo de citotoxicidad sobre *Artemia salina* Leach, sobre todo por ser un método rápido, confiable, de bajo costo (Meyer et al., 1982) y que puede ser usado para seleccionar extractos que puedan contener sustancias antitumorales (McLaughlin et al., 1998). Este ensayo es un complemento importante para la actividad insecticida, porque es importante que la sustancia sea activa sobre el insecto y no tóxica para otros organismos.

Para la selección de plantas a estudiar debe ser considerada toda la información botánica y quimiotaxonómica, de tal manera que sea mayor la probabilidad de encontrar sustancias bioactivas, sean ellas inéditas o ya descritas en la literatura (Clardy y Walsh, 2004).

Dentro de las posibles fuentes de sustancias activas se encuentran algunas especies endémicas de la Flora Amazónica, como *Duroia macrophylla* Huber, Rubiaceae, cuyos frutos son comestibles. En la literatura consultada se encontraron pocos estudios químicos y biológicos realizados con esta especie. Entre ellos fueron reportados el aislamiento de triterpenos con actividad antibacteriana (Martins, et al., 2013) y de alcaloides indólicos, siendo uno de ellos inédito en la literatura (Nunez et al., 2009; 2012) y que presentó alta actividad antitumoral y baja toxicidad frente a células normales (Nunez y Vasconcelos, 2012).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, en este estudio se evaluaron las actividades antioxidante, insecticida sobre *Sitophilus zeamais* y citotóxica sobre *Artemia salina* de los extractos de hojas y ramas de *D. macrophylla*, e identificaron las clases de metabolitos secundarios presentes en cada extracto, a fin de encontrar nuevas fuentes de sustancias activas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención del material vegetal

Fueron realizadas tres colectas de la especie *Duroia macrophylla*. La primera colecta fue realizada el 05 de Diciembre de 2008, la segunda colecta fue realizada el 15 de Diciembre de 2009, ambas en la Reserva Florestal "A. Ducke", localizada a 26 km de Manaus, AM, Brasil. La tercera colecta fue realizada el 18 de mayo de 2011 en la Reserva Particular de Patrimonio Natural "Cachoeira da Onça", localizada en la ciudad de Presidente Figueiredo, a 105 km de Manaus. El material vegetal colectado fue identificado por la primera autora, la botánica Daiane Martins (Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA). Un ejemplar de cada muestra fue depositado en el Herbario del INPA (números de registro: 222501, 223837 y 235319, respectivamente).

Preparación de los extractos

El material vegetal (hojas y ramas) fue secado en estufa a 50°C hasta peso constante y posteriormente molido. Cada parte de la planta fue extraída inicialmente con diclorometano (DCM), en una relación 100 g de material vegetal/300 mL de disolvente, utilizando ultrasonido durante 20 minutos y filtrada, este procedimiento fue repetido tres veces. Después de la extracción con DCM, el material vegetal fue secado y extraído con metanol (MeOH), usando ultrasonido por 20 min y filtrado, y el procedimiento repetido tres veces. La concentración de los extractos se realizó por eliminación de los disolventes a presión reducida en un evaporador rotatorio.

Análisis fitoquímico

Los extractos fueron analizados siguiendo la metodología descrita por Wagner y Bladt (2001) y también usando placas cromatográficas de sílica con detector de fluorescencia UV₂₅₄ (Merck), las cuales fueron eluidas con sistemas de disolventes adecuados y reveladas con luz ultravioleta ($\lambda = 254$ y 365 nm), *p*-anisaldehído sulfúrico, Ce(SO₄)₂, 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), FeCl₃, AlCl₃ y Dragendorff. El perfil químico de los extractos fue obtenido mediante análisis por Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de ¹H y de ¹³C en un equipo de RMN Varian Inova de 400 MHz, buscando direccionar el fraccionamiento para la purificación de sus moléculas. Posteriormente, los extractos fueron fraccionados en columnas cromatográficas de sílica y eluidas con disolventes de polaridad creciente.

Ensayos antioxidantes

Se evaluó el potencial antioxidante de los extractos metanólicos y diclorometánicos de las hojas y ramas de las tres colectas de *D. macrophylla*, por dos métodos: DPPH y Fe³⁺-fenantrolina. Los resultados fueron expresados en equivalencia al ácido ascórbico (sustancia de referencia). Cuando el valor dio más próximo a uno, significó que fue más activo, o sea, que 1 mg de extracto equivalía a la actividad de 1 mg de ácido ascórbico.

Preparación de la curva de ácido ascórbico

Primero fue preparada una disolución madre de ácido ascórbico (900 µg/mL), a partir de la cual fueron retiradas alícuotas de 800, 600, 400, 200 y 100 µL, e incrementando la cantidad necesaria de agua destilada para completar 1 mL de disolución, preparando así los diferentes puntos de la curva de calibración: 720, 540, 360, 180 y 90 µg/mL de ácido ascórbico. De estas concentraciones, se retiraron 10 µL para los ensayos siguientes:

a) Ensayo con DPPH: se adicionaron 990 µL de la disolución de DPPH (30 µg/mL en metanol) y, después de 30 min, se realizó la lectura en espectrofotómetro (Fentom, modelo Cirrus 80ST) a 517 nm;

b) Ensayo con Fe³⁺-fenantrolina: se adicionaron 10 µL de la disolución patrón de Fe³⁺ y se dejó en reposo por 10 min. En seguida, fueron colocados 980 µL de la disolución de 1,10-fenantrolina 0,25% (m/v) y, después de 1 h, se realizó la lectura en espectrofotómetro a 515 nm.

1,1-Difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH)

La actividad antioxidante de los extractos fue evaluada por métodos cualitativos y cuantitativos. Para el análisis cualitativo fueron utilizadas placas cromatográficas mediante el uso de 0,2% de DPPH (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) en metanol. Las placas fueron rociadas con la disolución de DPPH. Este radical presenta una coloración azul-violeta y es decolorado hacia amarillo pálido por reacción con una sustancia con capacidad para donar átomos de hidrógeno, capaz de estabilizarlo (Souza et al., 2007). Después de 30 min de la aplicación, las zonas que presentaron manchas color amarillo-blanco fueron consideradas como resultados positivos, indicando la presencia de compuestos antioxidantes.

La determinación de la capacidad antioxidante cuantitativa de los extractos fue realizada midiendo la absorción de la reacción entre 990 µL de DPPH (30 mg/mL en metanol) y 10 µL de cada muestra del extracto (1 mg/mL, disolución madre), en triplicado. Las lecturas fueron realizadas, después de 30 min, en espectrofotómetro a 517 nm. Como control negativo fueron usados 10 µL de metanol con 990 µL de la

disolución de DPPH. Con los valores de las absorbancias se determinó el porcentaje (%) de captación de radicales libres (DPPH) mediante la siguiente fórmula:

$$AA \% = 100 \times (\Delta ABS / Abs_{control})$$

Donde: $\Delta ABS = Abs_{control} - Abs_{muestra}$

$Abs_{control}$ = absorbancia del control (DPPH + MeOH)

$Abs_{muestra}$ = absorbancia de la muestra (DPPH + extractos)

Inicialmente, los extractos fueron evaluados a una concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$ y aquellos que presentaron una actividad significativa fueron analizados en forma dependiente de la concentración. Para ello, se valoraron diferentes concentraciones (0,16; 0,31; 0,63; 1,25; 2,50 y 5,00 $\mu\text{g/mL}$). El potencial de la actividad fue obtenido por medio de una curva de concentración-efecto. Además se determinó también la concentración efectiva 50 (CE_{50}) como la concentración que causó el 50% de decoloración del radical DPPH. Para cada una de las concentraciones se realizaron tres experimentos independientes.

Fe³⁺-fenantrolina

Este método espectrofotométrico se basa en la capacidad que presentan las sustancias con potencial antioxidante para reducir el Fe³⁺, ya que el Fe²⁺ formado reacciona con 1,10-fenantrolina y produce complejos de color rojizo-anaranjado, que se determina espectrofotométricamente a 515 nm. Para el ensayo con Fe³⁺-fenantrolina, 10 μL de la disolución patrón de Fe³⁺ fueron adicionados a 10 μL del extracto (1 mg/mL, disolución madre) y dejado en reposo por 10 min. Posteriormente, se adicionaron 980 μL de la disolución de 1,10-fenantrolina (CAQ, Casa da Química, São Paulo, Brasil) 0,25% (m/v) y, después de 1 h, se realizó la lectura en espectrofotómetro a 515 nm. Los experimentos se realizaron por triplicado.

Actividad insecticida sobre *Sitophilus zeamais*

El ensayo insecticida fue realizado con individuos de *Sitophilus zeamais* Motschulsky, 1855 (Coleoptera, Curculionidae) mantenidos en el laboratorio, conservados en las condiciones propuestas por Tavares y Vendramim (2005).

Ensayo por contacto (Huang et al. 1997)

Hojas de papel de filtro de 9 cm de diámetro con 1 mL del extracto, a una concentración de 10 mg/mL, fueron colocadas cubriendo el fondo de placas de Petri. Las placas conteniendo el grupo control fueron impregnadas con 1 mL del disolvente específico utilizado para solubilizar cada extracto. Las hojas de papel de filtro impregnadas con cada uno de los extractos y de los disolventes fueron dejadas a temperatura ambiente por una hora. Posteriormente, 20 adultos no sexuados, con edades entre 10 y 20 días, fueron colocados en cada una de las placas de Petri, totalizando 100 individuos por tratamiento y para los grupos controles. La contabilización de los individuos muertos (ausencia total de movimiento) fue realizada cinco días después de iniciado el experimento. Para cada uno de los extractos se realizaron cinco réplicas, así como para los controles negativos (disolvente).

Ensayo por ingestión de granos contaminados (Llanos et al., 2008)

Muestras de maíz comercial, grano duro - tipo 2 (20 g) fueron colocadas en frascos de plástico de 500 mL que fueron cerrados con tapas de plástico, perforadas y revestidas internamente con tejido poroso. A cada uno de los frascos se les adicionaron 2 mL de cada extracto (10 mg/mL). La mezcla resultante fue homogenizada manualmente y después dejada a temperatura ambiente por una hora. Para los grupos controles fueron adicionados a cada frasco 2 mL del disolvente utilizado en cada extracto. Posteriormente, fueron colocados 20 adultos de *S. zeamais*, no sexuados y entre 10-20 días de edad, en cada uno de los frascos, utilizando 100 individuos por tratamiento y por grupos controles. Se contabilizaron los individuos muertos 20 días después de aplicados los extractos, en este caso también fue adoptado el criterio de ausencia total de movimiento para el parámetro de mortalidad. Para cada uno de los extractos se realizaron cinco réplicas, así como para los controles negativos (disolvente).

Toxicidad contra *Artemia salina*

Los huevos de *A. salina* (10 mg de huevos) se depositaron en una disolución (38 g/L) de agua marina artificial (Prodac, Cittadella, Italia) y se esperaron 48 h para la eclosión, con fuerte aireación, luz continua y temperatura entre 25 y 28°C. Posteriormente, se tomaron 10 larvas (nauplios) y se colocaron en una placa de 24 pocillos a la que se adicionó cada uno de los extractos (100 µL). La concentración evaluada inicialmente fue de 1000 µg/mL, siguiendo la metodología de Meyer et al. (1982). Como control negativo fue usado el disolvente utilizado en cada extracto. Después de 24 h de incubación, se contó el número de supervivientes en cada pocillo. Para asegurarse de que la mortalidad observada en el bioensayo fuera atribuida a los compuestos bioactivos, y no a la falta de alimento para *A. salina*, se compararon las larvas muertas en cada tratamiento con las larvas muertas en el control negativo. Los extractos que fueron activos a la concentración de 1000 µg/mL fueron evaluados a diferentes concentraciones, hasta 5,0 µg/mL. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

Análisis estadístico

Los resultados para *Sitophilus zeamais*, *Artemia salina* y DPPH son presentados como medias \pm desviación estándar. La significancia estadística entre los grupos fue determinada por análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido de una prueba de comparación múltiple de Tukey. Los valores de p menores que 0,05 ($p < 0,05$) se indicaron como significativos. Para calcular la concentración efectiva 50 (CE₅₀), definida como la concentración necesaria de cada extracto para producir el 50% de decoloración del radical DPPH, y la concentración letal 50 (CL₅₀) para *Artemia salina*, definida como la concentración necesaria de cada extracto para producir el 50% de mortalidad de los individuos, se realizaron análisis de regresión lineal (calculadas mediante paquete estadístico Origin 8.0, OriginLab Corporation).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis fitoquímico

En el tamizaje fitoquímico fueron observadas diferencias significativas en las composiciones químicas de los extractos de las tres colectas. Esas diferencias pueden estar relacionadas al hecho de que las primera y segunda colectas fueron realizadas en diciembre, época lluviosa en la región norte de Brasil, y la tercera colecta en mayo, época de seca. Además, las 1ª y 2ª colectas fueron realizadas en el mismo local y la 3ª aproximadamente a 100 km de distancia. La variedad, complejidad y composición química de los metabolitos secundarios producidos por las plantas pueden sufrir influencia de los estímulos ambientales, así como de las variables de naturaleza química, física y biológica (Gobbo-Neto y Lopes, 2007), pudiendo haber variación durante el año e incluso durante el día. Así, estudios que buscan encontrar sustancias bioactivas en vegetales, deben considerar todos los factores que puedan influir en la producción o la acumulación de la(s) sustancia(s) de interés, prestando especial atención a la época y el lugar de la colecta, secado, transporte, entre otros. (Calixto, 2001).

Los terpenos fueron identificados en los extractos diclorometánicos de las ramas y hojas de todas las colectas, mientras que en los extractos metanólicos, sólo los de las ramas (1ª colecta) y de las hojas (3ª colecta) mostraron la presencia de estos compuestos.

Los alcaloides fueron detectados en los extractos diclorometánicos y metanólicos de las ramas (3ª colecta). Todos los extractos metanólicos mostraron la presencia de sustancias fenólicas y flavonoides, con excepción del extracto metanólico de las hojas de la 3ª colecta el cual no presentó indicios de flavonoides en la cromatografía en capa fina (Tabla 1). El análisis de RMN de ¹H de todos los extractos metanólicos mostró señales en la región entre δ_H 6,4 y 8,0, característicos de sustancias aromáticas.

Después de realizados los fraccionamientos consecutivos del extracto diclorometánico de las hojas (3ª coleta), fue posible obtener una fracción

semi-pura, la cual presentó coloración violeta-azulada cuando se reveló con $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$, sugiriendo la presencia de esteroide. En el espectro de RMN de ^1H de esta fracción se observaron varias señales características de esteroides: entre δ_{H} 0,7 a 1,6 se observaron señales correspondientes a los hidrógenos metílicos; varias señales entre δ_{H} 1,08 y 2,08 (grupos metilénicos); un singlete en δ_{H} 5,36 que sugiere la presencia de hidrógeno olefínico, varios multipletes en δ_{H} 5,15; 5,04 y 3,53. Esta última señal pudiera atribuirse a un hidrógeno ligado a un carbono carbinólico. En el espectro de RMN de ^{13}C se observaron los desplazamientos químicos en δ_{C} 140,76 y 121,71, característicos del sistema olefínico entre C-5 y C-6 de β -sitosterol y estigmasterol, en δ_{C} 138,30 y 129,29, característico del sistema olefínico entre C-22 y C-23 del estigmasterol; y en δ_{C} 71,82, referente al carbono carbinólico C-3 de estos dos esteroides. Al comparar estos datos con los registrados en la literatura (Chaturvedula y Prakash, 2012) es posible confirmar que la fracción obtenida es una mezcla de β -sitosterol y estigmasterol. La mezcla de estos

dos fitosteroles es comúnmente obtenida, estando el β -sitosterol casi siempre en mayor proporción, pues él se encuentra distribuido en todas las partes de la planta (Galotta y Boaventura, 2005).

Ensayos antioxidantes

Para la determinación de la actividad antioxidante, los extractos fueron evaluados inicialmente a la concentración de 1 mg/mL. La metodología seguida fue la descrita por Göktürk Baydar et al. (2007). Posteriormente, fue elegida la concentración 100 veces menor (de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para evaluar todos los extractos y los resultados fueron expresados en equivalente de ácido ascórbico. Para interpretar los resultados, se estableció una escala de convención (Tabla 2), donde el valor más cercano a 1,0 indicaba que 1,0 mg de extracto equivalía a 1,0 mg de ácido ascórbico. Los resultados aparecen en la Tabla 3.

Tabla 1. Resultado del análisis fitoquímico, en placas cromatográficas, de los extractos de *Duroia macrophylla*.

Colecta	Parte de la planta	Extracto	Metabolitos secundarios				
			Alcaloides (Dragendorff)	Compuestos aromáticos (FeCl_3)	Fenoles (DPPH)	Flavonoides (AlCl_3)	Terpenos ($\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$)
1 ^a COLECTA	Hojas	Diclorometánico	-	-	-	-	+
	Hojas	Metanólico	-	+	+	+	-
	Ramas	Diclorometánico	-	-	-	-	+
	Ramas	Metanólico	-	+	+	+	+
2 ^a COLECTA	Hojas	Diclorometánico	-	-	-	-	+
	Hojas	Metanólico	-	+	+	+	-
	Ramas	Diclorometánico	-	-	-	-	+
	Ramas	Metanólico	-	+	+	+	-
3 ^a COLECTA	Hojas	Diclorometánico	-	-	-	-	+
	Hojas	Metanólico	-	+	+	-	+
	Ramas	Diclorometánico	+	-	-	-	+
	Ramas	Metanólico	+	+	+	+	-

Entre paréntesis, los reveladores usados para determinar los diferentes metabolitos secundarios.

Tabla 2. Escala de convención para los resultados de la evaluación antioxidante de los extractos estudiados.

Resultado del análisis antioxidante (mg de extracto/mg de ácido ascórbico)	Escala de conversión
Menor que 1,0	Extremadamente activo
Entre 1,1 y 2,0	Activo
Entre 2,1 y 3,0	Moderadamente activo
Mayor que 3,1	Inactivo

Tabla 3. Actividad antioxidante de los extractos diclorometánicos (DCM) y metanólicos (MET) de *Duroia macrophylla* mediante los métodos de DPPH y Fe³⁺-fenantrolina.

Colecta	Parte de la planta	Extracto	Valores medios									
			DPPH			ANOVA [‡]		Fe ³⁺ -Fenantrolina			ANOVA [‡]	
			$\Delta\text{ABS}_{517\text{nm}}$	[AA] _{eq} ($\mu\text{g/mL}$)	Equiv. [†]	F	p	$\Delta\text{ABS}_{515\text{nm}}$	[AA] _{eq} ($\mu\text{g/mL}$)	Equiv. [†]	F	p
1 ^a COLECTA	Hojas	DCM	-0,027 ± 0,006	-0,12 ± 0,05	-90,0 ± 40,2	1,937,7	1,6 x 10 ⁻⁶	0,017 ± 0,014	0,16 ± 0,11	81,8 ± 40,9	13,641,8	3,2 x 10 ⁻⁸
	Hojas	MET	0,230 ± 0,009	1,94 ± 0,07	5,1 ± 0,2			0,238 ± 0,007	1,96 ± 0,06	5,1 ± 0,2		
	Ramas	DCM	-0,010 ± 0,018	0,01 ± 0,14	51,1 ± 100,5			0,002 ± 0,002	0,03 ± 0,02	517,4 ± 483,7		
	Ramas	MET	0,794 ± 0,061	6,49 ± 0,49	1,5 ± 0,1			0,340 ± 0,023	2,79 ± 0,19	3,6 ± 0,2		
2 ^a COLECTA	Hojas	DCM	0,059 ± 0,008	0,96 ± 0,06	10,5 ± 0,6	184	1,7 x 10 ⁻⁴	0,023 ± 0,009	-0,08 ± 0,08	256,1 ± 586,8	309,4	6,1 x 10 ⁻⁵
	Hojas	MET	0,402 ± 0,028	3,48 ± 0,21	2,9 ± 0,2			0,110 ± 0,009	0,72 ± 0,08	13,9 ± 1,7		
	Ramas	DCM	0,080 ± 0,014	1,11 ± 0,10	9,0 ± 0,9			0,004 ± 0,016	-0,25 ± 0,15	-61,0 ± 53,8		
	Ramas	MET	1,041 ± 0,005	8,19 ± 0,04	1,2 ± 0,01			0,223 ± 0,187	1,76 ± 1,72	-12,6 ± 28,1		
3 ^a COLECTA	Hojas	DCM	-0,009 ± 0,017	0,02 ± 0,14	47,2 ± 100,5	1,937,7	1,6 x 10 ⁻⁶	0,042 ± 0,005	0,36 ± 0,04	28,2 ± 3,5	13,641,8	3,2 x 10 ⁻⁸
	Hojas	MET	0,684 ± 0,005	5,61 ± 0,04	1,8 ± 0,04			0,572 ± 0,018	4,69 ± 0,15	2,1 ± 0,1		
	Ramas	DCM	0,084 ± 0,002	0,77 ± 0,01	13,1 ± 0,2			0,129 ± 0,044	1,07 ± 0,36	10,0 ± 2,8		
	Ramas	MET	0,587 ± 0,006	4,82 ± 0,05	2,1 ± 0,02			0,432 ± 0,030	3,55 ± 0,24	2,8 ± 0,2		

[†]Equiv. = [Extracto]/[AA]_{eq}; (mg de extracto/mg de AA).

[‡]Parámetros de ANOVA ($p < 0,05$) para los ajustes lineales que permiten el cálculo de la [AA]_{eq} y Equiv.: R² (DPPH - 1^a y 3^a colectas) = 0,9979; R² (DPPH - 2^a colecta) = 0,9787; R² (Fe³⁺ - 1^a y 3^a colecta) = 0,9997; R² (Fe³⁺ - 2^a colecta) = 0,9872. Grados de libertad = 4.

Todos los extractos fueron ensayados a la concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$. Los resultados fueron expresados en media \pm desviación estándar ($n = 3$). En letras negritas se destacan los extractos activos y moderadamente activos. AA: ácido ascórbico; ABS: absorbancia; Equiv.: equivalentes.

Los extractos más activos fueron los metanólicos, pero hubo diferencias entre los extractos de hojas y ramas de cada colecta. El extracto metanólico de las hojas de la 1ª colecta fue inactivo, mientras que los demás fueron extremadamente activos o activos (Tabla 3). Así, para los extractos que se mostraron extremadamente activos o activos fue realizada la construcción de una curva de concentración-

efecto para determinar la capacidad secuestradora del radical DPPH y la CE_{50} , en diferentes concentraciones (0,16; 0,31; 0,63; 1,25; 2,50; 5,00 y 10,00 $\mu\text{g/mL}$). Para el nivel de significancia de 0,05, los datos tienden a la linealidad. Los resultados de CE_{50} y los parámetros del ajuste lineal son descritos en la Tabla 4.

Tabla 4. Resultados de la concentración efectiva 50 (CE_{50}) de los extractos metanólicos (MET) de *Duroia macrophylla* por el método de DPPH.

Colecta	Parte de la planta	Extracto	CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	ANOVA [†] $p (F_{\text{cal.}} > F_{\text{tab.}}) \rightarrow 0.05$		R^2
				F	p	
1ª COLECTA	Ramas	MET	7,14	84,738	$2,54 \times 10^{-4}$	0,9443
	Hojas	MET	18,26	32,022	0,0024	0,8649
2ª COLECTA	Ramas	MET	7,04	66,089	$4,57 \times 10^{-4}$	0,9297
	Hojas	MET	8,12	101,73	$1,64 \times 10^{-4}$	0,9532
3ª COLECTA	Ramas	MET	9,56	76,84	$3,20 \times 10^{-4}$	0,9389

[†]Grados de libertad = 19.

El extracto metanólico de las ramas (1ª colecta) mostró una inhibición dependiente de la concentración del radical DPPH de -3,9; -2,9; -3,8; 12,1; 12,5; 20,1 y 78,2%, en las concentraciones de 0,16; 0,31; 0,63; 1,25; 2,50; 5,00 y 10,00 µg/mL, respectivamente (Fig. 1).

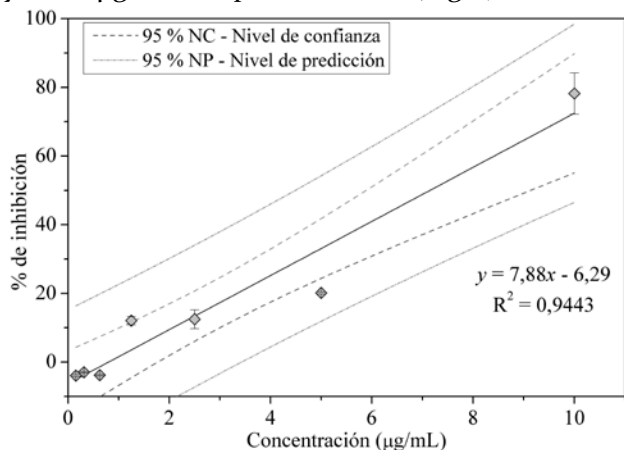


Figura 1. Potencial antioxidante de diferentes concentraciones (0,16 – 10,0 µg/mL) de los extractos metanólicos de las ramas de la 1ª colecta, determinado mediante el método de DPPH. Los resultados fueron expresados como media ± desviación estándar (n=3). El gráfico fue desarrollado en el programa Origin 8.0 ($p < 0,05$).

El extracto metanólico de las hojas (2ª colecta) mostró una inhibición, dependiente de la concentración, de -0,2; 1,5; 1,5; -1,8; 3; 4,4 y 30,2% a las concentraciones ensayadas de 0,16; 0,31; 0,63; 1,25; 2,50; 5,00 y 10,00 µg/mL, respectivamente (Fig. 2).

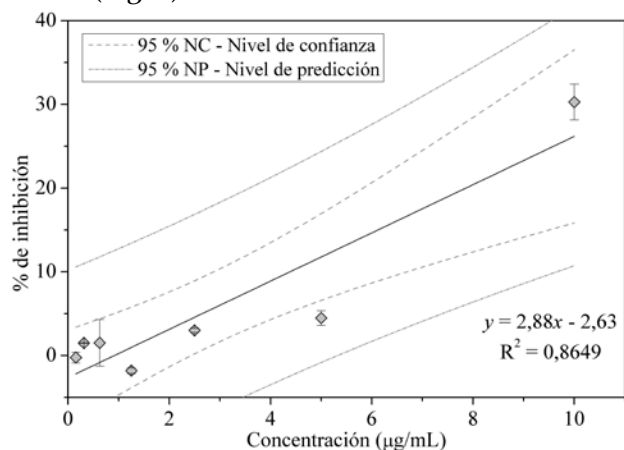


Figura 2. Potencial antioxidante de diferentes concentraciones (0,16 – 10,0 µg/mL) de los extractos metanólicos de las hojas de la 2ª colecta, determinado mediante el método de DPPH. Los resultados fueron expresados en media ± desviación estándar (n=3). El gráfico fue realizado en el programa Origin 8.0 ($p < 0,05$).

El extracto metanólico de las ramas (2ª colecta) mostró una inhibición, dependiente de la concentración, de 3,8; 5,3; 8,9; 9,3; 12,9; 22,1 y 78,4 % a las concentraciones ensayadas de 0,16; 0,31; 0,63; 1,25; 2,50; 5,00 y 10,00 µg/mL, respectivamente (Fig. 3).

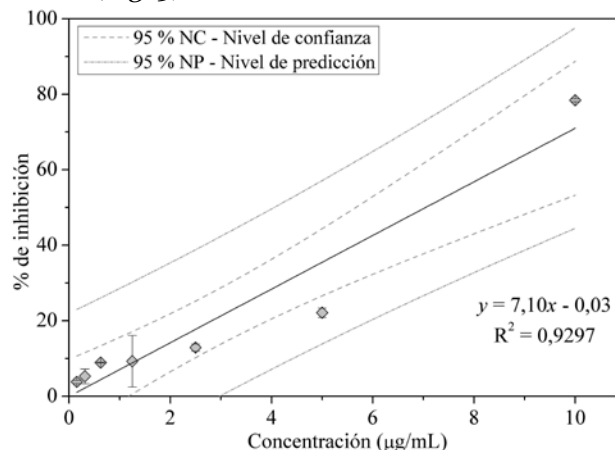


Figura 3. Potencial antioxidante de diferentes concentraciones (0,16 – 10,0 µg/mL) de los extractos metanólicos de las ramas de la 2ª colecta, determinado mediante el método de DPPH. Los resultados fueron expresados como media ± desviación estándar (n=3). El gráfico fue realizado en el programa Origin 8.0 ($p < 0,05$).

El extracto metanólico de las hojas (3ª colecta) presentó una inhibición, dependiente de la concentración, de 1,8; 2,5; 4,2; 4,5; 12,2; 19,9 y 67,4% a las concentraciones de 0,16; 0,31; 0,63; 1,25; 2,50; 5,00 y 10,00 µg/mL, respectivamente (Fig. 4).

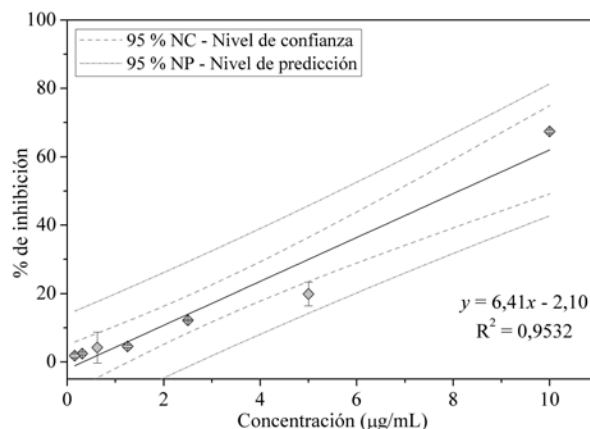


Figura 4. Potencial antioxidante de diferentes concentraciones (0,16 – 10,0 µg/mL) de los extractos metanólicos de las hojas de la 3ª colecta, determinado mediante el método de DPPH. Los resultados fueron expresados en media ± desviación estándar (n=3). El gráfico fue realizado en el programa Origin 8.0 ($p < 0,05$).

Para el extracto metanólico de las ramas (3ª colecta), a las concentraciones de 0,16; 0,31; 0,63; 1,25; 2,50; 5,00 y 10,00 µg/mL, las inhibiciones fueron de 1,1; 1,1; 1,9; 4,2; 7,1; 15,1 y 57,9%, respectivamente (Fig. 5).

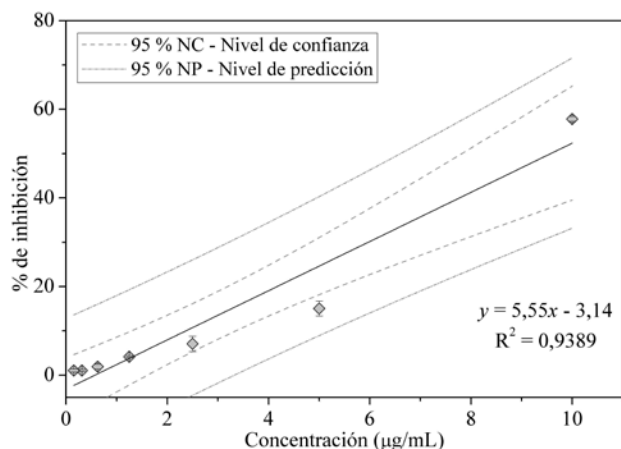


Figure 5. Potencial antioxidante de diferentes concentraciones (0,16 – 10,0 µg/mL) de los extractos metanólicos de las ramas de la 3ª colecta, determinado mediante el método de DPPH. Los resultados fueron expresados como media ± desviación estándar (n=3). El gráfico fue realizado en el programa Origin 8.0 ($p < 0,05$).

Los mismos extractos metanólicos que fueron activos contra DPPH, también lo fueron con el oxidante Fe^{3+} -fenantrolina, excepto el extracto metanólico de las ramas (1ª colecta), el metanólico de las hojas y ramas (2ª colecta) que fueron activos. El análisis cualitativo de los extractos, a través de la cromatografía en placa delgada, indicó la presencia de sustancias fenólicas. Es probable que estos compuestos sean los responsables de la actividad antioxidante de los extractos, pues poseen hidroxilos fenólicos que podrían capturar los radicales libres.

De acuerdo con Hendrich (2006), los fenoles son metabolitos secundarios con significativa propiedad antioxidante, en especial las estructuras que contienen un grupo *o*-dihidroxi en el anillo B (catecol) y un doble enlace en las posiciones 2,3 en conjugación con el grupo carbonilo. Esta capacidad de promover la resonancia es el factor principal para la liberación del hidrógeno que será usado para estabilizar las sustancias orgánicas oxidadas, tornándolos buenos antioxidantes. Además, su estructura

carbónica, conteniendo grupos polares (hidroxilos) y apolares (anillo aromático), los convierten en compuestos capaces de atravesar las paredes celulares y ampliar así su papel antioxidante, equilibrando la hidrofilia y la lipofilia.

Actividad insecticida

Los extractos demostraron tener una actividad insecticida moderada contra adultos de *Sitophilus zeamais*. Los extractos más activos fueron: el metanólico de las ramas (1ª colecta) y los extractos diclorometánicos de las ramas (2ª colecta) y de las hojas (3ª colecta) (Tabla 5). Los extractos activos presentaron en común la presencia de sustancias terpénicas (Tabla 1).

En la literatura se encuentran diversos estudios sobre compuestos terpénicos con actividad insecticida. Según Prates y Santos (2000) los monoterpenos cineol y limoneno poseen acción insecticida contra importantes plagas de granos almacenados como *S. zeamais*. Esas sustancias son tóxicas a través de la penetración en el cuerpo del insecto vía sistema respiratorio (efecto hormigueo), a través de la cutícula (efecto de contacto) y por el aparato digestivo (efecto de ingestión). Restello et al. (2009) atribuyeron el efecto repelente e insecticida sobre *S. zeamais* a los terpenos limoneno, terpinoleno, piperitona, eofitadieno, sabineno, *trans*-ocimeno, β -cariofileno, farnesol y α -pineno presentes en los extractos vegetales.

La producción de metabolitos secundarios está relacionada con la adaptación de la planta a su medio ambiente. Estudios demuestran que estos metabolitos pueden realizar múltiples funciones, como protección contra herbívoros, microorganismos y otras defensas inter-especies, incrementando la capacidad de adaptación del individuo al medio ambiente. La intervención de estos metabolitos en las interacciones entre los organismos puede indicar que estas moléculas también actúan en otros sistemas biológicos, como en el caso de los terpenos que son constantemente asociados a la actividad insecticida (Viegas, 2003; Gershenzon y Dudareva, 2007).

Toxicidad frente a *Artemia salina*

Dentro de las pruebas utilizadas en los estudios fitoquímicos para monitorear la bioactividad de los extractos, se encuentra el ensayo de citotoxicidad frente a *Artemia salina*. Por ser un ensayo simple, eficiente, rápido y de

bajo costo ha sido utilizado como una pre-evaluación de los extractos y sustancias con potencial farmacológico. Los extractos o compuestos más activos podrían evaluarse en otros tipos de ensayos más específicos, tanto *in vivo* como *in vitro*.

Tabla 5. Mortalidad de individuos adultos de *Sitophilus zeamais* por contacto e ingestión de extractos diclorometánicos (DCM) y metanólicos (MET) de *Duroia macrophylla*.

Parte de la planta		Extracto*	Adultos muertos (%)	
			Contacto [†]	Ingestión [‡]
1 ^a COLECTA	Hojas	DCM	0 ± 0	0 ± 0
	Hojas	MET	5 ± 5,0	0 ± 0
	Ramas	DCM	0 ± 0	0 ± 0
	Ramas	MET	9 ± 4,2	25 ± 12,7
2 ^a COLECTA	Hojas	DCM	0 ± 0	0 ± 0
	Hojas	MET	0 ± 0	0 ± 0
	Ramas	DCM	15 ± 6,1	0 ± 0
	Ramas	MET	0 ± 0	0 ± 0
3 ^a COLECTA	Hojas	DCM	16 ± 7,4	5 ± 3,5
	Hojas	MET	0 ± 0	0 ± 0
	Ramas	DCM	2 ± 2,7	0 ± 0
	Ramas	MET	0 ± 0	0 ± 0

[†]Realizado ANOVA una vía para todo el conjunto de datos (nivel de significación = 0,05): $F = 15,576$; $p = 2,53 \times 10^{-12}$. Grados de libertad = 48.

[‡]Realizado ANOVA una vía para todo el conjunto de datos (nivel de significación = 0,05): $F = 17,922$; $p = 1,99 \times 10^{-13}$. Grados de libertad = 48.

*Concentración ensayada: 10 mg/mL. Controles negativos: diclorometano y metanol. Para cada tratamiento, así como para el control, fueron realizados cinco experimentos. Los resultados fueron expresados como media ± desviación estándar.

Para los extractos que presentaron toxicidad los valores calculados de CL_{50} fueron de 64,8 $\mu\text{g/mL}$ para el extracto metanólico de las hojas (2ª colecta); 128,7 $\mu\text{g/mL}$ para el extracto metanólico de las hojas (3ª colecta) y 381,1 $\mu\text{g/mL}$ para el extracto metanólico de las ramas (3ª colecta); 644,8 $\mu\text{g/mL}$ para el extracto diclorometánico de las hojas (2ª colecta); 538,6 $\mu\text{g/mL}$ para el extracto diclorometánico de las ramas (3ª colecta). Los extractos de la 3ª colecta se mostraron, en general, más tóxicos que los demás (Tabla 6). Esta elevada toxicidad pudiera ser atribuida a la presencia de alcaloides, los cuales son reconocidos por este tipo de actividad. Algunos de ellos poseen aplicación clínica en el tratamiento de tumores como el topotecano (camptotecina) vimblastina y vincristina (Schripsema et al., 2004).

Cuanto menor el valor de la CL_{50} , más tóxico es el compuesto frente a un organismo y, por tanto, su actividad citotóxica es mayor, lo que también podría sugerir un mayor potencial antitumoral (McLaughlin et al., 1998). Por otro lado, la falta de toxicidad de los extractos sobre el micro-crustáceo *A. salina*, puede indicar que estos no tendrán un efecto tóxico para las células de los mamíferos.

Con la determinación de la CL_{50} es posible establecer y evaluar la toxicidad de los extractos sobre *Artemia salina* y correlacionarla con actividades, como la antifúngica, antiviral y antimicrobiana (Macbae et al., 1988), entre otras.

Por tanto, vale resaltar que este ensayo es preliminar, por lo que es necesaria la aplicación de otras metodologías para analizar y completar el estudio citotóxico de estos extractos, inclusive ensayos de citotoxicidad, utilizando líneas celulares de mamíferos.

CONCLUSIONES

El estudio de la composición química de *Duroia macrophylla* (Rubiaceae) permitió detectar la presencia de diferentes metabolitos secundarios, como compuestos aromáticos (fenoles y flavonoides), terpenos y alcaloides, lo que proporciona un amplio espectro de posibles actividades farmacológicas para esta planta.

Para el ensayo antioxidante con DPPH, la concentración evaluada (10 $\mu\text{g/mL}$) demostró su

eficacia para distinguir los extractos más activos de los demás. Pues de los doce extractos ensayados, tres fueron activos y dos fueron considerados medianamente activos. Pero, solamente dos (de los cinco que presentaron actividad en el ensayo de DPPH) presentaron actividad también en el ensayo de Fe^{3+} -fenantrolina. Los resultados de la evaluación en las placas cromatográficas, para los extractos metanólicos indicaron la presencia de compuestos aromáticos (fenoles y flavonoides), excepto para uno que mostró compuestos aromáticos (sólo fenoles).

Para la actividad insecticida sobre *Sitophilus zeamais*, de los tres extractos más activos, dos indicaron terpenos y el otro, además de terpenos, también de compuestos aromáticos (fenoles y flavonoides).

Para la actividad tóxica sobre *Artemia salina*, cinco extractos presentaron elevada actividad, siendo todos de las 2ª y 3ª colectas, pero no fue posible correlacionarla con ninguna clase química en especial.

Como los extractos activos en cada ensayo no fueron los mismos, es muy importante enfatizar que, cuando el objetivo es la bioprospección, todos los tipos de extractos deben ser ensayados porque pueden contener diferentes sustancias y de esta forma llegar a demostrar diferentes actividades.

Las investigaciones continuarán con el fraccionamiento de los extractos activos, esperando encontrar las sustancias responsables de las actividades reportadas en este estudio.

CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores declaran no poseer conflicto de interés.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a las agencias brasileñas: CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico: proyectos CT-Agro y PPBio), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), FAPEAM (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas) y CENBAM/CNPq/MCTI (Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Estudos Integrados da Biodiversidade Amazônica) por los auxilios financieros y las becas concedidas.

Tabla 6. Porcentaje de letalidad y concentración letal 50 (CL₅₀) inducidos por los extractos de *Duroia macrophylla* en nauplios de *Artemia salina*.

Parte de la planta	Extractos	Concentración (µg/mL)						CL ₅₀ (µg/mL)	ANOVA [†]			
		30	60	120	250	500	1000		R ²	F	p	
1 ^a COLECTA	Hojas	DCM	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	10 ± 0	—	—	—	—
	Hojas	MET	0 ± 0	0 ± 0	3,33 ± 0,57	6,67 ± 0,57	6,67 ± 0,57	33,33 ± 0,57	1612,3*	0,822	73,828	2,17 x 10 ⁻⁷
	Ramas	DCM	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	20 ± 0	—	—	—	—
	Ramas	MET	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	13,33 ± 0,57	30 ± 0	—	—	—	—
2 ^a COLECTA	Hojas	DCM	0 ± 0	0 ± 0	6,67 ± 0	6,67 ± 0,57	23,33 ± 0,57	90 ± 0	644,8	0,930	213,187	1,14 x 10⁻¹⁰
	Hojas	MET	10 ± 0	50 ± 0	66,67 ± 0	83,33 ± 1,15	100 ± 0	100 ± 0	64,8	0,559	20,256	3,63 x 10⁻⁴
	Ramas	DCM	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	3,33 ± 0,57	—	—	—	—
	Ramas	MET	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	3,33 ± 0,57	—	—	—	—
3 ^a COLECTA	Hojas	DCM	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	—	—	—	—
	Hojas	MET	43,33 ± 0,57	46,67 ± 0,57	50 ± 0	53,33 ± 0,57	73,33 ± 1,15	83,33 ± 1,15	128,7	0,791	60,366	8,08 x 10⁻⁷
	Ramas	DCM	0 ± 0	0 ± 0	10 ± 0	20 ± 0	40 ± 0	100 ± 0	538,6	0,992	1998,677	0
	Ramas	MET	0 ± 0	3,33 ± 0,57	20 ± 0	66,67 ± 0,57	76,67 ± 0,57	100 ± 0	381,1	0,803	65,394	4,82 x 10⁻⁷

[†]Método ANOVA una vía aplicado con nivel de significancia de 0,05. Grados de libertad = 16.

*Valor de CL₅₀ encontrado fuera del rango experimental evaluado.

—: Solamente fueron considerados para el cálculo de la CL₅₀ los extractos que presentaron actividad en las concentraciones ≤ 250 µg/mL.

Los extractos metanólicos (MET) y diclorometánicos (DCM) fueron disueltos en sus respectivos disolventes. Fue utilizado dicromato de potasio como control positivo, solución salina (38 g/L) como control negativo y dimetilsulfóxido como control de los disolventes. Los resultados fueron expresados como media ± desviación estándar (n = 3). En letras negritas los extractos más activos y sus respectivas CL₅₀.

REFERENCIAS

- Calixto JB (2001) Estudo farmacológico pré-clínico de plantas medicinais. In: Calixto JB, Yunes RA, Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna. Chapecó: Argos, pp 77-99.
- Chaturvedula VSP, Prakash I (2012) Isolation of stigmaterol and β -sitosterol from the dichloromethane extract of *Rubus suavissimus*. Int Curr Pharm J 1(9): 239-242.
- Clardy J, Walsh C (2004) Lessons from natural molecules. Nature 432: 829-837.
- Cunha AP da, Graça JAB da (2005) Farmacognosia e Fitoquímica. Ed. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, p. 670.
- Fehér M, Schmidt JM (2003) Property distributions: differences between drugs, natural products and molecules from combinatorial chemistry. J Chem Inf Comput Sci 43(1): 218-227.
- Galotta ALQA, Boaventura MAD (2005) Constituintes químicos da raiz e do talo da folha do açaí (*Euterpe precatoria* Mart., Arecaceae). Quím Nova 28(4): 610-613.
- Gershenzon J, Dudareva N (2007) The function of terpene natural products in the natural world. Nat Chem Biol 3(7): 408-414.
- Göktürk Baydar N, Özkan G, Yaşar S (2007) Evaluation of the antiradical and antioxidant potential of grape extracts. Food Control 18(9): 1131-1136.
- Gobbo-Neto L, Lopes NP (2007) Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. Quím Nova 30(2): 374-381.
- Hendrich AB (2006) Flavonoid-membrane interactions: possible consequences for biological effects of some polyphenolic compounds. Acta Pharmacol Sin 27(1): 27-40.
- Huang Y, Tan JMWL, Kini RM, Ho SH (1997) Toxic and antifeedant action of nutmeg oil against *Tribolium castaneum* (Herbst) and *Sitophilus zeamais* Motsch. J Stored Prod Res 33(4): 289-298.
- Llanos CAH, Arango DL, Giraldo MC (2008) Actividad insecticida de extractos de semilla de *Annona muricata* (Anonaceae) sobre *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). Rev Colomb Entomol 34(1): 76-82.
- Loeck AE (2002) Pragas de produtos armazenados. Pelotas, UFPEL, p. 113
- Macbae WD, Hudson JB, Towers GHN (1988) Studies on the pharmacological activity of Amazonian Euphorbiaceae. J Ethnopharmacol 22(2): 143-172.
- Martins D, Carrion LL, Ramos DF, Salomé KS, DA Silva PEA, Barison A, Nunez CV (2013) Triterpenes and the antimycobacterial activity of *Duroia macrophylla* Huber (Rubiaceae). Biomed Res Int. doi: 10.1155/2013/605831: 1-7.
- McLaughlin JL, Rogers LL, Anderson JE (1998) The use of biological assays to evaluate botanicals. Drug Inf J 32(2): 513-524.
- Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JE, Jacobson LB, Nichols DE, McLaughlin JL (1982) Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. Planta Med 45(1): 31-33.
- Nunez CV, Santos PA, Roumy V, Hennebelle T, Mesquita ASS, Bailleul F (2009) Raunitidine isolated from *Duroia macrophylla* (Rubiaceae). Planta Med 75: 1037-1037.
- Nunez CV, Vasconcelos MC (2012) Novo Alcaloide Antitumoral de *Duroia macrophylla*. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: PI10201203380, data de depósito: 31/12/2012, título: "Novo Alcaloide Antitumoral de *Duroia macrophylla*.", Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial.
- Nunez CV, Roumy V, Mesquita DWO, Mesquita ASS, Sahrpaz S, Bailleul F, Hennebelle T (2012) Indole alkaloids from *Duroia macrophylla* (Rubiaceae). Planta Med 78: P1287.
- Prates HTJP, Santos P (2000) Óleos essenciais no controle de pragas de grãos armazenados, p. 443-461. In: Lorini I, Miike LH, Scussel VM. Armazenagem de Grãos. Campinas: IBG, p. 1000.
- Restello RM, Menegatt C, Mossi AJ (2009) Efeito do óleo essencial de *Tagetes patula* L. (Asteraceae) sobre *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera, Curculionidae) Rev Bras Entomol 53(2): 304-307.
- Schripsema J, Dagnino D, Gosmann G (2004) Alcalóides indólicos. In: Simões CMO. ed. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFSC, pp. 819-846.
- Sousa CMM, Silva HR, Vieira GM, Ayres MCC, Costa CS, Araújo DS (2007) Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. Quim Nova 30(2): 351-355.
- Tavares MAGC, Vendramim JD (2005) Bioatividade de erva-de-Santa-Maria, *Chenopodium ambrosioides* L., sobre *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae). Neotrop Entomol 34: 319-323.
- Vendramim JD, Castiglioni E (2000) Aleloquímicos, resistência de plantas e plantas inseticidas. In: Guedes C. et al. (Org.). Bases e técnicas do manejo de insetos. Santa Maria: UFSM/CCR/DFS. pp. 113-128.
- Viegas JC (2003) Terpenos com atividade inseticida: Uma alternativa para o controle químico de insetos. Quím Nova 26(3): 390-400.
- Wagner H, Bladt S (2001) Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas. Ed Springer Verlag, 2d Ed, p. 384.
-