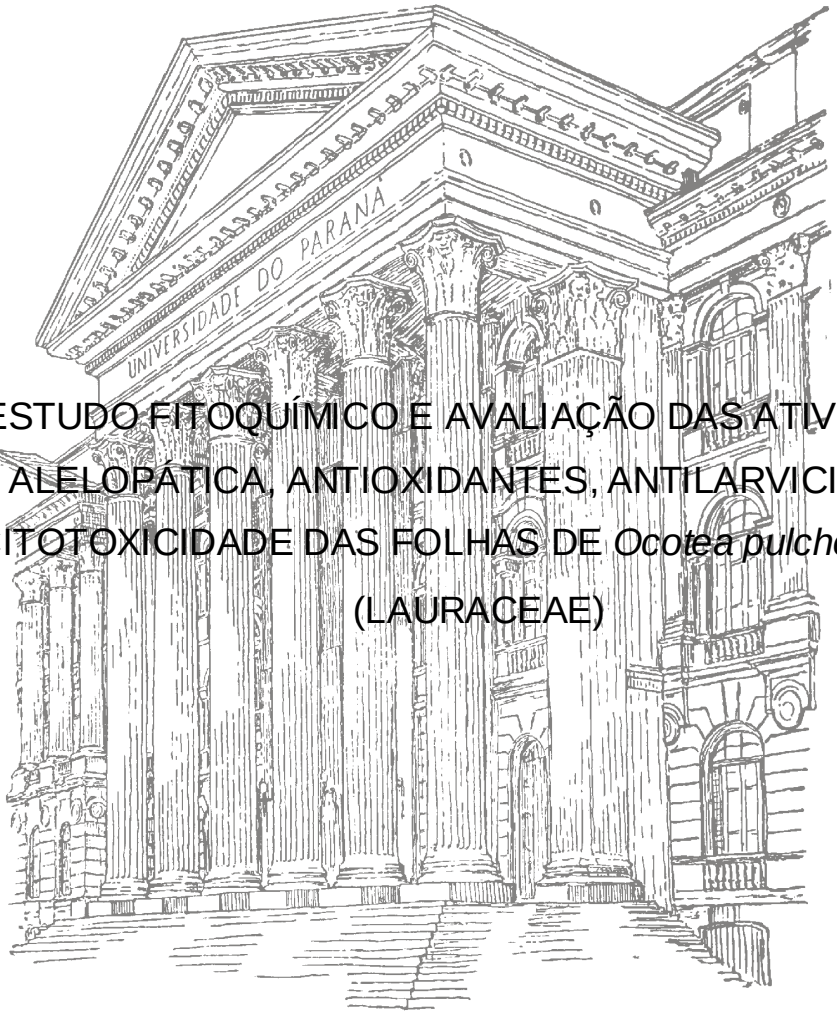
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

Augusto César Rebouças Araújo



ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ALELOPÁTICA, ANTIOXIDANTES, ANTILARVICIDAS E CITOTOXICIDADE DAS FOLHAS DE *Ocotea pulchella* Mart. (LAURACEAE)

Curitiba

2012

Augusto César Rebouças Araújo

ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ALELOPÁTICA, ANTIOXIDANTES, ANTILARVICIDAS E CITOTOXICIDADE DAS FOLHAS DE *Ocotea pulchella* Mart. (LAURACEAE)

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: *Profa Dra Marilis Dallarmi Miguel*

Co-orientador: *Prof. Dr. Obdúlio Gomes Miguel*

Curitiba

2012

Araújo, Augusto César Rebouças

Estudo fitoquímico e avaliação das atividades alelopática, antioxidante, antilarvicida e citotoxica das folhas de *Ocotea pulchella* Mart. (lauraceae) / Augusto César Rebouças Araujo – Curitiba: UFPR, 2012. [24], 171 f.: il.; 31 cm.

Orientadores: Marilis Dallarmi Miguel, Obdúlio Gomes Miguel

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Paraná, UFPR, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2012.

Referências bibliográficas: f. 108-118

1. *Ocotea pulchella*. 2. Lauraceae. 3. Flavonóide. 4. Antioxidante. 5. Alelopatia. 6. Larvicida. 7. Toxicidade

Tese. I. Miguel, Marilis Dallarmi. II. Miguel, Obdúlio Gomes. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

"Educar é crescer. E crescer é viver. Educação é, assim, vida no sentido mais autêntico da palavra"

(Anísio Teixeira)

AGRADECIMENTOS

Á Deus

À minha família, pelo apoio, incentivo, suporte, ensinamentos de perseverança, humildade e caráter.

À Universidade Federal do Paraná e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade recebida para a realização deste trabalho

A CAPES, pelo auxílio financeiro.

Aos orientadores Profa Dra Marilis Dallarmi Miguel e Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel pela recepção no programa e pela orientação no trabalho.

Ao Prof. Dr. Jair Mafezoli, do Departamento de Química da UFC, pela contribuição na obtenção dos espectros de RMN 1H e RMN 13C, pela amizade e companheirismo desde a minha graduação.

A Profa Dra Sandra Maria Rocha e ao Prof. Dr. Hermes Fernandes de Souza pela sua amizade e companheirismo desde a graduação.

A Profa Dra Jane Manfron Budel pela sua contribuição para o trabalho, pela sua amizade e confiança.

A Profa Dra Sandra Marin Warumby Zanin pela sua contribuição para o trabalho, pela sua amizade.

Ao Laboratório de Farmacotécnica e à Msc. Cristiane Bezerra pela orientação na avaliação das atividades biológicas, pela sua amizade, parceria e auxílio nas dificuldades durante a realização durante todo o trabalho.

A todos os colegas do mestrado e doutorado pela amizade, em especial à Cibelle Dallagassa, Flavia Degaut, Kelly Cristina, Keylla Lençone, Barbara Moriel, Priscila Sieben, Ana Flavia, Cristina Mayumi, Beatriz Hirota, Vanessa Cristina, Lorene Armstrong, Sirlei Sayomi.

A Valonne Camilly, por ter aceitado o desafio de encararmos uma vida nova em Curitiba, companheirismo, amizade e apoio que me destes durante o tempo que estivemos juntos.

A todos os funcionários e professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, que de formas diversas contribuíram para este trabalho.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 18

2 OBJETIVOS 20

2.1 OBJETIVO GERAL 20

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 20

3 REVISÃO DA LITERATURA 21

3.1 ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO 21

3.2 CONSIDERAÇÕES SOBRE A FAMÍLIA LAURACEAE 21

3.3 CONSIDERAÇÕES SOBRE O GÊNERO *OCOTEA* 22

3.3.1 Aspecto fitoquímico do gênero *Ocotea* 23

3.3.2 Aspectos farmacológicos do gênero Ocotea 26

3.4 CONSIDERAÇÕES SOBRE A ESPÉCIE *OCOTEA PULCHELLA* MART.. . 27

3.4.1 Sinonímia vulgar 27

3.4.2 Distribuição geográfica 28

3.4.3 Descrição botânica de *Ocotea pulchella* Mart.. 29

3.5 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROS) E O ESTRESSE OXIDATIVO 31

3.6 ALELOPATIA E OS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS 32

3.7 *ARTEMIA SALINA*: BIOENSAIO DE CITOTOXICIDADE 33

3.8 SUBSTÂNCIAS DE ORIGEM NATURAL (PLANTA/MICROORGANISMO) COM ATIVIDADE LARVICIDA. 34

4 METODOLOGIA 38

4.1 COLETA E PREPARO DO MATERIAL VEGETAL 38

4.2 ESTUDOS FITOQUÍMICOS 38

4.2.1 Ensaio sistemático de análise em fitoquímica 38

4.2.1.1 Preparo do extrato hidroalcoólico a 20% 38

4.2.1.2 Preparo do extrato aquoso a 20% 39
4.2.1.3 Pesquisa de alcaloides 39
4.2.1.4 Pesquisa de ácidos orgânicos 40
4.2.1.5 Pesquisa de fenóis 41
4.2.1.6 Pesquisa de flavonoides 41
4.2.1.6.1 Leucoantocianidina 41
4.2.1.6.2 Glicosídeos flavônicos 41
4.2.1.6.3 Flavonóis 42
4.2.1.6.4 Dihidroflavonoides 42
4.2.1.6.5 Dihidroflavonois 43
4.2.1.7 Pesquisa de cumarinas 43
4.2.1.8 Pesquisa de antraquinonas 44
4.2.1.9 Pesquisa de esterois e triterpenos 45
4.2.1.9.1 Reação de Liberman Bourchard 45
4.2.1.9.2 Reação de Keller Kelliani 46
4.2.1.10 Pesquisa de glicosídeos antociânicos 46
4.2.1.10.1 Primeiro teste 46
4.2.1.10.2 Segundo teste 47
4.2.1.11 Pesquisa de heterosídeos saponínicos 47
4.2.1.12 Pesquisa de heterosídeos cianogenéticos 47
4.2.1.13 Pesquisa de gomas, taninos e mucilagens 48
4.2.1.14 Pesquisa de taninos 48
4.2.1.14.1 Diferenciação entre taninos hidrolisáveis e condensados 49
4.2.1.15 Pesquisa de aminogrupos 49
4.2.1.16 Pesquisa de ácidos voláteis 50
4.2.1.17 Pesquisa de ácidos fixos 50
4.2.3 Obtenção do extrato em aparelho de Soxhlet modificado 51

4.2.4 Obtenção das frações 51

4.2.5 Obtenção do resíduo seco 52

4.2.6 Isolamento das substâncias 53

4.2.6.1 Cromatografia líquida em coluna 53

4.2.6.2 Cromatografia em camada delgada 53

4.2.7 Elucidação estrutural 53

4.2.7.1 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^{1}H e ^{13}C 53

4.3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTILARVICIDA FRENTE AO *AEDES AEGYPTI* 54

4.3.1 Efeito larvicida 55

4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA 55

4.4.1 Preparo do teste 55

4.4.2 Testes de germinação 56

4.4.3 Testes de crescimento 56

4.4.3.1 Índice mitótico 56

4.4.3.2 Respiração de raízes 57

4.4.3.3 Fotossíntese 57

4.4.4 Atividade enzimática 58

4.4.4.1 Preparo do extrato enzimático 58

4.4.4.2 Atividade da peroxidase 58

4.4.4.3 Atividade da catalase 59

4.4.4.4 Atividade da superóxido dismutase 59

4.4.4.5 Detecção da α-amilase 59

4.4.4.6 Polifenoloxidase 60

4.4.4.7 Quantificação de proteínas totais por método Bradford 60

4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE 61

4.5.1 Avaliação da capacidade antioxidante pela formação de um complexo fosfomolibdênio 61

4.5.2 Método de reatividade contra radical livre estável DPPH•..... 62
4.5.2.1 Determinação do IC50 dos padrões, ácido ascórbico (AA) e rutina 62
4.5.3 Avaliação do poder redutor 63
5 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**..... 64
5.1 ENSAIO SISTEMÁTICO FITOQUÍMICO..... 64
5.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES..... 66
5.3 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL 66
5.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA..... 73
5.4.1 Bioensaios de germinação e crescimento 73
5.4.2 Teste de crescimento 77
5.4.3 Índice mitótico..... 79
5.4.4 Respiração de raízes..... 82
5.4.5 Fotossíntese (Teor de Clorofila) 82
5.4.6 Atividade enzimática..... 84
5.4.6.1 Atividade da peroxidase 84
5.4.6.2 Atividade da catalase 85
5.4.6.3 Atividade da superóxido dismutase 87
5.4.6.4 Atividade da α-amilase 87
5.4.6.5 Atividade da polifenoloxidase 89
5.4.6.6 Quantificação de proteínas totais..... 89
5.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE 91
5.5.1 Avaliação da capacidade antioxidante pela formação de um complexo de fosfomolibdênio 91
5.5.2 Avaliação do poder redutor 93
5.5.3 Avaliação da capacidade antioxidante contra radical livre estável DPPH•.95
5.6 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE FRENTE À *ARTEMIA SALINA* 99
5.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA FRENTE AO *AEDES AEGYPTI*. 99
5.7.1 Período de atividade larvicida 100

5.7.2 Taxa de sobrevivência 103

5.7.3 Reversibilidade 105

CONCLUSÃO 106

REFERÊNCIAS 108

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – NEOLIGNANAS ISOLADAS DO TRONCO DE OCOTEA POROSA 24

FIGURA 2 – ALCALOIDES APORFÍNICOS ISOLADOS DE OCOTEA MACROPHYLLA 25
.....

FIGURA 3 – DISTRIBUIÇÃO DE *O.PULCHELLA* MART.EM TERRITÓRIO NACIONAL 28

FIGURA 4 – IMAGEM DE OC*OTEA PULCHELLA* MART EM SEU HABITAT. FOLHAS ABAXIAL E ADAXIAL 29

FIGURA 5 – *OCOTEA PULCHELLA*, B-RAMO COM INFLORESCÊNCIAS, C-FOLHA FACE ABAXIAL, D- FLOR ♂, E- TÉPALA, F- ESTAME, G- ESTAME, H-PISTILO, I- FRUTO 30

FIGURA 6 – ARTEMIA SALINA 34

FIGURA 7 – CICLO DE VIDA DO MOSQUITO DE *AEDES AEGYPTI* 36

FIGURA 8 – PREPARO E ARMAZENAMENTO DO EXTRATO ENZIMÁTICO . 58

FIGURA 9 – ESTRUTURA DA QUERCETINA ISOLADA DA FRAÇÃO CLOROFÓRMIO 68

FIGURA 10 – ESPECTRO DE RMN ^{1}H DA QUERCETINA ISOLADA DA FRAÇÃO CLOROFÓRMIO 69

FIGURA 11 – ESPECTRO DE RMN ^{13}C DA QUERCETINA ISOLADA DA FRAÇÃO CLOROFÓRMIO 70

FIGURA 12 – ESPECTRO DE RMN 2D DA QUERCETINA ISOLADA DA FRAÇÃO CLOROFÓRMIO 71

FIGURA 13 – ESPECTRO HMQC DA QUERCETINA ISOLADA DA FRAÇÃO CLOROFÓRMIO 72

FIGURA 14 – ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO DE PLÂNTULAS DE ALFACE SUBMETIDAS AO EXTRATO BRUTO, À FRAÇÃO HEXÂNICA (FH), FRAÇÃO CLOROFÓRMIO (FCL), FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (FAE) E HDROALCOOLICA (HIDRO) DE *OCOTEA PULCHELLA*.. DADOS EXPRESSOS EM PERCENTUAL EM RELAÇÃO AO CONTROLE 76

FIGURA 15 – ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (A) E PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO (B) DE PLÂNTULAS DE *L. SATIVA* SUBMETIDAS AO EXTRATO BRUTO, À FRAÇÃO HEXÂNICA (FH), FRAÇÃO CLOROFÓRMIO (FCL), FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (FAE) E HDROALCOOLICA (HIDRO) DE *OCOTEA*

PULCHELLA. DADOS EXPRESSOS EM PERCENTUAL EM RELAÇÃO AO CONTROLE. *A MÉDIA DO TRATAMENTO DIFERE SIGNIFICATIVAMENTE (P<0,05) EM COMPARAÇÃO COM A MÉDIA DO CONTROLE, PELO TESTE DE TUKEY 78

FIGURA 16 – EFEITO DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB) E FRAÇÕES HEXÂNICA (FH), CLOROFÓRMIO (FCL), ACETATO DE ETILA (FAE) E HIDROALCÓLICA (HIDRO) DE *O. PULCHELLA* NO CRESCIMENTO MÉDIO DA RAIZ PRIMÁRIA (A), HIPOCÓTILO (B) E MASSA SECA (C) DE PLÂNTULAS DE *L. SATIVA* . *A MÉDIA DO TRATAMENTO DIFERE SIGNIFICATIVAMENTE (P<0,05) EM COMPARAÇÃO COM A MÉDIA DO CONTROLE, PELO TESTE DE TUKEY 80

FIGURA 17 – ALTERAÇÕES CELULARES NOS MERISTEMÁTICAS DE *L. SATIVA* SUBMETIDAS AO DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB) E FRAÇÕES HEXÂNICA (FH), CLOROFÓRMIO (FCL), ACETATO DE ETILA (FAE) E HIDROALCÓLICA (HIDRO) DE *O. PULCHELLA.* A- CÉLULAS NORMAIS, B- ANÁFASE COM PONTE CROMOSSÔMICA, C,D- CÉLULA EM APOPTOSE, E- CÉLULA AMEBÓIDE COM RETARDO NA ANÁFASE, F, G- METÁFASE COM PERDA DE FILAMENTOS CROMOSSÔMICOS, H- CÉLULA AMEBÓIDE 81

FIGURA 18 – RESPIRAÇÃO E TEOR DE CLOROFILA EM RAÍZES DE PLÂNTULAS DE *L. SATIVA* SUBMETIDAS À FRAÇÃO CLOROFORMIO (FH), FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (FAE) E FRAÇÃO HIDROALCOOLICA (HIDRO) DE *OCOTEA PULCHELLA.* MÉDIAS SEGUIDAS DE MESMA LETRA NÃO DIFEREM SIGNIFICATIVAMENTE (P < 0,05) EM COMPARAÇÃO COM A MÉDIA DO CONTROLE, PELO TESTE DE TUKEY 83

FIGURA 19 – ATIVIDADE DA PEROXIDASE (POD) E CATALASE (CAT) EM PLÂNTULAS DE *L. SATIVA* SUBMETIDAS À FRAÇÃO CLOROFORMIO (FH), FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (FAE) E FRAÇÃO HIDROALCOOLICA (HIDRO) DE *OCOTEA PULCHELLA.* MÉDIAS SEGUIDAS DE MESMA LETRA NÃO DIFEREM SIGNIFICATIVAMENTE (P < 0,05) EM COMPARAÇÃO COM A MÉDIA DO CONTROLE, PELO TESTE DE TUKEY 86

FIGURA 20 – ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD) E A- AMILASE, EM PLÂNTULAS DE *L. SATIVA* SUBMETIDAS À FRAÇÃO CLOROFORMIO (FH), FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (FAE) E FRAÇÃO HIDROALCOOLICA (HIDRO) DE *OCOTEA PULCHELLA.* MÉDIAS SEGUIDAS DE MESMA LETRA NÃO DIFEREM SIGNIFICATIVAMENTE (P < 0,05) EM COMPARAÇÃO COM A MÉDIA DO CONTROLE, PELO TESTE DE TUKEY 88

FIGURA 21 – ATIVIDADE DA POLIFENOLOXIDASE (POL) E PROTEÍNAS TOTAIS, EM PLÂNTULAS DE *L. SATIVA* SUBMETIDAS À FRAÇÃO CLOROFORMIO (FH), FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (FAE) E FRAÇÃO HIDROALCOOLICA (HIDRO) DE *OCOTEA PULCHELLA.* MÉDIAS SEGUIDAS DE MESMA LETRA NÃO DIFEREM SIGNIFICATIVAMENTE (P < 0,05) EM COMPARAÇÃO COM A MÉDIA DO CONTROLE, PELO TESTE DE TUKEY 90

FIGURA 22 – PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO E FRAÇÕES EM RELAÇÃO A VITAMINA C (A) E RUTINA (B), PELA REDUÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO 92

FIGURA 23 – PERCENTAGEM DE INIBIÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO E FRAÇÕES EM RELAÇÃO A VITAMINA C (A) E CATEQUINA (B) PELA AVALIAÇÃO DO PODER REDUTOR DE FE^{+2} 94

FIGURA 24 – CURVA DE CALIBRAÇÃO O EXTRATO BRUTO CONTRA RADICAL LIVRE ESTÁVEL DPPH• EM RELAÇÃO AO CONTROLE POSITIVO 96

FIGURA 25 – CURVA DE CALIBRAÇÃO DA FRAÇÃO HEXANO CONTRA RADICAL LIVRE ESTÁVEL DPPH• EM RELAÇÃO AO CONTROLE POSITIVO 96

FIGURA 26 – CURVA DE CALIBRAÇÃO DA FRAÇÃO CLOROFORMIO CONTRA RADICAL LIVRE ESTÁVEL DPPH• EM RELAÇÃO AO CONTROLE POSITIVO97 .....

FIGURA 27 – CURVA DE CALIBRAÇÃO DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA CONTRA RADICAL LIVRE ESTÁVEL DPPH• EM RELAÇÃO AO CONTROLE POSITIVO 98

FIGURA 28 – ATIVIDADE LAVIRCIDA, EM *AEDES AEGYPTI* SUBMETIDAS À FRAÇÃO FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (FAE) E HIDROALCOOLICA (HIDRO) DE *OCOTEA PULCHELLA* 100

FIGURA 29 – PÉRIODO DE ATIVIDADE LAVIRCIDA, EM LARVAS DE 1º E 2º ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO DE *AEDES AEGYPTI* SUBMETIDAS À FRAÇÃO FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (FAE) E HIDROALCOOLICA (HIDRO) DE *OCOTEA PULCHELLA* 101

FIGURA 30 – PÉRIODO DE ATIVIDADE LAVICIDA, EM LARVA DE 3º E 3º ESTÁGIO TARDIO DE *AEDES AEGYPTI* SUBMETIDAS À FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (FAE) E HIDROALCOOLICA (HIDRO) DE *OCOTEA PULCHELLA* 102

FIGURA 31 – LARVAS DE *AEDES AEGYPTI* SUBMETIDAS AOS BIOENSAIOS COM AS FRAÇÕES ACETATO DE ETILA (FAE) E HIDROALCOOLICA (HIDRO) DE *OCOTEA PULCHELLA* 103

FIGURA 32 – TAXA DE SOBREVIVÊNCIA DAS LARVAS DE *AEDES AEGYPTI* SUBMETIDAS À FRAÇÃO FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (FAE) E HIDROALCOOLICA (HIDRO) DE *OCOTEA PULCHELLA* 104

FIGURA 33 – ENSAIO DE REVERSIBILIDADE DAS LARVAS DO AEDES AEGYPTI SUBMETIDAS À FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (FAE) E HIDROALCOOLICA (HIDRO) DE *OCOTEA PULCHELLA* 105

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – GRUPOS QUÍMICOS PODEM SER ENCONTRADOS PELO ENSAIO SISTEMÁTICO 39

TABELA 2 – ENSAIO SISTEMÁTICO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DAS FOLHAS 64

TABELA 3 - ENSAIO SISTEMÁTICO DO EXTRATO AQUOSO DAS FOLHAS. 65

TABELA 4 - RENDIMENTO DAS FRAÇÕES DAS FOLHAS DE *OCOTEA PULCHELLA* 66

TABELA 5 – DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (PPM) DE RMN ^{13}C E ^{1}H DA SUBSTÂNCIA ISOLADA 67

TABELA 6– ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG) E PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO (G%) DE ALFACE SUBMETIDAS A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB), FRAÇÃO HEXÂNICA (FH), FRAÇÃO CLOROFÓRMICA (FCL), FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (FAE) E HIDROALCOOLICA (HIDRO) DE *OCOTEA PULCHELLA* 75

TABELA 7 VALORES DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE POR FORMAÇÃO DE UM COMPLEXO DE FOSFOMOLIBDÊNIO DO EXTRATO E FRAÇÕES EM RELAÇÃO À VITAMINA C 91

TABELA 8 VALORES DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE POR FORMAÇÃO DE UM COMPLEXO DE FOSFOMOLIBDÊNIO DO EXTRATO E FRAÇÕES EM RELAÇÃO À RUTINA 92

TABELA 9 – VALORES DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO PODER REDUTOR DE FE^{+2} DO EXTRATO E FRAÇÕES EM RELAÇÃO A VITAMINA C (A) E RUTINA (B) 93

TABELA 10 – VALORES DA ABSORBÂNCIA DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÃO HEXÂNICACONTRA RADICAL LIVRE ESTÁVEL DPPH• EM RELAÇÃO AO CONTROLE POSITIVO 95

TABELA 11 – VALORES DA ABSORBÂNCIA DA FRAÇÃO CLOROFORMIO CONTRA RADICAL LIVRE ESTÁVEL DPPH• EM RELAÇÃO AO CONTROLE POSITIVO 97

TABELA 12 – RESULTADO DE IC_{50} E TESTE DE TUKEY PARA REDUÇÃO DO DPPH 98

TABELA 13 – MORTALIDADE DE *ARTEMIA SALINA E* ESTIMATIVA DE CL_{50} 99

LISTA DE SIGLAS

ATCC *American Type Culture Colection*

ATP Adenosina Trifosfato

UV Ultravioleta

IV Infravermelho

RMN ^{1}H Ressonância magnética de Hidrogênio

RMN ^{13}C Ressonância magnética de Carbono

PAF Fator de agregação plaquetária

ON Óxido Nítrico

EROS Espécies Reativas de Oxigênio

PGE2 Prostaglandina E2

mL mililitros

°C Grau Celsius

pH Potencial Hidrogeniônico

HCl Ácido Clorídrico

CCD Cromatografia em Camada Delgada

DMSO – Dimetilsulfóxido

µL Microlitro

NEU Reativo 2-aminoetilbutirato

nm Nanômetros

EDTA Etilenodiaminotetracético

CL_{50} Concentração Letal pra morte de 50%

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo extrair e caracterizar as frações obtidas das folhas de *Ocotea pulchella* Mart., verificar o potencial de aplicabilidade através de ensaio de atividade biológica. Por meio de extração em aparelho soxhlet, foram obtidas as frações hexano, clorofórmica e acetato de etila, sendo que a fração hexano foi a que apresentou maior rendimento no processo extrativo. Da fração clorofórmio obteve-se um composto isolado de coloração amarela que foi analisado por e RMN de ^{13}C e ^{1}H. Caracterizou-se esse isolado como sendo uma quercetina. Os estudos de algumas atividades biológicas das frações revelaram atividade alelopática em relação às sementes de *Lactuca sativa*. As FCL, FAE e HIDRO desenvolveram toxicidade frente à *Artemia salina*. Todos os extratos e frações demonstraram atividade antioxidante pelo método da redução do complexo do fosfomolibdênio, pelo poder redutor de Fe^{2+} como pela redução do radical DPPH. Foram submetidas a avaliação antilarvicida amostras das FAE e HIDRO apresentando atividade larvicida significativa frente a larva do *Aedes aegypti*. Ambas apresentam uma relação causa e efeito, no período de atividade larvicida as larvas do 1º, 2º, 3º e 3º estágio tardio, submetidas a FAE e HIDRO apresentaram efeito nas 16 horas de exposição, já a taxa de sobrevivência corroboram com os resultados obtidos para atividade larvicida realizada, e pode ser inferido também uma relação entre causa e efeito, na reversibilidade foi demonstrando assim que o efeito da FAE e HIDRO sobre as larvas são prolongados. As alterações no período de desenvolvimento de *A. aegypti*, expostos a concentrações sub-letais de *O. pulchella*, pode prolongar o estágio imaturo provocando alterações morfológicas que inviabilizam a emergência de adultos e demonstram a eficácia destas frações no controle deste vetor.

Palavras chave:, 1. *Ocotea pulchella*. 2. Lauraceae. 3. Flavonóide. 4. Antioxidante. 5. Alelopatia. 6. Larvicida. 7. Toxicidade

ABSTRACT

The present study aimed to characterize the extract and fractions obtained from the leaves of *Ocotea pulchella* Mart., to investigate the potential applicability of using test biological activity. Through soxhlet extraction apparatus, the fractions obtained were hexane, chloroform and ethyl acetate, and the hexane fraction showed the highest yield in the extraction procedure. Chloroform fraction was obtained from an isolated compound which was yellow and analyzed by ^{13}C e ^{1}H NMR. Characterized the isolated as a quercetin. The study of some biological activities of the fractions showed allelopathic activity in relation to the seeds of *Lactuca sativa*. The FCL, FAE and HYDRO developed toxicity on *Artemia salina*. All extracts and fractions showed antioxidant activity by the method of reduction of complex phosphomolybdenum, reducing power by Fe^{+2} as the reduction of DPPH. Underwent assessment larvicidal activity samples of FAE and HYDRO presenting significant larvicidal activity against *Aedes aegypti* larvae. Both had a cause and effect relationship, between larvicidal activity of the larvae of the 1st, 2nd, 3rd and 3rd stage later submitted to FAE and HYDRO had an effect in the 16 hours of exposure, since the survival rate corroborate the results obtained for larvicidal activity performed, and can be inferred a relationship between cause and effect, reversibility was demonstrating that the effect of FAE on the larvae and Hydro are extended. The changes in development time of *A. aegypti* exposed to sublethal concentrations of *O. pulchella*, may prolong the immature stage leading to morphological changes that prevent the emergence of adults and demonstrate the effectiveness of these fractions in control of this vector.

Keywords: 1. *Ocotea pulchella*. 2. Lauraceae. 3. Flavonoid. 4. Antioxidant. 5. Allelopathy. 6. Larvicidal Activity. 7. Toxicity

1. INTRODUÇÃO

As plantas tem sido utilizadas como terapêutica a muitos séculos, fato que pode ser constatado no papiro Ebers, que remonta ao século XVIII onde se encontra a explanação de cerca de 100 patologias e drogas de origem tanto vegetal como animal (PINTO, 2002).

As plantas superiores apresentam-se como fonte de novos agente medicinais fato este que pode ser constatado a partir do número de drogas disponíveis na terapêutica alopática (que são 119) são de origem de vegetal sendo obtidas de apenas 90 espécies de plantas. O início da utilização das plantas medicinais se dá por meio do seu uso a partir do conhecimento popular sem um estudo cientifico rigoroso. Dessa forma o conhecimento popular torna-se um aliado na investigação pré-clinica de novos agentes terapêuticos. A medicina caseira ainda encontra-se sendo muito utilizada por mais ou menos 80% da população de países subdesenvolvidos e em desenvolvimento (FILHO, 2010).

O Brasil se apresenta como a maior fonte de medicamentos a partir de plantas medicinais devido a diversidade genética da suas espécies de plantas, mas devido aos poucos estudos na área tanto biológica (em torno de 10%) quanto fitoquímica (em torno de 5%), este potencial ainda encontra-se adormecido (LUNA,2005).

Os metabólitos secundários são um conjunto metabólico (enzimas e coenzimas) produzidos pelos vegetais, mas que não são essenciais à manutenção da vida. No entanto, estes apresentam funções auxiliares como defesa contra predadores, resistência contra pragas e doenças, atração de polinizadores, interação com microorganismos simbióticos, atrativos voláteis relacionados com a mesma ou outras espécies. Além disso, estes apresentam atividades biológicas que são de importância comercial tanto na área farmacêutica quanto nas áreas alimentar, agronômica e perfumaria, entre outras (SANTOS *in* SIMÕES, 1999).

A família Lauraceae é composta por 52 gêneros e cerca de 3000 espécies, e é encontrada nas florestas tropicais e subtropicais quentes. Destaca-se nesta família o gênero *Ocotea*, com aproximadamente 350 representantes (GARCEZ, 1995) e encontra-se distribuído em toda a América tropical. Os principais metabólitos

secundários já identificados no gênero são neolignanas, alcaloides benzilisoquinoleínicos além de óleos essenciais (TAKAKU,2007).

Considerando o estudo realizado sobre outras espécies deste gênero, verifica-se concentração significativa de alguns compostos químicos de grande interesse farmacológico e industrial. Dentre eles lignanas, alcaloides e óleos essenciais.

Estudos sobre a constituição química e biológica de *Ocotea pulchella* Mart. não foram ainda investigados, sendo importante à quantificação de substâncias presentes nesta espécie, visando posteriormente a sua ação farmacológica, tendo em vista ser uma espécie empregada na medicina popular e a planta encontrada na biodiversidade do território nacional, o que justifica a importância do trabalho proposto.

2 OBJETIVOS:

2.1 GERAL:

- Realizar o estudo fitoquímico do extrato etanólico e frações semipurificadas das folhas de *Ocotea pulchella* Mart., e sua ação nas atividades alelopática, antioxidante, antilarvicida e toxicológica.

2.2. ESPECÍFICOS:

- Obter o extrato etanólico bruto e frações semipurificadas de *Ocotea pulchella* Mart.;
- Isolamento e identificação dos constituintes químicos presentes nas frações semipurificadas de *Ocotea pulchella* Mart. a partir da análise de dados obtidos por espectrometria UV, IV e RMN ^{1}H e ^{13}C;
- Avaliar a atividade antilarvicida do extrato e frações de *Ocotea pulchella* Mart.;
- Avaliar a citotoxicidade do extrato e frações de *Ocotea pulchella* Mart.;
- Avaliar a atividade alelopática do extrato e frações de *Ocotea pulchella* Mart.;
- Avaliar a atividade antioxidante do extrato e frações de *Ocotea pulchella* Mart.;

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO

O enquadramento taxonômico de *Ocotea pulchella* Mart., Lauraceae, segundo PINHEIRO (2001); CHASE & REVEAL (2009), é esquematizado no quadro 01.

	PINHEIRO (2001)	CHASE & REVEAL-APG III (2009)
Clado	Angiospermas	Angiospermas
Divisão	----------	Eudicotiledôneas núcleo
Grupo	----------	Asterídeas
Sub grupo	----------	Euasterídeas
Divisão	Magnoliophyta	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida	Magnoliopsida
Subclasse	Magnoliidae	Magnoliidae
Ordem	Laurales	Laurales
Família	Lauraceae	Lauraceae
Gênero	*Ocotea*	*Ocotea*
Espécie	*Ocotea pulchella*	*Ocotea pulchella*

Quadro 01 – Enquadramento taxonômico de *Ocotea pulchella*

3.2 CONSIDERAÇÕES SOBRE A FAMÍLIA LAURACEAE

A família Lauraceae é composta por 32 gêneros e cerca de 3000 espécies e localiza-se principalmente nas regiões tropicais e subtropicais quentes. (TAKAKU, 2007, MARQUES, 2001). A família pertence às angiospermas e apresenta grande dificuldade na sua identificação devido à pequenas variações nos caracteres (COUTINHO, 2006).

CRONQUIST, (1988) a coloca como sendo uma das famílias mais antigas e sendo suas características morfológicas e anatômicas compartilhadas por outras famílias como Calycanthaceae, Idiospermaceae e Hernandiaceae (CRONQUIST, 1988). O óleo essencial encontrado nos representantes desta família é armazenado em células secretoras que podem ser encontradas nas folhas, casca e também no lenho (MARQUES, 2001).

3.3 CONSIDERAÇÕES SOBRE O GÊNERO *OCOTEA*

O gênero Ocotea contém cerca de 350 espécies, apresenta diversidade química entre as espécies, bem como dentro dos componentes das plantas individuais. Este gênero geralmente apresenta-se como espécies aromáticas que encontram utilidade em produtos de perfumaria, e aromatizantes(TAKAKU,2007). As espécies são encontradas em toda a América tropical (GARCEZ, 2011) e dentre os seus metabólitos secundários destacam-se neolignanas e alcaloides benzilisoquinoleínico (GARCEZ,1995).

A literatura cita o uso de espécies deste gênero na indústria madeireira como *O. puberula* Nees (fabricação de papel), *O. organensis* (Meiss.) Mez, (obras internas e carpintaria), *O. diospyrifolia* (Mez) (construções de postes e tábuas de assoalho), *O. guianensis* Aubl. e *O. acutifolia* Me (marcenaria). Na construção civil como *O. aciphylla* (Nees) Mez, *O. catharinensis* Mez, *O. canaliculata* (Rich.) Mez., *O. spectabilis* (Meiss.) Mez, *O. divaricata* (Nees) Mez, *O. porosa* (Nees) L. Barroso e *O. elegans* Nees (MARQUES, 2001).

A família também é conhecida pela utilização na medicina tradicional, sendo *O. aciphylla* (Nees) Mez que é utilizada como tônico e estomáquico, fazendo-se infusões com as folhas, enquanto a casca é utilizada como anti-reumática e depurativa. Estudos etnobotânicos feitos por EMMERICH & SENNA (1985) mencionam o uso desta espécie por índios do Xingu, onde a folha é utilizada para enrolar o cigarro usado pelo pajé em rituais de cura. Esta folha, quando queimada, pode ter um efeito narcótico (MARQUES, 2001).

Devido ao caráter adstringente da casca e raiz, a espécie *O. spectabilis* (Meissn.) Mez é tida como tônico. A casca e as folhas de *O. pulchella* Mart. são consideradas estomáquicas e emenagogas. Devido ao gosto amargo da casca de *O. teleiandra* (Meissn.) Mez, esta espécie é usada contra “dores no peito”, e as folhas

de *O. indecora* Schott são tidas como sudoríficas, anti-reumática e até antisifilítica, devido as propriedades do óleo essencial obtido da casca que é geralmente extraído do caule ou da raiz (MARQUES, 2001).

A espécie *O. guianensis* Aubl., típica da Amazônia, possui casca e folha aromáticas, sendo empregadas pela população local contra abcessos. Outra espécie da Amazônia, denominada *O. barcellensis* Mez, possui um óleo que é extraído através de furos na madeira, sendo usado contra a pitiríase na cabeça. As espécies *O. pretiosa* (Nees) Bentham & Hoocker, *O. cymbarum* e ainda *Licaria puchury-major* Kosterm possuem atividade comprovada contra o desenvolvimento do ancilostomídeo humano (MARQUES, 2001).

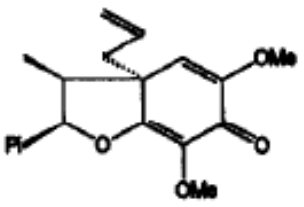
3.3.1 Aspectos fitoquímicos do gênero *Ocotea.*

O gênero *Ocotea* é conhecido por ser uma fonte de neolignanas e alcaloides benzilisoquinoleínicos. Este gênero também apresenta suas espécies como geralmente aromáticas, sendo desta forma utilizadas em produtos de perfumaria bem como aromatizantes (TAKAKU, 2007).

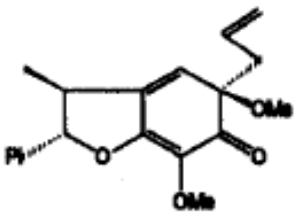
A espécie *Ocotea duckei* Vattimo apresenta diversos alcaloides da classe benzoilisoquinolínico, lignanas e óleos essenciais (COUTINHO, 2006).

A espécie *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm apresenta um óleo essencial que foi extraído a partir de cálices cujos principais componentes foram transcinnamaldehyde (27,9%) e metilcinamato (21,6%) (BALBENNI,2009).

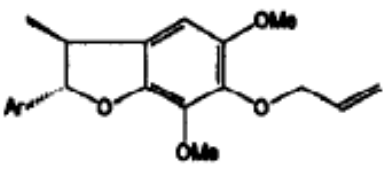
Em estudo fitoquímico sobre *Ocotea catharinensis* sobre a fração de éter de petróleo das cascas do tronco foi relatada a ocorrência de neolignanas 1, 2, 6a-c e 7a-b. Ishige et al., 1991 após um reexame aprofundado do fração éter de petróleo extraído do cascas do tronco,foram isoladas adicionalmente 3a-b e 5c, enquanto fração de éter de petróleo de madeira rendeu 1, 2, 3a, 4a-d, 5c-d, 6a-c e 7a-c.O extrato de folhas da fração de éter de petróleo apresentaram variabilidade química, que tem sido observado na madeira do tronco de espécimes diferentes de *O. porosa* e tem sido descrita em diversos trabalhos. Atualmente, há poucos trabalhos sobre os componentes das folhas de *Ocotea porosa* (LORDELLO, 1997).



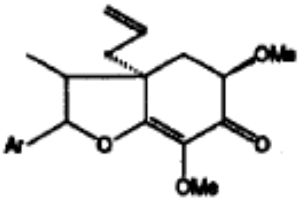
1



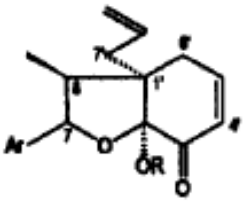
2



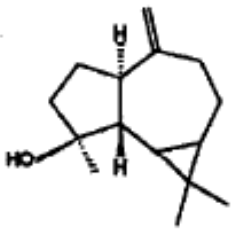
3a Ar = Pi
3b Ar = Mp



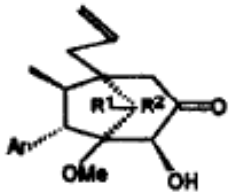
4a Ar = α - Pi, β - Me
4b Ar = β - Pi, α - Me
4c Ar = β – Pi, β - Me
4d Ar = β – Ve, β – Me



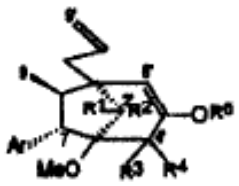
5a Ar = α - Pi, R = H
5b Ar = α - Ve, R = H
5c Ar = β - Pi, R = H
5d Ar = β - Ve, R = H
5e Ar = β - Tp, R = H
5f Ar = β - Pi, R = Me



8



7a Ar = Pi, R1 = OH, R2 = H
7b Ar = Mp, R1 = OH, R2 = H
7c Ar = Pi, R1 = H, R2 = OH



6a Ar = Pi, R1 = OH, R3 = α - OH, R5 = Me, R2 = R4 = H
6b Ar = Pi, R1 = OH, R3 = β -OH, R5 = Me, R2 = R4 = H
6c Ar = Pi, R1 = OH, R3,R4 = O, R2 = R5 = H
6d Ar = Pi, R1,R2 =O, R3 = α - OH, R5 = Me, R4 = H
6e Ar = Mp, R1,R2 =O, R3 = α - OH, R5 = Me, R4 = H
6f Ar = Pi, R1,R2 =O, R3 = β - OH, R5 = Me, R4 = H

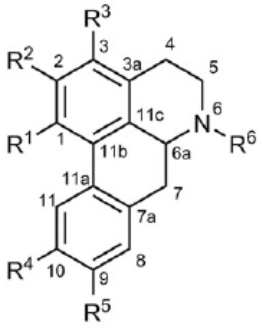
Pi = 3,4-methylenedioxyphenyl
Ve = 3,4-dimethoxyphenyl
Mp = 5 -methoxy-3,4-methylenedioxyphenyl
Tp = 3,4,5-trimethoxyphenyl

FIGURA 1 – NEOLIGNANAS ISOLADAS DO TRONCO E OCOTEA POROSA FONTE: LORDELLO (1997)

Estudos prévios têm relatado que as espécies de *Ocotea* produzirem alcaloides do grupo benzilisoquinoleínico (principalmente do tipo aporfínicos) (Zanin & Lordello, 2007). Um estudo fitoquímico anterior sobre *O. macrophylla* descreveu o isolamento e identificação de quatro alcaloides aporfínicos de extratos da trunkwood (BARRERA, 2009).

A ocorrência de alcaloides aporfínicos em espécies de Lauraceae é típica, e são freqüentes em espécies que pertencem ao gênero (SHAMMA E GUINAUDEAU, 1984). Embora este tipo de metabólito seja encontrado em espécies de outras famílias filogenéticas relacionadas, como Annonaceae, Magnoliaceae e Piperaceae, entre outras (LISCOMBE *et al.* 2005).

Alguns alcaloides já haviam sido previamente isoladas de outras espécies de Ocotea como 1, 2 a partir de Ocotea macrophylla, 4, 7 de Ocotea puberula como pode ser visualizado na figura 2. Já os compostos 3, 5 e 6 foram isolados de espécies de outros gêneros [3, 6 de Cassytha filiformis Cassytha (Cava et al., 1968), 5 de *Liriodendron tulipifera* (Hufford e Funderburk, 1974)]. Além do que os compostos 7 e 5 são representantes de um tipo menos comum de alcaloide tipo aporfínico. O primeiro, devido à sua 4-5-insaturação, e este último devido à sua substituição N-carbonil que é mais freqüente em espécies de Annonaceae e Magnoliaceae (BARRERA, 2009).



	R^1	R^2	R^3	R^4	R^5	R^6	
1	OCH_3	OCH_3	H	$-OCH_2O-$		CH_3	Δ^{6a-7}
2	OCH_3	OCH_3	H	$-OCH_2O-$		CH_3	6aS
3	$-OCH_2O-$		H	$-OCH_2O-$		CH_3	6aS
4	$-OCH_2O-$		H	OCH_3	OCH_3	CH_3	6aS
5	OCH_3	OCH_3	H	$-OCH_2O-$		$COCH_3$	6aS
6	$-OCH_2O-$		OCH_3	$-OCH_2O-$		H	6aS
7	$-OCH_2O-$		OCH_3	OCH_3	OCH_3	CH_3	$\Delta^{4-5\,;\,6a-7}$

FIGURA 2 – ALCALOIDES APORFÍNICOS ISOLADOS DE OCOTEA MACROPHYLLA FONTE: BARREIRA (2009)

As raízes de *O. usambarensis* são utilizadas na forma de infusão como antiplasmódica, sendo que no Leste da África, o decocto é indicado no combate a malária (MUTHAURA, 2007).

3.3.2 Aspectos farmacológicos do gênero *Ocotea.*

O potencial antimalárico da espécie *O. odorifera* foi relatada pela 1ª vez em estudos etnobotânicos, sendo utilizada pelos índios guaranis (BOTSARIS,2007). *O. duckei* apresenta uma importante lignana, a iangambina que tem várias propriedades farmacológicas, como a ativação plaquetária seletivo (PAF), antagonista do receptor, anti-alérgicos, analgésico, e protetor contra colapso cardiovascular e choque. A reticulina, um alcaloide banzoisoquinolínico, é conhecido por produzir alteração do padrão de comportamento, prolongando o sono induzido pelo pentobarbital, dessa forma reduz a coordenação motora, a hiper motilidade induzida pela D-anfetamina e supressão da resposta de esquiva condicionada, sugerindo que tem potente atividade depressora do sistema nervoso central (COUTINHO,2006).

Em plantas provenientes do Paraguai com provável atividade contra leishmanicida, o extrato alcaloídico da espécie *O. lancifolia* apresentou atividade *in vitro* na concentração de 100 mg/mL contra três cepas de formas promastigotas de *Leishmania spp*., sendo estas *L. braziliensis , L. donova*ni e *L. amazonensis*. Estas atividades Leishmanicida e antichagásica foram realizadas de acordo com FOURNET *et al.,*2007.

Em tratamento de ratos, *O. quixos* mostrou atividade antitrombótica, a partir do óleo essencial, e foi relacionada à sua capacidade de inibir a agregação plaquetária, retração do coágulo e vasoconstrição. Foi especulado que o trans-cinamaldeído poderia ser componente responsável por esses efeitos do óleo primário, uma vez que partilharam um perfil de atividade similar. Ao trans-cinamaldeído também é atribuído atividades antifúngica, antimicrobiana e anti-inflamatória e isso se deve as suas propriedades antioxidantes e sua capacidade de inibir o NF-kB atividade transcricional (BALABENNI, 2009).

Dos variados efeitos biológicos atribuído ao cinamaldeído, em relação a sua propriedade antioxidante este é capaz de suprimir a expressão de EROs e da produção de óxido nítrico estimulada por células LPS RAW264.7, IL-1 da atividade

da ciclooxigenase 2 induzida por IL-1 e da produção de PGE2 em ratos células endoteliais microvasculares e liberação de EROs bem como pró-inflamatórias expressão de citocinas em monócitos cultivados LPS-estimulado / macrófagos. Todas estas atividades sugerem fortemente que este agente pode possuir propriedades imuno-modulação e nos levam a investigar o potencial anti-inflamatório do óleo essencial de *O. quixos* contendo trans-cinamaldeído como um dos seus principais constituintes (BALABENNI, 2009).

A espécie *Ocotea cujumary* Mart. e *O. opifera* Mart.,de acordo com a literatura histórica na década de 1970, eram indicadas para o combate dores reumáticas a partir de suas sementes, entretanto, atualmente não há relatos da utilização da espécie *O.cujumary pe*las comunidades brasileiras para a mesma finalidade. Ambas as espécies citadas não apresentam estudos farmacológicos e somente *O. opifera* apresenta relatos quanto a presença de óleos essenciais (GIORGETTI, 2007). Dentre outras atividades na medicina popular, tem- se o emprego de *Ocotea glomerata* (Ness) Mez (folha de Louro), como sudorífera, em caso de hidropisia, para tratamento de problemas digestivos e de hipertensão arterial, além de atividade contra estirpes de *Staphylococcus aureus* resistente meticilina (MRSA) e ao transportador NorA. A atividade antimicrobiana de *O. odorífera* em cepas de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidemidis*, *Candida albicans* e *Escherichia Coli*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus* e *Saccharomyces cerevisiae* foi comprovada (LIMA, 2006).

3.4 CONSIDERAÇÕES SOBRE *OCOTEA PULCHELLA* MART.

3.4.1 Sinonímia vulgar

Popularmente, esta espécie é conhecida por canela-babosa, louro-abacate, guaiacá, cane-goiacá, canela-parda, canela-pimenta, amansa-aiui-saiiu, sendo conhecida na Argentina por laurel-amarillo. Além de Canelinha, inhumirim (MARQUES, 2001; BARROS, 2005).

3.4.2 Distribuição geográfica

Segundo Barros (2005), a espécie ocorre na América do Sul sendo comum na Argentina, Paraguai, Uruguai e Brasil, sendo neste último, distribuída nas regiões Centro-Oeste (Goiás), Sudeste (Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, Rio de Janeiro) e Sul (Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul) (QUINET *et al.* 2010), como demonstrado na Figura 3.

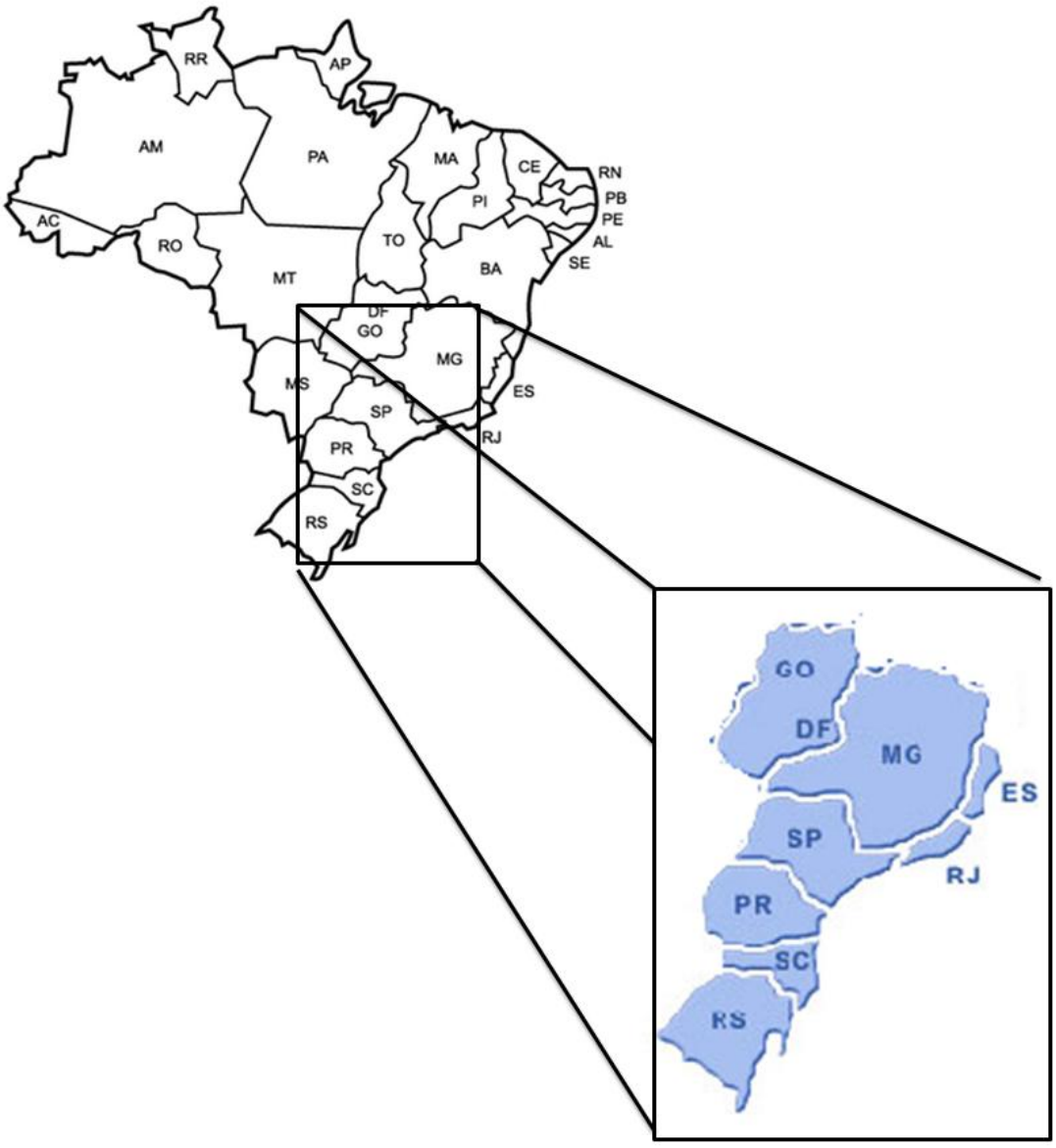


FIGURA 3 - DISTRIBUIÇÃO DE *O. PULCHELLA* MART. EM TERRITÓRIO NACIONAL. FONTE: QUINET *et al.* (2010)

3.4.3 Descrição botânica de *O. pulchella.*

Segundo BROTTO *et al.* (2010), o hábito desta espécie varia de arbustivo a arbóreo, podendo chegar a 20 m de altura, com ramos cilíndricos, áureo-pubérulos. As folhas são alternas, com pecíolos de 0,3−1cm comprimento (Figura 2), canaliculado, pubérulo; estreito-elíptica ou elíptica, cartácea-coriácea, ápice arredondado, obtuso ou acuminado, base cuneada, revoluta, face adaxial glabrescente, lustrosa, reticulação densa, nervuras planas, face abaxial glabrescente, reticulação densa, nervuras subsalientes, secundárias 4−6 pares, padrão de nervação broquidódromo, domácias nas axilas, cobertas por tricomas alvos. Inflorescências axilares; panícula ou racemo 1−5 cm compr., em geral pauciflora, áureo-pubérula. Flores unissexuadas; estaminadas, pedicelo ca. 3 mm compr.; hipanto conspícuo, internamente glabrescente; tépalas 1,8−2,3 mm compr., ovaladas, subiguais, reflexas, face abaxial pubérula, face adaxial glabra, papilas inconspícuas na margem; estames 1,1−1,8 mm compr., filetes tão longos quanto ou pouco menores que as anteras, glabros, anteras ovalado-retangulares, ápice obtuso, glabras, locelos introrsos; filetes tão longos quanto as anteras, glabros, glândulas inseridas na base, anteras retangulares, contraídas no meio, ápice truncado, glabras, locelos superiores laterais e inferiores lateral-extrorsos; pistiloide filiforme, glabro; pistiladas com tépalas 1,2−1,9 mm compr., ovaladas, subiguais; estaminódios 0,5−1,1 mm compr.; pistilo 1,5−2,3 mm compr., glabro, ovário globoso, estilete um pouco mais curto, estigma capitado. Fruto ca. 1,1 $_X$ 0,8 cm, ovalado ou elipsoide, ápice mucronado; cúpula ca. 0,9 X 0,9 cm, sub-hemisférica a hemisférica, margem simples (Figura 4).

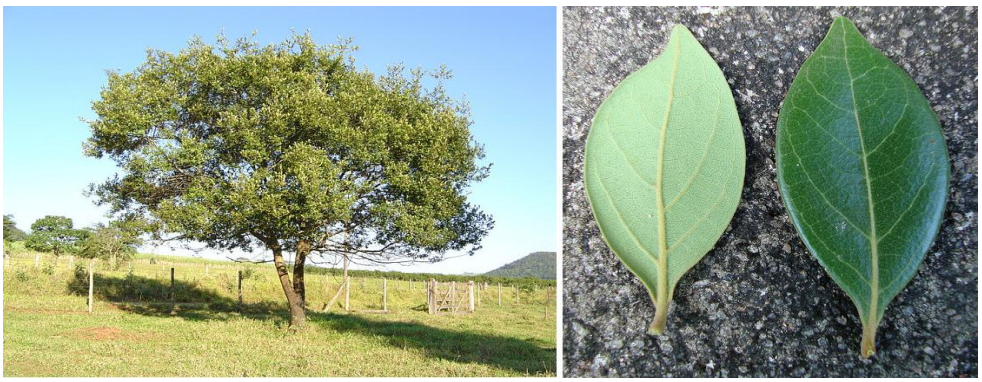


FIGURA 4 – IMAGEM DE *OCOTEA PULCHELLA* MART. EM SEU HABITAT NATURAL. FOLHAS FACE ABAXIAL E ADAXIAL FONTE: REGINALDO BAIÃO (2009)

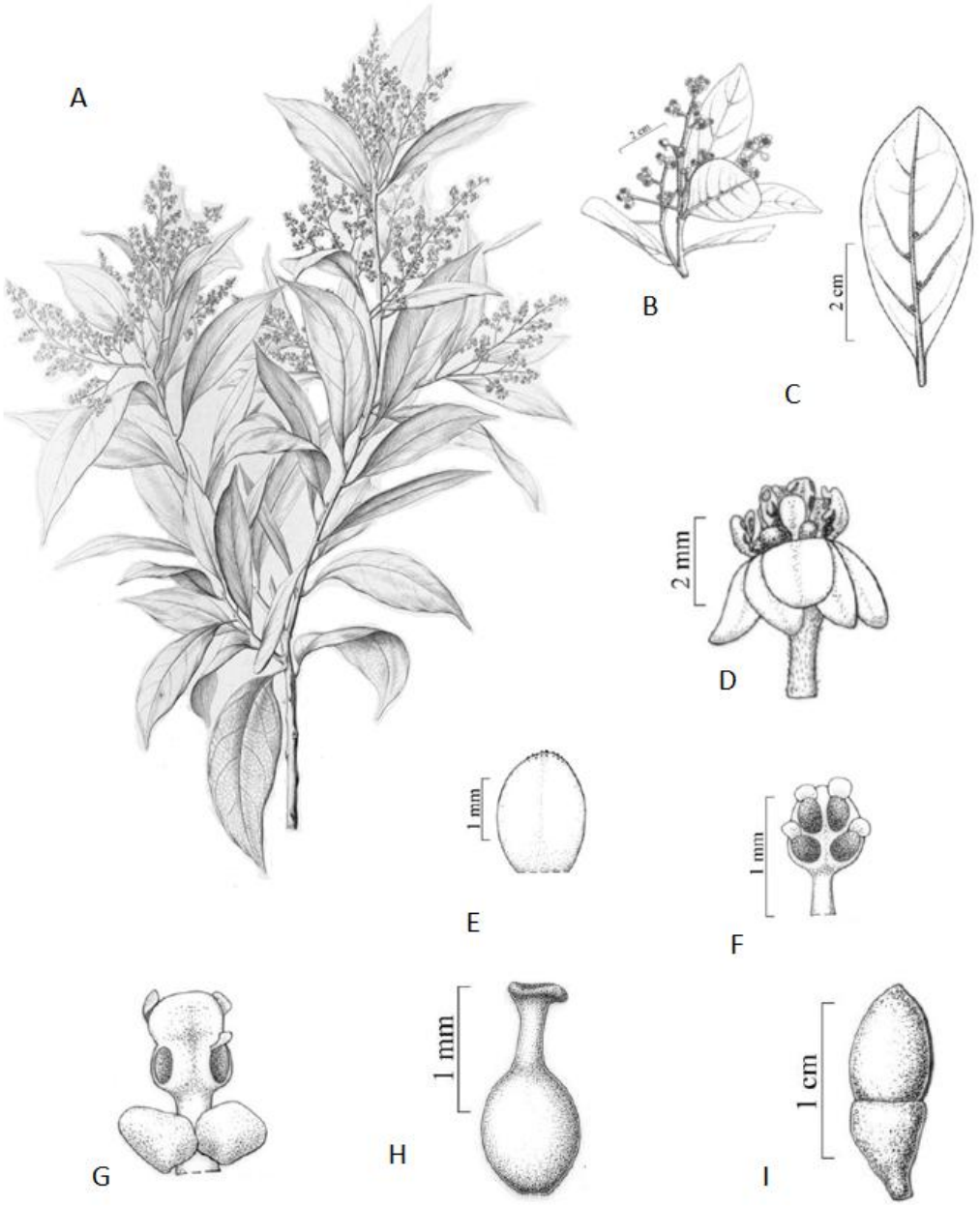


FIGURA 5 - A- *OCOTEA PULCHELLA*, B-RAMO COM INFLORESCÊNCIAS, C- FOLHA FACE ABAXIAL, D- FLOR ♂, E- TÉPALA, F- ESTAME, G- ESTAME, H- PISTILO, I- FRUTO FONTE: BROTTO (2010)

3.5 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROS) E O ESTRESSE OXIDATIVO

A oxidação nada mais é do que a transferência de elétrons de um átomo a outro, sendo essencial à vida aeróbica e ao metabolismo humano, uma vez que o oxigênio é o último aceptor no fluxo de elétrons, que é essencial para a formação de trifosfato de adenosina (ATP) (PIETTA, 2000). Entretanto, quando o fluxo de elétrons é incompleto, ocorre a geração de espécies químicas altamente reativas, denominadas radicais livres. Estas espécies químicas são denominadas de espécies reativas de oxigênio (EROS), neste grupo se encontram o radical superóxido (•O2 -), o radical hidroxila (•OH), o radical peroxila (ROO•), o radical alcoxila (RO•) e o radical óxido nítrico (NO). (PIETTA, 2000).

Estas EROs apresentam efeito benéfico para o organismo ao participarem de processos na produção de energia, na fagocitose, na regulação do crescimento celular e na sinalização intracelular, além da síntese de importantes compostos biologicamente ativos (HALLIWELL, 1997). No entanto, podem também apresentar efeitos danosos ao organismo como alterações celulares (danos ao DNA, a proteínas, incluindo a oxidação de importantes enzimas) e pelo início da peroxidação de lipídios poliinsaturados da membrana celular (COMPORI, 1985; HALLIWELL, 1997). A fim de evitar esses danos, o metabolismo humano dispõe de sistemas de proteção contra radicais livres.

Os sistemas de proteção são classificados como antioxidantes endógenos e exógenos. Os primeiros representam sistemas de defesa enzimática, como glutationa peroxidase, catalase e superóxido dismutase, que metabolizam superóxido, peróxido de hidrogênio e peróxidos lipídicos, prevenindo a formação de compostos deletérios (PIETTA, 2000; ATTARD *et al*., 2005).

Estes sistemas atuam de maneira complementar já que as EROs geradas são das mais variadas espécies e ocorrem em diversos compartimentos celulares (PIETTA, 2000). De uma maneira geral, estes sistemas atuam suprimindo a formação de radicais livres e o processo de reações em cadeia ou inativam radicais livres, evitando a propagação de reações em cadeia. Há, também, sistemas de defesa não enzimáticos, como glutationa, peptídeos de histidina, proteínas ferro-ligadas (ferritina e transferrina), ácido dihidrolipóico, CoQ10 reduzida, melatonina, e outros.

O estresse oxidativo tem sido apontado como uma via comum relacionada a diversos mecanismos de patogênese de doenças cardiovasculares, nefropatia, neuropatia, retinopatia, disfunção erétil e diabetes e suas complicações (SHIH, WU & LIN, 2002). Esse estresse oxidativo surge a partir do desequilíbrio entre a geração de radicais derivados do oxigênio – os radicais livres – e o potencial antioxidante do organismo (ABDOLLAHI *et al*., 2004).

O consumo de antioxidantes provindos da dieta se tornam necessários, pois os sistemas de defesa endógenos atuam de maneira parcial além de que diversas situações fisiopatológicas (tabagismo, exposição a poluentes e à radiação ultravioleta, dieta rica em lipídeos saturados etc.) levam a produção em excesso de EROs,que ao se acumularem causam danos ao organismo. Por isso, tem sido expressivo o interesse na busca por substâncias antioxidantes naturais. As plantas contêm uma ampla variedade dessas substâncias, que inclui o ácido cinâmico, as cumarinas, os diterpenos, os flavonoides, as lignanas, os monoterpenos, os fenilpropanóides, os fenóis, os ácidos fenólicos, os taninos e os triterpenos. Recebem especial atenção, devido a sua conhecida função quimiopreventiva contra danos oxidativos, as vitaminas e os compostos fenólicos (WU; NG, 2008), cujas evidências se somam a cada dia, aumentando sua importância como antioxidante (PIETTA, 2000).

3.6 ALELOPATIA E OS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

As plantas produzem os mais diversos tipos de metabólitos secundários que possuem funções fisiológicas promovendo interações com outras espécies vegetais, quando liberados no meio ambiente. São estas interações químicas diversas e complexas que fornecem muitas vantagens adaptativas à planta que libera tais substâncias (REIGOSA *et al*., 1999).

Esta vantagem é conhecida como alelopatia, que nada mais é do que um tipo de interação bioquímica entre vegetais, considerada uma forma de adaptação química defensiva das plantas, além de ser um fator de estresse ambiental para muitas espécies (LOVETT;RYUNTYU, 1992).

Após a liberação para o ambiente por meio de várias rotas (WHITTAKER; FEENY, 1971; CHOU, 1999), os aleloquímicos podem causar diversos efeitos

diretos e indiretos sobre as plantas. Quanto aos efeitos indiretos compreendem alterações nas propriedades e características nutricionais do solo como também, nas populações e, ou, atividades de microrganismos, nematóides e insetos. Com relação aos efeitos diretos incluem alterações no crescimento e metabolismo vegetal (RIZVI *et al.*, 1992), englobando alterações em níveis celular, fitormonal, fotossintético e respiratório, assim como modificações no funcionamento de membranas, na absorção de nutrientes e nas relações hídricas, entre outras (RICE, 1984; RIZVI *et al*., 1992).

Alelopatia envolve interação entre estresses abióticos e bióticos, estes através de múltiplos compostos que podem ter relações sinergísticas que potencializam suas ações (Einhellig, 1999).

Apesar do aumento nas investigações sobre o potencial de atividade alelopática em espécies nativas ocorrido nas últimas décadas, o conhecimento atual ainda é considerado escasso (FERREIRA *et al.*, 1992).

3.7 *ARTEMIA SALINA* : BIOENSAIO DE CITOTOXICIDADE

Artemia salina (Crustacea, Anostraca) é um microcrustáceo marinho, de tamanho e colorações variadas, que vão do rosa-pálido a avermelhado, branco ou esverdeado dependendo do seu tipo de alimentação; apresenta dimorfismo sexual e atinge a fase adulta em 20 dias, conforme mostrado na Figura 6. É utilizado como alimento para peixes, encontrado em lojas de aquaristas. Seu ciclo de vida tem início com a eclosão de cistos dormentes, os quais são embriões encapsulados metabolicamente inativos. Estes cistos podem ficar em estado de dormência por muitos anos, desde que fiquem em lugar seco, já que em contato com água salgada hidratam-se e reassumem seu desenvolvimento (BORTOLOTTO, 2007).

FIGURA 6 – INDIVÍDUOS ADULTOS E NÁUPILOS DE *ARTEMIA SALINA* UTILIZADAS NOS BIOENSAIOS DE TOXICIDADE EM LABORATÓRI. FONTE: O AUTOR (2011)

A utilização deste organismo como bioindicador remonta a década de 70 e muitas pesquisas nas diversas áreas do conhecimento o têm utilizado para avaliar a toxicidade aguda de ambientes degradados, como lençóis freáticos, solo, produtos químicos, através da sobrevida dos indivíduos expostos as mesmas, por um determinado período de tempo, sendo utilizados por pesquisadores do mundo inteiro e nas mais diversas áreas do conhecimento (BORTOLOTTO, 2007), para estudo fitoquímico com fungos (SIQUEIRA *et al.*, 1998).

3.8 SUBSTÂNCIAS DE ORIGEM NATURAL (PLANTA/MICROORGANISMO) COM ATIVIDADE LARVICIDA.

O controle químico, através de organofosforados e piretróides é caracteristicamente eficaz contra mosquitos. No entanto, se o mesmo produto inseticida é utilizado por muitas gerações estes culicídeos podem desenvolver alterações na suscetibilidade, tornando-os menos susceptíveis (LAWLER & LANZARO, 2005). Pesticidas químicos organofosforados e piretróides são uma poderosa ferramenta contra vetores e continuarão desempenhando papel importante no controle integrado. No entanto, eles têm desvantagens, como o custo elevado, riscos a saúde humana e a organismos não-alvo, bioacumulação e desenvolvimento de resistência dos organismos alvo (THATHEYUS, 2007).

Estes problemas têm justificado a necessidade de novas estratégias alternativas usando produtos de origem natural, especialmente os derivados de plantas, minimizando a dependência aos inseticidas químicos sintéticos como os organofosforados e piretróides.

Produtos de origem botânica são amplamente reconhecidos por sua diversidade química, como por sua considerável aplicação na área farmacêutica (PENIDO *et al.,* 2005). Logo, as plantas oferecem uma fonte alternativa de controle porque contêm uma série de bioativos químicos. Considerável número de pesquisas têm ressaltado a busca e o desenvolvimento de substâncias derivadas de plantas para controle de mosquitos (SCHMUTTERER, 1990; SUKAMAR *et al.,* 1991; SILVA *et al.,* 2004; MENDONÇA *et al.,* 2005; AMER E MEHLHORN, 2006a e 2006b; SILVA *et al.,* 2006; CHAMPAKAEW *et al,,* 2007; GLEISER E ZYGADLO, 2007; CHENG *et al.,* 2008; GERIS *et al.,* 2008; MULLAI *et al.,* 2008; PAVELA, 2008; PUSHPANATHAN *et al.,* 2008; RAHUMAN *et al.,* 2008; SILVA *et al.,* 2008).

O mais importante vetor da dengue é o *Aedes aegypti*, inseto pertencente à família Culicidae, do subgênero Stegomyia. Apesar de vários trabalhos já terem demonstrado a possibilidade de outras espécies deste gênero (GUBLER, 1987), como *Aedes albopictus* e *Aedes polynesiensis* também exercer esta função (BANCROFT, 1906).

O mosquito tem hábitos domésticos apresentando a hematofagia, cópula e oviposição no período diurno (primeiras horas da manhã e ao anoitecer), e manifesta preferência pelo sangue humano, mas também se alimentam de cães, roedores e aves. Além disso, estes se adaptam facilmente ao ambiente urbano, onde encontram as condições necessárias para sua reprodução. Tanto o macho quanto a fêmea alimentam-se de néctar ou seiva vegetal, porém a fêmea, após o acasalamento, faz hematofagia, devido à necessidade da albumina e proteínas para maturação dos ovos. O intervalo entre o repasto e a oviposição é de dois a três dias, com igual período para eclosão (ROZENDAAL, 1997).

O ciclo de vida do mosquito (Figura 7) ocorre por metamorfose completa compreendendo ovo, larvas (quatro estádios evolutivos), pupa e adulto (SILVA, SILVA e LIRA, 1998). Um dos principais fatores que contribuem para a distribuição dos mosquitos nos criadouros é a seleção do local da oviposição. As fêmeas de A. aegypti depositam seus ovos na parede interna dos recipientes naturais ou artificiais, preferencialmente em locais fora do meio líquido (para manutenção da viabilidade dos ovos), mas próximos a reservatórios com água.

Geralmente são usados como locais para ovoposição pneus, materiais plásticos descartáveis, caixas d'água descobertas, garrafas, pratos de vasos de

plantas ou qualquer outro local que possa armazenar água, opções de criadouros para a população vetora (CHRISTOPHERS, 1960; NELSON, 1986).

A deposição dos ovos é realizada em pequenos grupos e, após completar o período embrionário os ovos tornam-se resistentes a longos períodos de dessecação, podendo prolongar-se por mais de um ano. Dessa forma, sobrevivem durante o período de estiagem e com a chegada das chuvas, principalmente no verão, obtém as condições ambientais favoráveis para iniciar o ciclo (FORATTINI, 2002).

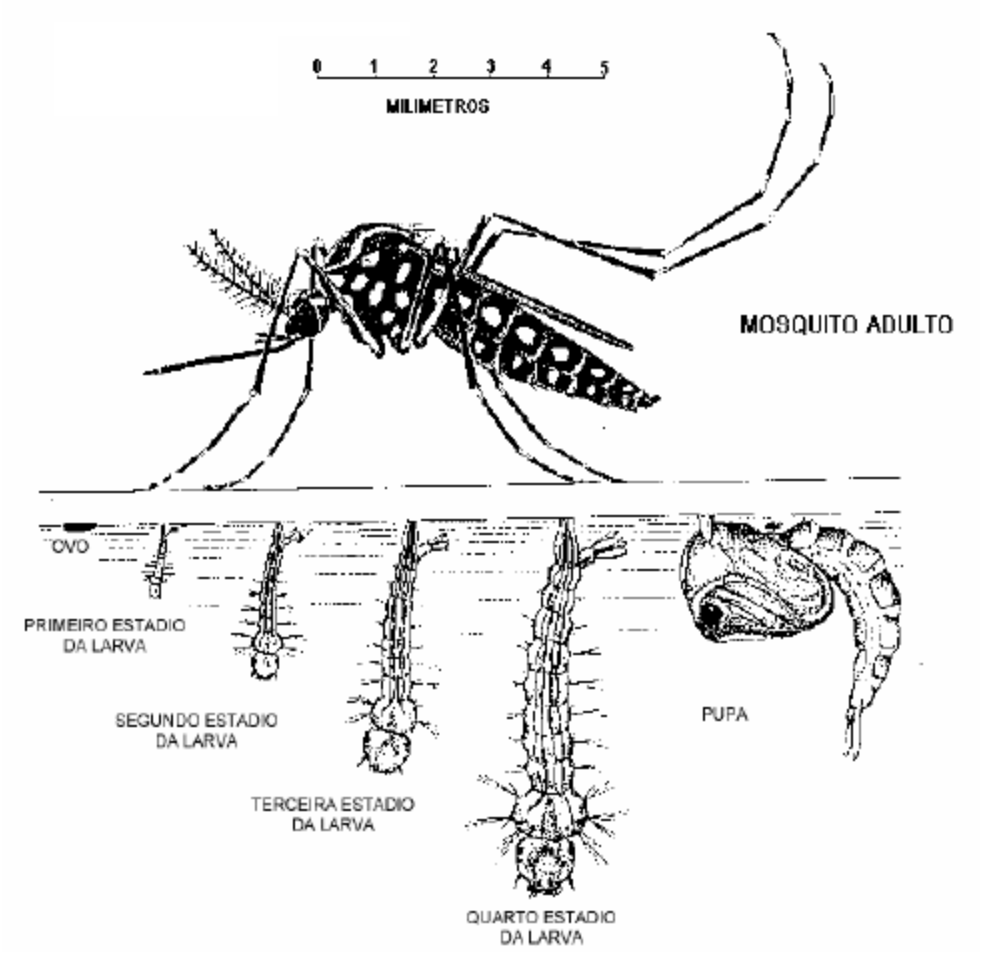


FIGURA 7 - CICLO DE VIDA DO MOSQUITO *AEDES AEGYPTI* FONTE: FORATTINI (1962)

O estudo de produtos naturais obtidos de plantas e fungos com atividade larvicida é recente. A partir da década de 80 são encontrados alguns trabalhos realizados com o intuito de isolar tais substâncias, enquanto nos trabalhos anteriores (QURESHI, MOHIUDDIN e BADAR, 1986; MWANGI e REMBOLD, 1988) as pesquisas eram feitas apenas com extratos. Estas substâncias, algumas delas com CL50 < 100 µg/mL, pertencem a diversas classes.

Devido à existência de populações de *A. aegypti* resistentes aos inseticidas convencionais empregados na atualidade e aos insucessos no controle desses vetores, a busca por alternativas efetivas e baixa toxicidade para o meio ambiente no combate ao mosquito adulto e/ou à larva, inclui a investigação de extratos vegetais e substâncias naturais com atividade larvicida (HEMINGWAY e RANSON, 2000).

4 METODOLOGIA

4.1 Coleta e preparo do material vegetal

As folhas de *O. pulchella* Mart. foram coletadas no mês de abril de 2010, no município de Pontal do Paraná, litoral do Paraná, 25º39'54"S, 48º27'13"W, altitude 3 m. A determinação botânica foi realizada pelo biólogo Osmar do Santos Ribas, no Museu Botânico Municipal de Curitiba, Estado do Paraná. O voucher foi registrado sob o nº 356741.

4.2 Estudos fitoquímicos

Na investigação fitoquímica, as folhas coletadas foram submetidas à seleção visual, excluindo-se material orgânico estranho e partes não sadias, atacadas por insetos, fungos ou oxidadas. Em seguida estas foram fragmentadas e secas em temperatura ambiente e à sombra. Após a secagem o material foi armazenado em recipiente apropriado e protegido da luz e umidade.

4.2.1 Ensaio sistemático de análise em fitoquímica

Neste ensaio foram avaliadas as características qualitativas dos principais grupos químicos que constituem os princípios ativos das drogas vegetais, utilizando em cada caso reações de coloração e/ou precipitação.

O ensaio sistemático de análise em fitoquímica foi realizado de acordo com MOREIRA (1979) pelo método de maceração, extrato aquoso a 20% (vinte por cento) e extrato hidroalcoólico a 20% (vinte por cento) do vegetal em estudo. A partir desses extratos foi determinado o resíduo seco e a presença dos seguintes grupos químicos:

4.2.1.1. Preparo do extrato hidroalcoólico a 20%

A extração foi realizada por maceração de 40 g das folhas de *Ocotea pulchella* Mart. secas e trituradas, em 200 mL de álcool etílico a 70% (setenta por cento) em banho-maria a 70º C, por 90 minutos. Após 24 (vinte e quatro) horas, o

macerado foi filtrado por meio de papel de filtro e o volume completado com o mesmo solvente até 200 mL. O extrato foi mantido sob refrigeração até a realização dos ensaios fitoquímicos.

4.2.1.2. Preparo do extrato aquoso a 20%

Para o preparo do extrato aquoso, foram adicionados 40 g de folhas de *O. pulchella* seco e triturado em 200 mL de água destilada, sendo posteriormente levadas em banho-maria a 70°C, por 90 minutos para extração dos compostos. Após 24 (vinte e quatro) horas o macerado foi filtrado por meio de papel de filtro e o volume completado com água destilada até 200 mL e mantido sob refrigeração até a realização dos ensaios fitoquímicos.

TABELA 1 – GRUPOS QUÍMICOS PODEM SER ENCONTRADOS PELO ENSAIO SISTEMÁTICO

Extrato Hidroalcoolico	Glicosídeos flavônicos	Extrato Aquoso	Glicosídeos Antociânicos
	Alcaloides		Saponinas
	Esteróides e/ou triterpenos		Glicosídeos Cianogênicos
	Aminogrupos		Taninos Condensados e Hidrolisáveis
	Glicosídeos Cumarínicos		Aminogrupos
	Glicosídeos Antraquinônicos		Flavonoides

4.2.1.3 Pesquisa de alcaloides

Os alcaloides são compostos de caráter básico e sua solubilidade em diferentes reagentes modifica em função do pH. Os alcaloides na forma básica são solúveis em solventes orgânicos e insolúveis em solventes aquosos; na forma de sal, são solúveis em solventes aquosos e insolúveis em solventes orgânicos (DIAS, 2005).

Esta pesquisa fundamenta-se na capacidade que os alcaloides possuem, em estado de sal, de combinar-se com iodo e metais pesados como bismuto, mercúrio e tungstênio e formarem precipitados (DIAS, 2005).

Dessa forma, a determinação qualitativa de alcaloides foi feita com a utilização de reativos considerados gerais para alcaloides: solução de iodoiodeto de potássio (Reativo de Wagner), mercúrio tetraiodeto de potássio (Reativo de Mayer), tetraiodeto bismuto de potássio (Reativo de Dragendorff), solução de ácido pícrico (Reativo de Hager), ácido sílico túngico (Reativo de Bertrand), p-dimetilamino benzaldeído (Reativo de Ehrlich) e Reativo de Vitali- Morin (promove a nitração de alcaloides).

Uma alíquota de 50 mL de cada fração obtida pelo processo descrito anteriormente foi evaporada em banho-maria a 50ºC. O resíduo foi dissolvido em 1 mL de etanol e acrescido de 20 mL de HCl 1%. Foram utilizados 5 tubos de ensaio para cada amostra testada, foram transferidos 1mL do respectivo extrato clorídrico em cada tubo, para a pesquisa de alcaloides com os reativos citados (2 gotas para cada reativo). Considera-se positiva a presença de alcaloides na amostra com as seguintes visualizações para os reativos:

- Mayer: formação de precipitado branco ou leve turvação branca.
- Dragendorff: formação de precipitado de coloração tijolo.
- Bouchardat:: formação de precipitado de coloração alaranjada.
- Bertrand: formação de precipitado branco ou leve turvação branca.

Para cada amostra, foi utilizado um tubo somente com o extrato clorídrico, servindo como controle negativo.

4.2.1.4. Pesquisa de ácidos orgânicos

O excedente da solução etérea da pesquisa de alcaloides foi levado à secura e redissolvido em 5 mL de água destilada. O pH ácido desta solução indica a presença de ácidos orgânicos.

4.2.1.5. Pesquisa de fenóis

Foi utilizado 2 mL da solução obtida na pesquisa de ácidos orgânicos, adicionando-se 2 gotas de solução aquosa de cloreto férrico 1%. O desenvolvimento de coloração confirma a presença de fenóis.

4.2.1.6 Pesquisa de Flavonoides

Flavonoides são compostos cuja estrutura se baseia num esqueleto carbônico C_6-C_3-C_6, com um anel cromano ostentando um segundo anel aromático na posição 2. As principais categorias estruturais gerais são flavonas, flavanonas, flavonois, antocianidinas e isoflavonas. Em alguns casos, o anel heterocíclico de seis membros é substituído por um anel de cinco membros (auronas) ou aparece em uma forma isomérica de cadeia aberta (chalconas). Os flavonoides também são encontrados na forma de derivados glicosilados, metilados, acilados, prenilados ou sulfatados (ROBBERS *et al.*, 1997). Esta pesquisa baseou-se na modificação da estrutura dos flavonoides em presença de ácido.

4.2.1.6.1 Leucoantocianidinas

As leucoantocianidinas são consideradas flavonoides monoméricos 3,4- dióis ou raramente 4-óis. Esta pesquisa foi explicada com a reação de redução da leucoantocianidina (de coloração amarela) em antocianidina (de coloração vermelha) em presença de ácido clorídrico (DIAS, 2005).

Foram levados à secura 10 mL das frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e hidroalcoólica, em banho-maria (50°C), retomados em 5 mL de etanol e adicionadas 5 gotas de HCl concentrado. Levou-se à ebulição. A reação foi positiva com o desenvolvimento de coloração vermelha.

4.2.1.6.2 Glicosídeos flavônicos

Foi levada à secura em banho-maria (50ºC) 10 mL das frações hexano, clorofórmio e acetato de etila, foi adicionado 5mL de etanol e transferiu-se para tubos de ensaio. A fração hidroalcoólica não foi levada à secura, apenas transferida diretamente (5 mL) para um tubo de ensaio. A cada tubo de ensaio foram adicionados 200mg de limalha de ferro e HCl fumegante (lentamente).

Reação foi considerada positiva quando ocorreu a coloração vermelho a vermelho sangue.

4.2.1.6.3 Flavonois

A presença de flavonois foi verificada por meio do teste do oxalo-bórico ou reação de Taubock. A reação pode ser explicada pela formação de quelatos, produzindo um deslocamento batocrômico na banda I dos derivados do ácido borínico, que são compostos obtidos do ácido bórico, com substituições na molécula por dois radicais orgânicos. A reação oxalo-bórica, em particular dos flavonoides (flavonois), determina o aparecimento de fluorescência amarelo-esverdeada, enquanto as flavanonas e isoflavonas não acusam esta propriedade e os compostos antociânicos coram-se, mas não produzem fluorescência (MOREIRA, 1979).

Foram transferidos 10 mL de cada fração para um bécker e levados à secura. Foram adicionadas 5 gotas de acetona e 30mg da mistura ácido bórico e ácido oxálico, na proporção 1:1, levando novamente à secura. Ao resíduo foi adicionado 5 mL de éter etílico. A visualização foi realizada com observação no ultravioleta, em tubo de ensaio.

4.2.1.6.4 Dihidroflavonoides

Em cápsulas de porcelana, foram adicionados 10 mL de cada fração e levados à secura em banho-maria. Em seguida, foi levado ao chapa de aquecimento, adicionando cristais de acetato de sódio; 0,1mL de anidrido acético e 0,1mL de HCl concentrado. A reação foi considerada positiva com o desenvolvimento de coloração roxa.

4.2.1.6.5 Dihidroflavonois

As frações dissolvidas em 5 mL de etanol (conforme descrito anteriormente) foram acrescidas de uma pastilha de zinco e HCl fumegante (lentamente), mantendo o recipiente em banho de gelo (reação exotérmica) e dentro da capela. A reação positiva foi observada com o desenvolvimento de coloração vermelho a vermelho sangue.

4.2.1.7 Pesquisa de cumarinas

Cumarinas são lactonas derivadas dos ácidos- hidrocinâmicos que sofrem *orto*-hidroxilação e depois fechamento do anel situado entre o grupo *orto*-hidroxila e o grupo carboxila de cadeia lateral, seguido de isomerização *trans* para *cis* da ligação dupla de cadeia lateral. Quando isoladas, aparecem na forma de cristais prismáticos, incolores, com odor e sabor amargo (ROBBERS *et al.*, 1997).

As cumarinas são derivadas da 5,6-benzo-2-pirona(-cromona). Originam-se do ácido *trans*-cinâmico que, por oxidação, resulta no ácido cumárico, cuja hidroxila fenólica condensa com uma unidade de glicose. Esse composto isomeriza no seu correspondente *cis*, o qual, por ciclização, forma a cumarina. A prenilação nas posições C-6 e C-8 do anel benzênico de uma 7 hidroxi-cumarina conduz à formação de pirano ou furanocumarinas (SIMÕES *et al.,* 2000).

O teste para a avaliação da presença de cumarinas foi baseado na conversão do ácido o-hidroxicinâmico em sal alcalino fluorescente, e deve-se à propriedade das cumarinas de se dissolverem em álcali cáustica, com clivagem do anel pirrólico e formação do ácido o-hidroxicinâmico ou sais de seus ânions. Sem irradiação da luz ultravioleta, nenhuma fluorescência é exibida; no entanto, quando irradiamos com luz ultravioleta, a forma *cis* da molécula do sal migra para a forma *trans*, exibindo fluorescência com coloração azul ou verde amarelada dentro de poucos minutos, aumentando até o máximo. Comparações efetuadas entre a forma *cis* e *trans* do ânion cumarínico demonstraram que apenas na forma *trans* o hidrogênio do grupo fenólico está localizado para possibilitar sua quelação (anel de seis membros), visto que a insaturação não é bloqueada pelo grupo carboxila, havendo possibilidade da

ligação quelato relacionar-se com a fluorescência. O foto-efeito também aparece em soluções alcalinas dos derivados cumarínicos que não possuem hidroxila livre ligada ao grupo benzênico, havendo relação entre os substituintes e o grau de fluorescência.

Derivados cumarínicos que tenham grupos OH livres ligados ao anel benzênico mostram fluorescência azul intensa no estado sólido e em soluções alcalinas, não ocorrendo foto-efeito em soluções alcalinas para esses compostos. Dessa forma, torna-se difícil estabelecer um teste específico para estas cumarinas, pois é difícil observar qualquer fluorescência produzida por irradiação, já que elas possuem fluorescência própria (NAKASHIMA, 1993).

Para essa pesquisa foi adicionado, ao extrato hidroalcoólico HCl 2N, até pH 1 e 5mL de HCl concentrado. A mistura foi resfriada e transferida para um funil de separação para extração com éter etílico (2 X 10mL). As duas frações obtidas foram reunidas e concentradas em banho-maria até volume de 5 mL. As frações hexano, clorofórmio e acetato de etila foram levadas ao banho-maria 50ºC (30 mL) até secura e recuperadas em 5mL de éter etílico.

Para tubos de ensaio, foi transferido 3mL de cada extrato etéreo e foi adicionado 2mL de NaOH 2N. Os tubos de ensaio foram levados ao UV (365nm), por 15 minutos.

Para reação positiva, observa-se no ultravioleta o aparecimento de fluorescência azul ou verde amarelada.

Paralelamente, com o restante dos extratos etéreos, foram marcados, em um papel de filtro, três pontos com manchas de aproximadamente 1cm de diâmetro. As manchas 1 e 2 serão tratadas com NaOH 1N e, sobre a mancha 1, foi colocada ainda uma moeda e levadas à câmara de ultravioleta a 365nm, novamente deixando em exposição por 15 minutos. A reação foi tida como positiva com o desenvolvimento de fluorescência, com coloração azul ou verde amarelada na mancha 2.

4.2.1.8 Pesquisa de antraquinonas

A observação da presença de antraquinonas é devida à ionização das hidroxilas fenólicas destes compostos, por meio da Reação de Borntraeger.

Foram transferidos, para cinco balões, 30mL de cada fração, e adicionados 5mL de solução aquosa de H_2SO_4 a 10%. A mistura foi deixada em refluxo por uma hora, e posteriormente filtrada, foi adicionado, em seguida, 30mL de H_2O. Foi transferido para um funil de separação, para extração com éter (2 X 10ml). As frações obtidas foram reunidas e concentradas em banho-maria, até um volume de 5mL, e colocadas em um tubo de ensaio, foi adicionado 5mL de NH_4OH (Reação de Borntraeger). A reação foi considerada positiva com observação de coloração vermelha.

4.2.1.9 Pesquisa de esteróides e triterpenos

A reação de Liberman-Bouchard (anidrido acético – ácido sulfúrico concentrado) é empregada para a verificação de esteróides e triterpenos; os primeiros desenvolvem coloração mutável com o tempo, enquanto que os últimos desenvolvem coloração estável (SIMÕES *et al*., 2000).

A reação de Keller-Kelliani é utilizada para a verificação da presença de glicosídeos cardiotônicos, que é determinada pela caracterização do núcleo esteroidal destes, além de outras formas, que detectam a presença de uma lactona insaturada em C-17, característica dos desoxi-açúcares (SIMÕES, 2000). A coloração azul ou verde na fase acética indica reação positiva para desoxi-açúcar (MATOS; MATOS, 1989).

Foram evaporados 30mL de cada fração, até a secura e, com o auxílio de um bastão, os resíduos foram redissolvidos em 5mL de clorofórmio e filtrados em algodão. De cada uma das amostras assim preparadas foi pipetado 0,1; 0,5 e 1,0mL, que foram transferidos para três tubos de ensaio, e o volume completado para 2 mL com clorofórmio.

4.2.1.9.1 Reação de Liberman-Bouchard

Para essa reação, foi adicionado aos tubos de ensaio 1mL de anidrido acético e lentamente 2mL de H_2SO_4 concentrado. A coloração indica:

- rósea ou azul: presença de função carbonila na posição 3 e duplo enlace nas posições 5 e 6 ou 7 e 8.
- Verde: função hidroxila em 3 e dupla ligação entre 5 e 6 ou 7 e 8.
- Amarela: grupamento metila no carbono 14.

4.2.1.9.2 Reação de Keller Kelliani

Foram levados à secura 2 mL dos extratos clorofórmicos preparados anteriormente. Os resíduos foram dissolvidos com 2 mL de ácido acético glacial e 0,2 mL de solução aquosa de cloreto férrico 1%. As misturas foram então transferidas para tubos de ensaio contendo 2 mL de H_2SO_4. O desenvolvimento de coloração azul ou verde na zona de contato entre as duas fases indica a presença de desoxiaçúcares, sendo:
- azul: esteróides
- verde: triterpenos

4.2.1.10 Pesquisa de glicosídeos antociânicos

As antocianinas são pigmentos hidrossolúveis encontrados principalmente nas flores e frutos, com colorações que vão do roxo ao violeta e azul. Encontram-se na forma de sais, e possuem caráter anfótero, ou seja, com ácidos formam sais de oxônio corados de vermelho; com bases reagem através das hidroxilas fenólicas livres e adquirem a coloração azul, devida à estrutura quinóide formada. Dessa forma, as colorações dos compostos antociânicos variam com o pH.

Para essa pesquisa foram realizados dois testes, descritos a seguir.

4.2.1.10.1 Primeiro teste

Foram separadas três porções de 5 mL do extrato aquoso, em três tubos de ensaio previamente marcados, sendo procedido da seguinte forma:

Tubo 1: acidificado com HCl 1% (até pH aproximadamente 4) – reação positiva observada para tons avermelhados.
Tubo 2: alcalinizado com NaOH (pH aproximadamente 10) - tons azulados.
Tubo 3: neutralizar a pH 7 - tons violáceos.

4.2.1.10.2 Segundo teste

Foi transferido, para um funil de separação, 10 mL do extrato aquoso, e procedido à extração com álcool butílico, foram obtidas duas frações de 10 mL. As frações foram reunidas em uma cápsula de porcelana e concentradas até 5 mL. Foi adicionado 5 gotas de HCl concentrado, e levado para aquecimento até ebulição. A coloração vermelha indica formação de antocianidina, devido ao efeito batocrômico.

4.2.1.11 Pesquisa de heterosídeos saponínicos

As saponinas apresentam estruturas com assimetria hidrófilo-hidrofóbica, fazendo com que haja redução da tensão superficial dos compostos em solução aquosa, com conseqüente formação de espuma mediante agitação, caracterizando as propriedades emulsivas destes compostos (ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1997).

Foi utilizado os três tubos de ensaio preparados para o teste citado anteriormente (heterosídeos antociânicos), os quais foram agitados energicamente, durante cinco minutos, e foi medido a altura da espuma formada. Em seguida, foram deixados em repouso por 30 minutos e a presença de saponinas foi determinada pela observação de espuma persistente, com altura superior a 1cm.

4.2.1.12 Pesquisa de heterosídeos cianogênicos

Os heterosídeos cianogenéticos produzem ácido cianídrico nas plantas e são acompanhados por enzimas (-glicosidases) responsáveis pela catálise da hidrólise (ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1997).

A presença de heterosídeos cianogênicos na amostra é observada pela formação de isopurpurato de sódio, através da reação descrita abaixo.

A um tubo de ensaio, foram adicionados 5 mL do extrato aquoso, de modo a não umedecer as paredes do tubo, e 1 mL de H_2SO_4 10% ou 1N. Foi suspendido uma tira de papel picro-sódico, com o auxílio de uma rolha de cortiça, e mantêve-se em banho-maria (60^oC) por 30 minutos. O resultado positivo para heterosídeos cianogênicos foi observado pelo desenvolvimento de coloração marrom a vermelho no papel picro-sódico.

O papel picro-sódico foi preparado embebendo tiras de papel de filtro com 1cm de largura em solução de ácido pícrico 1% e secando-as ao abrigo da luz. As tiras pícricas secas foram embebidas em solução de carbonato de sódio 10%, secas e armazenadas em frasco âmbar.

4.2.1.13. Pesquisa de gomas, taninos e mucilagens

Para duas porções de 5 mL do extrato aquoso foi adicionado 5 gotas de solução de acetato básico e acetato neutro de chumbo 10%. A formação de precipitado foi indicativo da presença de gomas, taninos e mucilagens.

4.2.1.14 Pesquisa de taninos

Os taninos podem ser caracterizados por reações de coloração ou de precipitação. Como a presença de álcool pode interferir, este deve ser removido das amostras para a determinação. As reações tradicionais de precipitação com gelatina, sais de alcaloides e metais pesados são ainda utilizadas para a detecção de compostos dessa classe. Taninos condensados e hidrolisáveis podem ser diferenciados através da reação de Stiasny (HCl concentrado e formol), ocorrendo precipitação destes últimos; no sobrenadante pode-se detectar a presença de taninos hidrolisáveis através, por exemplo, da reação com cloreto férrico, com desenvolvimento de coloração azul (SIMÕES *et al*., 2000).

Foram transferido 1 mL do extrato aquoso para cinco tubos de ensaio e adicionados os seguintes reagentes:

Tubo 1: 3 gotas de cloreto férrico. Coloração azul ou verde, com formação ou não de precipitado – resultado positivo para taninos.

Tubo 2: 1 a 3 gotas de sulfato amoniacal. Coloração azul ou verde – resultado positivo.
Tubo 3: 1 a 3 gotas de cloridrato de emetina. Formação de precipitado – resultado positivo.
Tubo 4: 5ml de ácido acético (gota a gota) e 5mL de acetato de chumbo.
Presença de precipitado – resultado positivo.
Tubo 5: 3 gotas de dicromato de potássio 1%. Desenvolvimento de precipitado – resultado positivo.

4.2.1.14.1 Diferenciação entre taninos hidrolisáveis e condensáveis

Uma alíquota de 20 mL do extrato aquoso foi transferida para um balão, e adicionados 6mL de formaldeído e 4ml de HCl 37% fumegante. Permaneceu em refluxo por uma hora, acoplado a um condensador. Foi filtrado e lavado o resíduo com etanol 50%, para retirar o excesso de formaldeído e HCl, e sobre o resíduo foi adicionado KOH 5%, com desenvolvimento de coloração. Dividiu-se, então, o material em duas porções.
1ª porção: adição de gotas de solução aquosa de $Ca(OH)_2$ 5%. O desenvolvimento de coloração indica presença de taninos condensados.
2ª porção: adição de excesso de acetato de sódio e gotas de solução aquosa de $FeCl_3$ a 1%. Desenvolvimento de coloração azul indica reação positiva para taninos hidrolisáveis.

4.2.1.15 Pesquisa de aminogrupos

Os aminogrupos foram detectados por nebulização com o reativo de Ninhidrina e aquecimento. O reativo de Ninhidrina detecta os compostos em cuja estrutura haja presença de nitrogênio, principalmente aminoácidos. Foram concentrados 5 mL do extrato aquoso até aproximadamente 1mL (a 50º C). Em dois pontos previamente determinados, em uma cromatoplaca de CCD, foram

depositadas 3 gotas do extrato concentrado e, após seco, colocado uma gota do reativo de Ninhidrina sobre uma das manchas, aquecendo em estufa durante 15 minutos (90-100º C). O desenvolvimento de coloração azul-violácea indica a presença de aminogrupo. Exceção: prolina e hidroxiprolina – cor amarela.

4.2.1.16. Pesquisa de ácidos voláteis

Foi acidificado 10 mL do extrato aquoso com ácido sulfúrico 1N e fervido em um tubo de ensaio em banho-maria. Com papel indicativo de pH, mediu-se a acidez dos vapores. A coloração ácida indica a presença de ácidos voláteis.

4.2.1.17 Pesquisa de ácidos fixos

A reação de caracterização de ácidos fixos se dá através do reativo de Nessler, que identifica a amônia associada em forma de sal amoniacal. Este reativo contém amônia, e a visualização foi indicada pela formação de um sal amoniacal na presença de ácidos fixos. Os ácidos fixos foram identificados separadamente dos ácidos voláteis porque durante o processo é realizado tratamento com ácido sulfúrico, e posterior evaporação em banho-maria, fazendo com que estes volatilizem.

Em um balão, foram adicionados 20 mL do extrato aquoso e 2 mL de NaOH 1N, que permaneceram em refluxo por 30 minutos. Após resfriamento, foram acidificado com H_2SO_4 2N procedeu-se à extração com éter etílico (3 porções de 10mL). Os extratos etéreos foram reunidos e tratados com carvão ativo, sendo em seguida filtrados e evaporados em banho-maria (50º C) até a secura. O resíduo foi deixado em estufa por 10 minutos, resfriado e adicionado 5 mL de NH_4OH 1N. Em uma tira de papel de filtro foram concentradas duas manchas (3 gotas em cada mancha) com o resíduo amoniacal, deixando na estufa até secar, e sobre uma das manchas foi gotejado o reativo de Nessler. A coloração marrom nessa mancha indica a presença de ácidos fixos. Os ácidos fórmico, propiônico e aminoacético não formam manchas, pois não fixam a amônia, apresentando reação negativa.

4.2.3 Obtenção do extrato em aparelho de Soxhlet modificado

As amostras de planta seca, estabilizada e moída foram pesadas e extraídas em aparelho de Soxhlet modificado segundo CARVALHO, (2001). Ao aparelho foram conectados um condensador de bolas e um balão de fundo chato com capacidade de 3 L contendo pérolas de vidro. A este sistema foi adicionado álcool etílico 96°GL até aproximadamente 1500 mL. Todo o sistema foi levado ao aquecimento em manta aquecedora e deixado em refluxo por 6 horas.(CARVALHO, 2001).

Para a utilização deste equipamento, foi procedido da seguinte forma: a placa porosa foi cuidadosamente posicionada sobre os suportes de vidro do aparelho e sobre ela será colocado algodão para conter o material vegetal. Sobre este foi colocado cerca de 2 kg de material vegetal seco, estabilizado e fragmentado e 1000 mL de etanol 96°GL para maceração. O líquido extrator contido no balão era aquecido e evaporava, condensando a 60°C no condensador de bolas. Desta maneira, o solvente condensado atravessou a massa vegetal, permitindo a extração.

No momento em que o menisco do extrato no canal lateral do Soxhlet atingisse o ponto de refluxo, o extrato foi descarregado no balão por sifonamento e o processo foi repetido por inúmeras vezes até se completarem as 6 horas. Este procedimento previne a degradação térmica de substâncias no balão, uma vez que a quantidade de líquido extrator será constante no sistema e foi capaz de solvatar os compostos presentes.

As porções foram reunidas e concentradas em evaporador rotativo até 300 mL, formando assim o extrato bruto usado para a obtenção das frações por partição líquido-líquido com solventes de diferentes polaridades, na seguinte ordem: hexano, clorofórmio e acetato de etila. Todos os solventes usados foram de padrões analíticos.

4.2.4 Obtenção das frações

A partição líquido-líquido foi realizada na ordem crescente de polaridade (do solvente menos polar para o mais polar) utilizando aparelho de Soxhlet modificado, segundo CARVALHO, 2001 (Figura 17). O aparelho foi conectado a um

condensador de bolas e a um balão de fundo chato de capacidade para 150 mL, com pérolas de vidro. Todo o sistema foi levado ao aquecimento em chapa aquecedora e deixado em refluxo contínuo por 6 horas.

Para a extração com solventes mais densos que o extrato bruto foi necessário utilizar cartucho de vidro e funil adaptado até a base do cartucho em aparelho de Soxhlet convencional. Neste caso, o solvente contido no balão foi aquecido e evaporado e, após condensação, goteja dentro do funil, passando por dentro do cartucho. Assim, o extrato particionado de baixo para cima, promove o arraste de substâncias por afinidade. Duas aberturas na parte superior do cartucho permitem a saída do solvente (depois da extração), que foi preenchido o espaço entre o cartucho e as paredes do Soxhlet até que o menisco alcance o ponto de refluxo do canal lateral do aparelho e o solvente com as substâncias extraídas sejam descarregadas sobre o conteúdo do balão.

Dessa forma, todo o extrato foi concentrado no balão, visto que o líquido extrator evapora puro para ser condensado e repetido a extração. Cada processo de partição dura 6 horas. Em casos de solventes mais densos, o aparelho de Soxhlet é modificado de modo a impedir o refluxo do solvente para o balão. A dilatação do canal lateral do Soxhlet é retirada e o canal é alargado na porção superior. Desta forma, quando o menisco atinge a curva do canal, não há refluxo, mas gotejamento constante. Nas duas situações, a partição se dá lentamente, com o máximo de contato possível.

Todas as frações foram levadas à secura em evaporador rotativo a 40°C e 600 mm Hg e os resíduos solubilizados em 100 mL de metanol tendo em vista sua grande capacidade de solvatação e por permitir a precipitação de diversas substâncias. Foi realizado o resíduo seco para cada fração.

4.2.5 Obtenção do resíduo seco

Os resíduos secos das frações e do extrato bruto foram obtidos da seguinte forma: 10 mL de cada fração e do extrato bruto foram pipetados em pipeta volumétrica e transferidos para placas de Petri previamente taradas. A placa foi deixada em estufa a 105°C até peso constante (aproximadamente 1,5 horas). A

diferença de massa entre a placa cheia e vazia fornece a quantidade de resíduo em 10 mL de fração.

4.2.6 Isolamento das substâncias

4.2.6.1 Cromatografia líquida em coluna

O processamento das frações hexânica, clorofórmica, acetato de etila e metanólica foram feito pela redissolução de cada fração concentrada em metanol e incorporada a 6 g de Sílica-gel 60 - Merck®- Art. 7734 – com tamanho de partícula 0,063-0,2mm, 70-230 mesh (cerca de uma vez o seu peso seco) para a formação da pastilha de sílica. Essa pastilha foi submetida à cromatografia líquida em coluna de 30cm de altura por 3 cm de diâmetro, empacotada com 30 g de Sílica-gel 60 (0,063-0,200mm) Merck®. A amostra foi eluída em sistema de solventes com gradiente de polaridade crescente, sendo utilizados hexano, acetato de etila e metanol. O controle de eluição foi feito com lâmpada de luz UV a 360 nm. As características das frações recolhidas foram observadas por cromatografia em camada delgada, utilizando-se cromatoplacas de Sílica-gel 60 F254 Merck® e visualizadas com lâmpada UV nos comprimentos de onda de 360 nm. As frações semelhantes foram reunidas redissolvendo-as em clorofórmio e metanol.

4.2.6.2 Cromatografia em camada delgada

Para as análises por cromatografia em camada delgada foram utilizadas placas de Sílica-gel 60 F_{254} Merck® e a visualização em lâmpada UV nos comprimentos de onda de 360 nm.

As fases móveis foram testadas para melhor visualização dos compostos, como flavonoides, cumarinas e esteróides. O principal reativo utilizado na revelação de flavonoides é o Reativo de NEU (2-aminoetilbutirato).

4.2.7 Elucidação Estrutural

4.2.7.1 Espectroscopia de ressonância nuclear magnética de ^{1}H e ^{13}C

Os espectros de RMN ^{1}H e RMN ^{13}C unidimensionais e bidimensionais foram obtidos em espectrômetro Brucker, modelo Avance DRX-500, pertencente ao Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear da Universidade Federal do Ceará (CENAUREMN-UFC), operando na frequência do hidrogênio a 500 MHz, e na frequência do carbono a 125 MHz, respectivamente.

4.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTILARVICIDA FRENTE AO *AEDES AEGYPTI*

Os ovos de *Aedes aegypti* da linhagem Rockfeller foram fornecidos pelo IBEX/Entomologia/LAFICAVE/IOC/FIOCRUZ - Rio de Janeiro-RJ; sendo utilizado como padrão de susceptibilidade inseticida para a espécie *Aedes aegypti* (HARTBERG e CRAIG-Jr, 1970). Para a eclosão dos ovos, estes foram colocados em bandeja de plástico e adicionados 500 mL de água mineral, e em seguida levada para estufa BOD com temperatura (T = 27 ± 2 ºC), umidade relativa (UR = 80 ±5%).

Nessas condições os ovos embrionados deram origem às larvas do mosquito, que foram utilizadas no presente estudo. As amostras a serem testadas (extratos brutos, frações e substâncias puras) foram pesadas, dissolvidas em dimetilsulfóxido (DMSO) a 0,5% sob agitação em ultra-som e, posteriormente foi acrescentado água (volume de 20 mL) isenta de cloro, e distribuídos em 5 mL por copo plástico, à temperatura ambiente, sendo utilizados 3 concentrações (1000, 500 e 250), com 4 repetições. A dieta das larvas consistiu de ração de peixe (aldon basic, MEP 200 complex) do período de eclosão até o 3° estágio larval. Solução aquosa de DMSO 0,5% foi utilizada como controle negativo e o herbicida Temephós pestanal (Fluka) – 31526 como controle positivo.

4.3.1 Efeito larvicida

Para detecção da atividade larvicida, cerca de 15 larvas nos estágios 1, 2, 3 e 3 estágio tardio, foram transferidas para os copos contendo as soluções, e a mortalidade foi verificada após 24 horas de exposição. Larvas moribundas, incapazes de atingir a superfície da água quando tocadas, foram consideradas como mortas (WHO 1981).

Para constatar o período de atividade larvicida e taxa de sobrevivência, 15 larvas nos estágios 1, 2, 3 e 3 estágio, foram submetidas aos extratos e frações, e a mortalidade foi verificada após 1, 2, 4, 6, 8, 12 e 24 horas de exposição. Larvas moribundas, incapazes de atingir a superfície da água quando tocadas foram consideradas como mortas (WHO, 1981). As larvas sobreviventes foram anotadas para avaliação da taxa de sobrevivência e em seguida descartadas. O mesmo procedimento foi realizado com os controles positivo e negativo. Os extratos que causaram mortalidade nas primeiras 6 horas, foram selecionados para o teste de reversibilidade. Para este teste, 30 larvas nos estágios já citados foram expostas aos extratos durante 5 horas e em seguida, 15 foram retiradas das soluções e lavadas duas vezes com água mineral. Em seguida, foram transferidas para copos contendo 5 ml de água mineral durante 24 horas.

Os valores de concentração letal CL50, foram determinados pela análise Probit GW-Basic (Finney, 1971). Para detectar diferenças nos tratamentos utilizou-se o teste Tukey e quando se detectou diferenças aplicou- se o teste de Comparações Múltiplas, através do programa STATISTICA 7.0, com nível de significância $P < 0,05$.

4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA

4.4.1 Preparo do teste

As placas de Petri (9,0 cm de diâmetro) contendo papel filtro Whatman nº. 1,0, previamente autoclavado a 120ºC, por 20 minutos, receberam 5,0 mL da solução das amostras (extratos e frações), preparadas nas concentrações de 250 µg/mL, 500 µg/mL e 1.000 µg/mL. Em seguida, foram semeados aleatoriamente sobre cada disco de papel filtro, 50 diásporos da espécie alvo (alface, cebola), distribuídos aleatoriamente, com quatro repetições para cada solução, conforme Brasil (2009). Como controle, procedimento similar foi utilizado, porém com ausência dos extratos e frações.

As placas de Petri contendo os diásporos foram levadas a uma câmara de germinação (BOD), com condições de luz (160 W), umidade relativa (± 80%) e temperatura constantes, adequadas a cada espécie alvo, conforme Brasil (2009) (alface, 25ºC com luz interna constante; e cebola 15ºC, com foto período de 12h; ± 2ºC).

4.4.2 Bioensaios de germinação

Para os bioensaios de germinação, foi aplicada a metodologia de Macias *et al*., (2000). A contagem para avaliar a germinação foi realizada diariamente, por 4 dias, (sendo que para alface a cada 12 horas), tendo como critério a protrusão radicular com no mínimo 2,0 mm de comprimento. O experimento foi considerado concluído quando a germinação foi nula por três dias consecutivos.

4.4.3 Bioensaios de crescimento

Para os bioensaios de crescimento utilizou-se a metodologia descrita por Barnes *et al*., (1987) e Macias *et al*., (2000). Após três dias da protrusão radicular, mediu-se o alongamento da raiz e do hipocótilo/coleóptilo (dez plântulas por placa) utilizando papel milimetrado. Posteriormente, essas plântulas foram levadas para secar em uma estufa a 60ºC até peso constante para a obtenção da massa seca.

4.4.3.1 Índice mitótico

A determinação do índice mitótico foi feita segundo Oliveira *et al*., (1996) Dois centímetros de três raízes primárias de cada repetição foram retirados da extremidade distal e em seguida foram colocadas em 5 mL de solução de Farmer (3:1 etanol; ácido acético glacial) durante 2 horas, a 25°C. Em seguida, foram transferidas para uma solução de álcool 70% e armazenadas a 8°C.

Para determinação do índice mitótico as pontas das raízes foram tratadas seqüencialmente com água destilada por 5 minutos; ácido clorídrico 1M por 30 minutos, a temperatura ambiente; água destilada por 5 minutos;orceína acética 2% por 30 minutos ou azul de toluidina por 2 minutos.

As pontas das raízes coradas foram cortadas sobre lâmina de microscópio (2 mm iniciais), colocando-se em seguida a lamínula e pressionando-se sob essa o papel filtro,para esmagamento do ápice e retirada do excesso de corante.

O material foi observado em microscópio óptico comum (1000 X), contando-se o número de células em cada fase mitótica (prófase, metáfase, anáfase e telófase). Foram avaliados 3 campos/lâmina.

O índice mitótico foi obtido através do calculo:

$$\text{Índice mitótico} = \frac{Número\ de\ células\ em\ mitose}{Número\ total\ de\ células} \times 100$$

4.4.3.2 Respiração de raízes

O teste de respiração das raízes foi realizado segundo Steponkus & Lanphear (1967). Foram cortadas 10 raízes a 1 cm a partir da coifa e transferidas para tubos de ensaio, foi adicionado em cada tubo 5mL de cloridrato de trifenil tetrazólio (TTC) 0,6% (p/v), 1mL de tampão fosfato de sódio (mono e dibasico) a 0,05M (pH 7,0), e então os tubos foram deixados a temperatura ambiente por 2 horas. Após esse período os tubos foram transferidos para banho-maria a 30ºC por 15 horas (ou em estufa a 40 ºC).

Ao final desse tempo, as soluções de TTC foram drenadas dos tubos de ensaio e as raízes lavadas uma vez com água destilada, que em seguida também foi drenada ao máximo. Posteriormente foi adicionado 7 mL de etanol 95% (v/v) e então os tubos foram levados para o banho-maria com água fervente (± 100ºC) durante 15 minutos, ou até secura. Após esse período as soluções foram resfriadas até temperatura ambiente e foi acrescentado em cada tubo 10mL de etanol 95% (v/v). Em seguida foi feita a leitura em espectrofotômetro a 530 nm. Como branco, foi utilizada uma solução de etanol 95% (v/v).

4.4.3.3 Fotossíntese

Para a avaliação deste parâmetro, foram cortadas 10 folhas primárias inteiras e transferidos para tubos de ensaio,contendo 5,0 mL de DMSO e então os tubos foram embrulhados em papel alumínio e deixados a temperatura ambiente por 24 horas.Quando então foram feitas as leituras da absorbância da clorofila a (645 nm) e b (663 nm)em espectrofotômetro.Foi usado como branco DMSO.

O teor de clorofila total foi calculado de acordo com a equação de Arnon (1949) & Lichtenthaler (1987).

$$Clorofila\ total = 20{,}2 \times AbsA + 8{,}02 \times AbsB$$

Onde: AbsA= absorvância da clorofila a;

AbsB = absorvância da clorofila b

4.4.4 Atividade enzimática

4.4.4.1 Preparo do extrato enzimático

O extrato enzimático foi preparado logo após a coleta das amostras segundo Marques e Xavier (1991). Para tanto, as plântulas restantes de cada tratamento (as quatro repetições juntas), foram maceradas em gral de porcelana com auxílio de nitrogênio líquido e levados ao freezer (-20°C). Foi adicionado 10mL de tampão fosfato de pótássio (0,2 M, pH 7), sendo as amostras então centrifugadas a 2500 rpm por 20 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi o extrato enzimático (Figura 8).

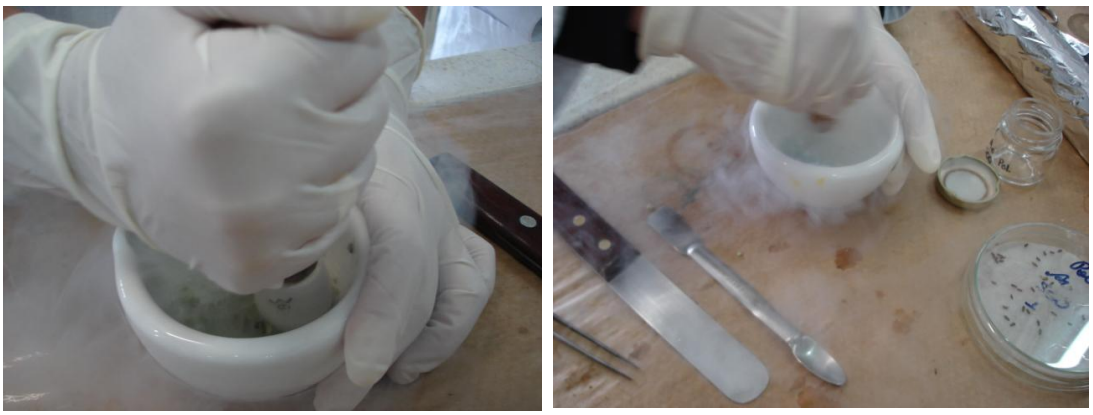


FIGURA 8 - PREPARO E ARMAZENAMENTO DO EXTRATO ENZIMÁTICO FONTE: O AUTOR (2011)

4.4.4.2 Atividade da peroxidase

A atividade da peroxidase foi determinada segundo PUTTER (1974). A 1 mL de extrato foi adicionado 1mL de tampão fosfato de potássio (0,2M; pH 7,0), deixando-se então em banho-maria, a 25°C, até a estabilização da temperatura. Em seguida, foi adicionado 500µL de guaiacol (0,5%) e 500µL de peróxido de hidrogênio

(0,08%), sendo imediatamente realizadas as leituras de absorbância a 470 nm. Como branco foi preparada uma solução com 2mL de tampão fosfato de potássio (0,2 M; pH 7,0), 500 µL de guaiacol (0,5%) e 500 µL de peróxido de hidrogênio (0,08%).

Os testes foram realizados em triplicata, e o resultado foi expresso em µmol de tetraguaiacol produzido (GRAY*et al*., 1996)

$$\mu mol\ de\ tetraguaiacol = mg\ de\ proteina^{-1}$$

4.4.4.3 Atividade da catalase

A atividade da catalase foi determinada segundo AEBI (1984). A 100 µL de extrato enzimático foi adicionado 3 mL de peróxido de hidrogênio (12,5 mM) em água destilada, a 30°C. Em seguida foram realizadas as leituras de absorbância a 240 nm. Como branco foi utilizado o peróxido de hidrogênio (12,5 mM). Os testes foram realizados em triplicata.

4.4.4.4 Atividade da superóxido dismutase

A atividade da seperóxido dismutase foi determinada segundo GUPTA *et al*. (1993). A 100µL de extrato enzimático foi adicionado 3mL de tampão fosfato de potássio (0,1 M; pH 7,0) contendo L-metionina (13mM), NBT (0,44 mM), e EDTA (100 nM) e riboflavina (1 mM). A reação foi iniciada após a colocação dos tubos de ensaios sob duas lâmpadas fluorescentes de 15W cada, a 25°C. Após 15 minutos de reação os tubos foram retirados da fonte luminosa, encerando-se assim a reação. A absorbância foi medida a 560 nm em espectrofotômetro. Como controle negativo foi usado a solução sem extrato enzimático e, sem que esta seja iluminada. E como branco foi usado tampão fosfato com EDTA. Os testes foram realizados em triplicata.

4.4.4.5 Detecção da α-amilase

A detecção da α-amilase foi realizada segundo a AOAC (1965). O extrato enzimático foi levado ao banho-maria a 70°C, 20 minutos. Depois foi adicionado 0,5 mL de tampão acetato (1,0 M, pH 7) e 1,0 mL de solução de amido a 1%, sendo

então incubado a 30°C durante 5 minutos. Após este período, foram adicionados 0,5 mL de solução de Lugol 50% e 1mL de água destilada. A leitura foi realizada em 620 nm em espectrofotômetro. Como controle negativo foi usado uma solução contendo: 3 mL de tampão acetato (1,0 M, pH 7), 3 mL de solução de amido a 1% e 1mL de lugol 50%. E como branco foi utilizada 2mL da solução de amido a 1% e 6 mL de tampão acetato (1,0 M, pH 7).

4.4.4.6 Polifenoloxidase

A polifenoloxidase foi determinada segundo Duangmal & Apenten (1999). Foi adicionado 1 mL de tampão fosfato de potássio (0,05 M, pH 6,0), e 0,5 mL de catecol 0,1 M, a 1 mL de extrato enzimático. A mistura foi incubada a 30º C por 30 minutos e transferida então para um banho de gelo. A esta foi adicionada 0,5 mL de ácido perclórico a 1,4% e então a mistura foi deixada em repouso por 10 minutos. Foi realizada a leitura a 395 nm em espectrofotômetro. Como branco foi usado 2 mL de tampão fosfato de potássio (0,05 M, pH 6,0), e 0,5 mL de catecol 0,1 M. Os testes foram realizados em triplicata.

4.4.4.7 Quantificação de proteínas totais pelo método de Bradford

A quantificação de proteínas totais foi realizada segundo BRADFORD (1976). A 300 µl de extrato enzimático foi adicionado 3 mL de água destilada e 50 µl de reagente de Bradford (100 mg de Croomassie Brilhant blue em 50 mL de Etanol 95%, e 100 mL de ácido fosfórico a 85%), sendo então a solução deixada em repouso por 5 minutos e realizada a leitura a 595 nm.Com branco foi usada 6 ml de água destilada e 100 µl de reagente de Bradford.

4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A atividade antioxidante foi determinada por três métodos para extrato etanólico (EE), fração hexano (FH), fração clorofórmio (FC), fração Acetato de Etila

(FA). O primeiro baseia-se na formação de um complexo fosfomolibdênico, o segundo é conhecido como poder redutor ou azul da prússia e o ultimo é caracterizado pela capacidade da amostra em reduzir o radical DPPH. Ambos utilizam leituras espectrofotométricas na região do UV para apresentar os resultados.

4.5.1 Avaliação da capacidade antioxidante pela formação de um complexo de fosfomolibdênio

Esse ensaio foi baseado na técnica descrita por PRIETO *et al*(1999); Arbos, 2004. A reação para formação do complexo requer o preparo de um reativo que consiste de uma solução com fosfato de sódio 0,1M (28 mL), molibdato de amônio 0,03M (12 mL) e ácido sulfúrico 3M (20 mL), sendo o volume completado com água para 100 mL. Esse reativo foi preparado no momento do uso. Soluções padrões de vitamina C e rutina, bem como a amostra de óleo a ser testada, devem estar na concentração de 200 µg/mL em metanol (BIANCO, 2003).

Em um tubo de ensaio, retirou-se uma alíquota de 0,3 mL da amostra, e adicionou-se 1 mL de reativo e 1,5 mL de água destilada. O mesmo foi feito para os padrões. Um branco foi constituído de 0,3 mL de etanol e 1 mL de reativo e 1,5 mL de água destilada. A análise foi realizada em triplicata, com os tubos hermeticamente fechados. Posteriormente, manteve-se a série de tubos em banho-maria a 95°C por 90 minutos. Após atingirem a temperatura ambiente, a leitura das absorbâncias (Abs) foi realizada em espectrofotômetro a 695 nm. Os resultados foram expressos em atividade antioxidante relativa (AAR%) do extrato e frações em relação à vitamina C e rutina, conforme a equação 1.

EQUAÇÃO 1 – CÁLCULO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE RELATIVA (AAR%) PELO MÉTODO FOSFOMOLIBDÊNICO

$$AAR\% = \frac{(Abs\ amostra - Abs\ branco) \times 100}{(Abs\ padrão - Abs\ branco)}$$

4.5.2 Método da reatividade contra o radical livre estável DPPH•

Para a avaliação da atividade antioxidante foi utilizado o método fotocolorimétrico do DPPH (2,2-difenil,1- picrihidrazila), segundo CHOI *et al, 2002*. Foi utilizado o extrato etanólico (EE), fração hexano (FH), fração clorofórmio (FC), fração acetato de etila (FA) em concentrações decrescentes em etanol (2,5mL). A 2,5mL de cada amostra, foi adicionado 1 mL da solução de DPPH 0,3mM em etanol. Após 30 minutos, foram feitas as leituras, em espectrofotômetro (Shimadzu- UV-1201) das absorbâncias a 518nm, onde o radical DPPH apresenta o máximo de absorção. Uma solução de DPPH (1mL; 0,3nM) em etanol (2,5mL) foi usada como controle negativo e uma preparação de ácido ascórbico como padrão (controle positivo), nas mesmas concentrações das amostras. O etanol foi usado para zerar o espectrofotômetro, tendo como brancos as soluções testes de cada amostra (sem adição do DPPH), visando minimizar a interferência de componentes das amostras na leitura. O ensaio foi realizado em triplicata e o cálculo da atividade antioxidante seguiu a equação:

$$\%\text{inibição} = 100 - \frac{(\text{Abs amostra} - \text{Abs branco} \times 100)}{\text{Abs controle}}$$

Onde: Abs amostra é a absorbância da fração e do extrato bruto; Abs Branco é a absorbância das frações e do extrato bruto sem adição do DPPH e Abs Controle é a absorbância da solução de DPPH em etanol.
Foi calculada a percentagem de inibição do radical DPPH e construído um gráfico de porcentagem de inibição *versus* a concentração do extrato e das frações.

4.5.2.1 Determinação do IC_{50} dos padrões, ácido ascórbico (AA) e rutina

Para a determinação do $IC_{50,}$ foi preparada uma solução de AA, nas concentrações de 0,078 a 5 µg/mL, e rutina, nas concentrações de 0,625 a 10 µg/mL em etanol, que foram submetidas ao mesmo procedimento experimental e de análise das amostras.

4.5.3 Avaliação do poder redutor

A avaliação do poder redutor foi realizada de acordo com Yildrim *et al.,* 2001*,* onde alíquotas do extrato etanólico (EE), fração hexano (FH), fração clorofórmio (FC), fração acetato de etila (FA), na concentração final de 200 µg/mL, foram diluídas em 1 mL de etanol absoluto e transferidas para tubo de ensaio contendo 2,5 mL de tampão fosfato 0,2 M pH 6,6 e 2,5 mL de ferrocianeto de potássio a 1% (m/v). A mistura foi incubada em banho-maria a 45ºC, por 20 min. Alíquotas de 2,5 mL de ácido tricloroacético a 10% (m/v) foram adicionadas ao tubo de ensaio, com posterior agitação. Alíquotas de 2,5 mL da mistura foram transferidas para outro tubo de ensaio, no qual foram adicionados 2,5 mL de água destilada e 0,5 mL de $FeCl_3$ a 0,1% (m/v), com posterior agitação. A leitura da absorbância foi realizada a 700 nm (Espectrofotômetro Shimadzu, UV-1601, Japão). A atividade redutora foi expressa como porcentagem de inibição em comparação ao BHT, usado como padrão.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Ensaio sistemático fitoquímico

A análise fitoquímica preliminar nos informa quais são os principais grupos de metabólitos que se encontram presentes na amostra. Esse conhecimento é utilizado como base para o isolamento de substâncias. Os resultados desta análise são apresentados nas Tabelas 2 e 3.

TABELA 2– ENSAIO SISTEMÁTICO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DAS FOLHAS

Análise		Fração Hexano	Fração Clorofórmio	Fração Acetato de Etila	Hidroalcoolico
Alcaloides	Meyer	-	+	-	-
	Dragendorff	-	-	-	-
	Bouchardart	-	-	-	-
	Bertrand	-	-	-	-
Flavonoides	Leicoantocianidinas	-	-	+	+
	Heterosídeos Flavônicos	-	-	+	+
	Flavonois	-	-	+	+
	Di-hidroflavonois	-	-	-	-
Cumarina	Tubo	-	-	-	-
	Papel	-	-	-	-
Antraquinonas		-	-	-	-
Esteróides e Triterpenos	Reação de Liberman - Bouchard	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo
	Reação de keller - Kelliani	Verde	-	-	-

Legenda: (+) positivo; (-) negativo

TABELA 3 - ENSAIO SISTEMÁTICO DO EXTRATO AQUOSO DAS FOLHAS

Análise		Extrato aquoso das folhas
Glicosídeos Antociânicos	pH 4	+
	pH 7	+
	pH10	+
	Antocianidina	+
Heterosídeos Saponínicos		-
Heterosídeos Cianogênicos		-
Aminogrupos		-
Taninos	Cloreto Férrico	+
	Sulfato Amoniacal	+
	Cloridrato de emetina	-
	Dircromato de potássio	+
	Hidrolisáveis	+
	Condensados	+
Ácidos Fixos		-
Ácidos Voláteis		-

Legenda: (+) positivo; (-) negativo

Nestes ensaios, foram observados a presença de leucoantocianidinas, heterosídeos flavônicos, flavonois, esteróides, triterpenos, glicosídeos antociânicos, taninos hidrolisáveis e condensados nas folhas. Neste estudo fitoquímico foi comprovada a alta diversidade de compostos químicos presentes nas folhas de *O. pulchella*, justificando assim sua utilização na medicina popular e indicando ainda o potencial para uso em outras áreas, como a alelopatia. Ainda, a marcha sistemática contribui para o estudo direcionado das substâncias detectadas, devido à economia, rapidez, simplicidade e maior segurança do processo, é um método indicado para a análise preliminar de compostos químicos derivados de plantas, como por exemplo, potenciais classes de aleloquímicos.

5.2 Obtenção do extrato bruto e frações

A partir das folhas foram obtidos o extrato etanólico das folhas (EB), e as frações hexânica (FH), clorofórmica (FC), acetato de etila (FAE) e hidroalcoólica remanescente (FHA).

Do material vegetal constituído por folhas (2.300 g) foram obtidos 500 mL do EB. Do fracionamento do EB das folhas foram obtidas as frações com os seguintes rendimentosde acordo com a tabela 4. Amostras de cada uma das frações foram utilizadas para as avaliações biológicas.

TABELA 4 - RENDIMENTO DAS FRAÇÕES DAS FOLHAS DE *OCOTEA PULCHELLA*

Fração	**Massa seca obtida (g)**	**Rendimento (%) em relação à massa**
Fração Hexânica	48,61	2,11
Fração Clorofórmica	27,36	1,19
Fração Acetato de etila	4,00	0,17

5.3 Elucidação estrutural

Com as frações obtidas foi isolado um composto da fração clorofórmio. Com a fração clorofórmio foi feita cromatografia em coluna de sílica com o sistema eluente hexano/acetato de etila com gradiente 10%, o qual foi até 100% de acetato de etila, seguido pelo sistema eluente de acetato de etila/metanol, também com gradiente de 10%.

Foram recolhidas 100 frações de aproximadamente 10mL, e após concentração houveram algumas cristalizações entre as frações 84-87.Estes cristais foram purificados com metanol, e filtração à vácuo em funil sinterizado G3. Esses cristais foram reunidos obtendo-se um frasco único (0,003g). Com essas amostras preparou-se uma CCD com fase móvel acetato de etila, ácido fórmico, ácido acético, água (100:11:11:27), e revelador NEU (reativo 2-aminoetilbutirato), através da qual foi verificada a presença de um possível flavonoide que estava puro. Para a identificação desses compostos foi realizada espectroscopia de ressonância magnética nuclear ^{13}C e ^{1}H.

Os deslocamentos químicos de RMN-^{1}H (figura 10) e RMN-^{13}C (figura 11 e 12) foram obtidos à 300 MHz utilizando MeOHD como solvente, e sua análise revelou a presença de 15 carbonos, confirmando o esqueleto carbônico de flavonoides. A absorção de ^{1}H na região de 6-8ppm caracteriza a presença de compostos aromáticos. Os resultados podem ser observados na tabela 5 comparados com a literatura de Andersen e Markham (2006).

Tabela 5 – Deslocamentos Químicos (ppm) de RMN ^{13}C e ^{1}H da Substância isolada

Posição	Experimental ^{13}C	Experimental ^{1}H	ANDERSEN E MARKAM (2006)
2	147,9	-	148,00
3	137,7	-	137,21
4	177,5	-	177,23
5	163,2	-	162,30
6	100,1	6,25 (J=1,15)	99,25
7	166,0	-	165,34
8	95,4	6,51 (J=1,13)	94,40
9	158,7	-	158,22
10	105,0	-	104,52
1’	124,7	-	124,15
2’	116,7	7,81 (J=1,26)	115,99
3’	146,8	-	148,75
4’	149,3	-	146,21
5’	117,1	6,99 (J=1,18)	116,22
6’	122,4	7,69 (J=1,17)	121,67

Os sinais dos hidrogênios aromáticos em δ7,81 (H2’) com J=1,26Hz, δ6,99 (H5’) com J=1,18Hz, e δ7,69 com J=1,17Hz (H6’) indicam acoplamento meta entre H2’ e H6’, e acoplamento orto entre H5’ e H6’, caracterizando uma dioxigenação do anel B em C3’ e C4’. Nesta região também se observou os dubletos referentes aos hidrogênios H6 (δ6,25) e H8 (δ6,51), com *J*=1,15Hz e J=1,13Hz, respectivamente, característico de um acoplamento meta de um anel aromático, os quais correspondem ao anel A do flavonoide substituído em C-5 e C-7 (LHUILLIER, 2007).

Através dos resultados obtidos e pela comparação com dados da literatura pode-se concluir que o composto isolado é o flavonoide quercetina, o qual tem sua

estrutura química ilustrada na Figura 9. A quercetina é um flavonoide amplamente distribuído no reino vegetal, o qual possui uma elevada capacidade antioxidante na remoção de radicais livres, exercendo assim um papel citoprotetor, além dessa atividade este flavonoide apresenta atividade antiinflamatória, imunomoduladora e antitumoral (BÜRGER, 2008).

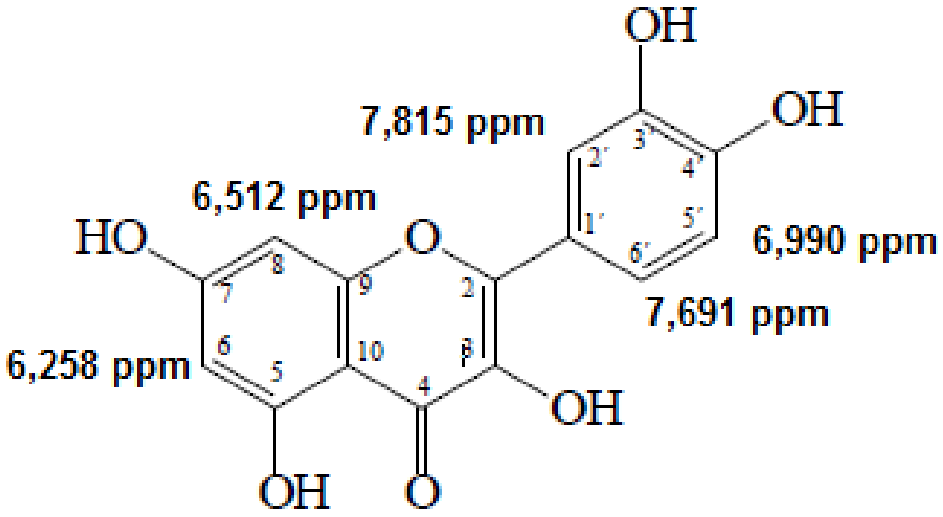


FIGURA 9 – ESTRUTURA DA QUERCETINA ISOLADA DA FRAÇÃO CLOROFÓRMIO

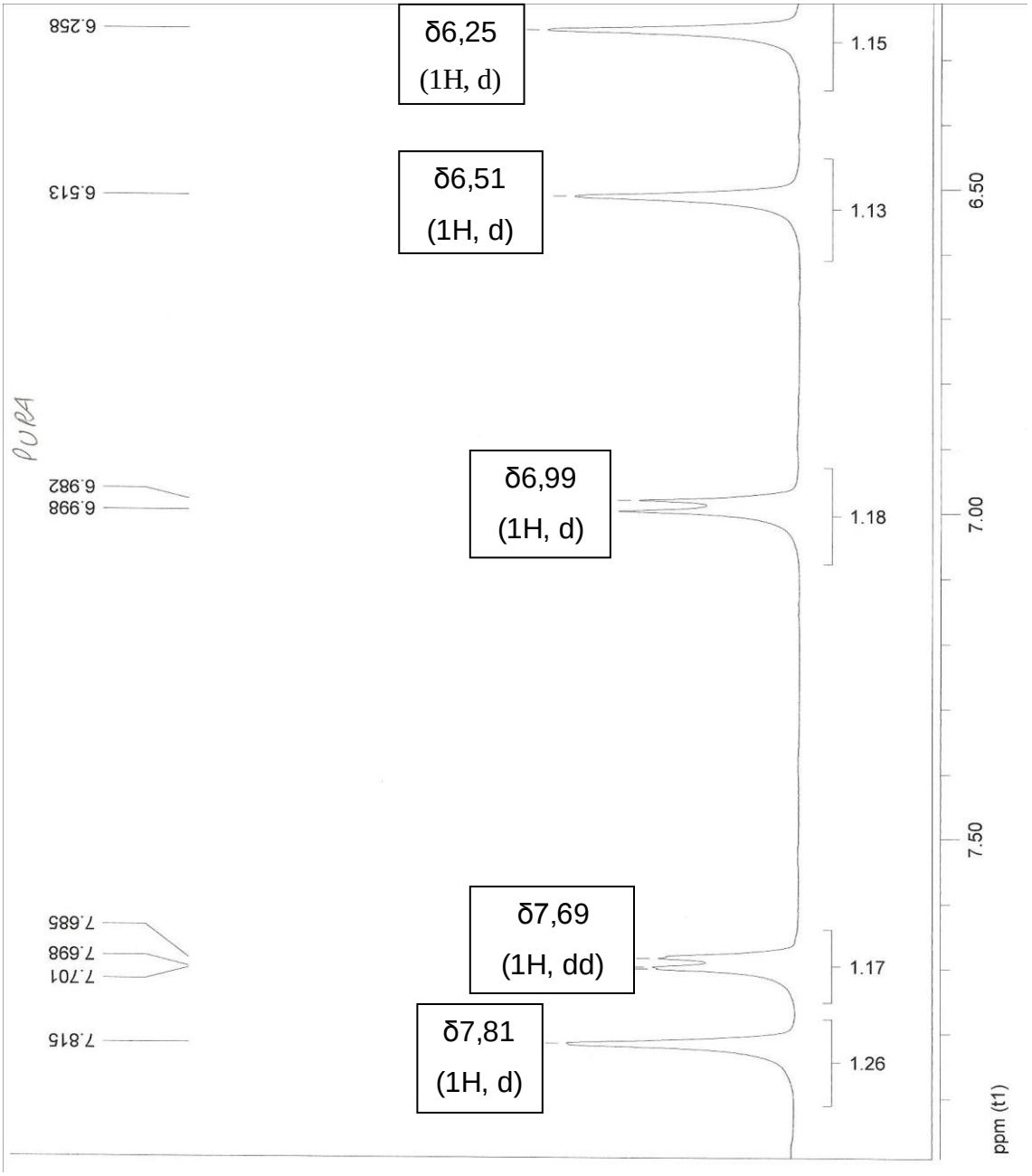


FIGURA 10 – ESPECTRO DE RMN ^{1}H DA QUERCETINA ISOLADA DA FRAÇÃO CLOROFÓRMIO

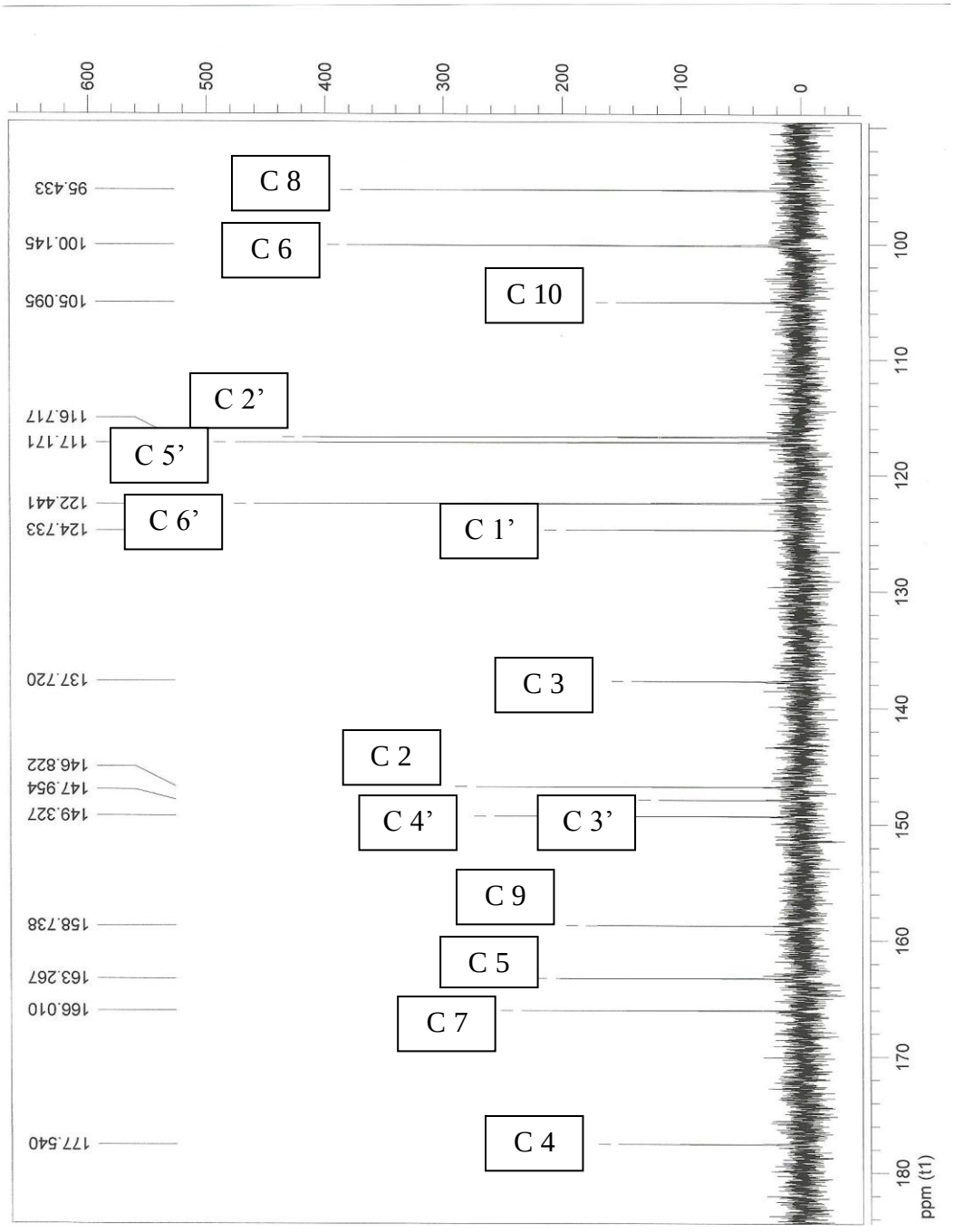


FIGURA 11 – ESPECTRO DE RMN ^{13}C DA QUERCETINA ISOLADA DA FRAÇÃO CLOROFÓRMIO

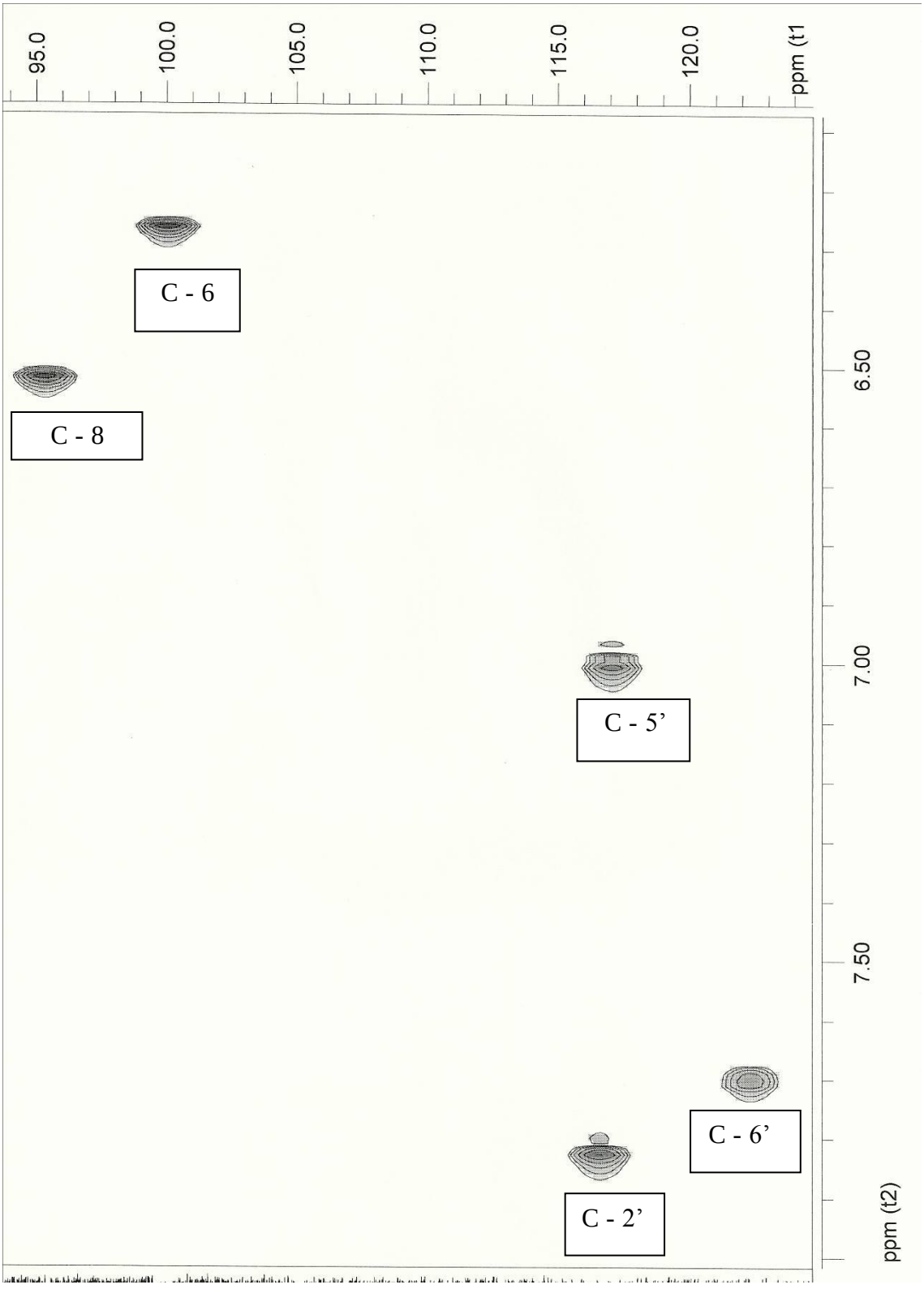


FIGURA 12 – ESPECTRO DE RMN 2D DA QUERCETINA ISOLADA DA FRAÇÃO CLOROFÓRMIO

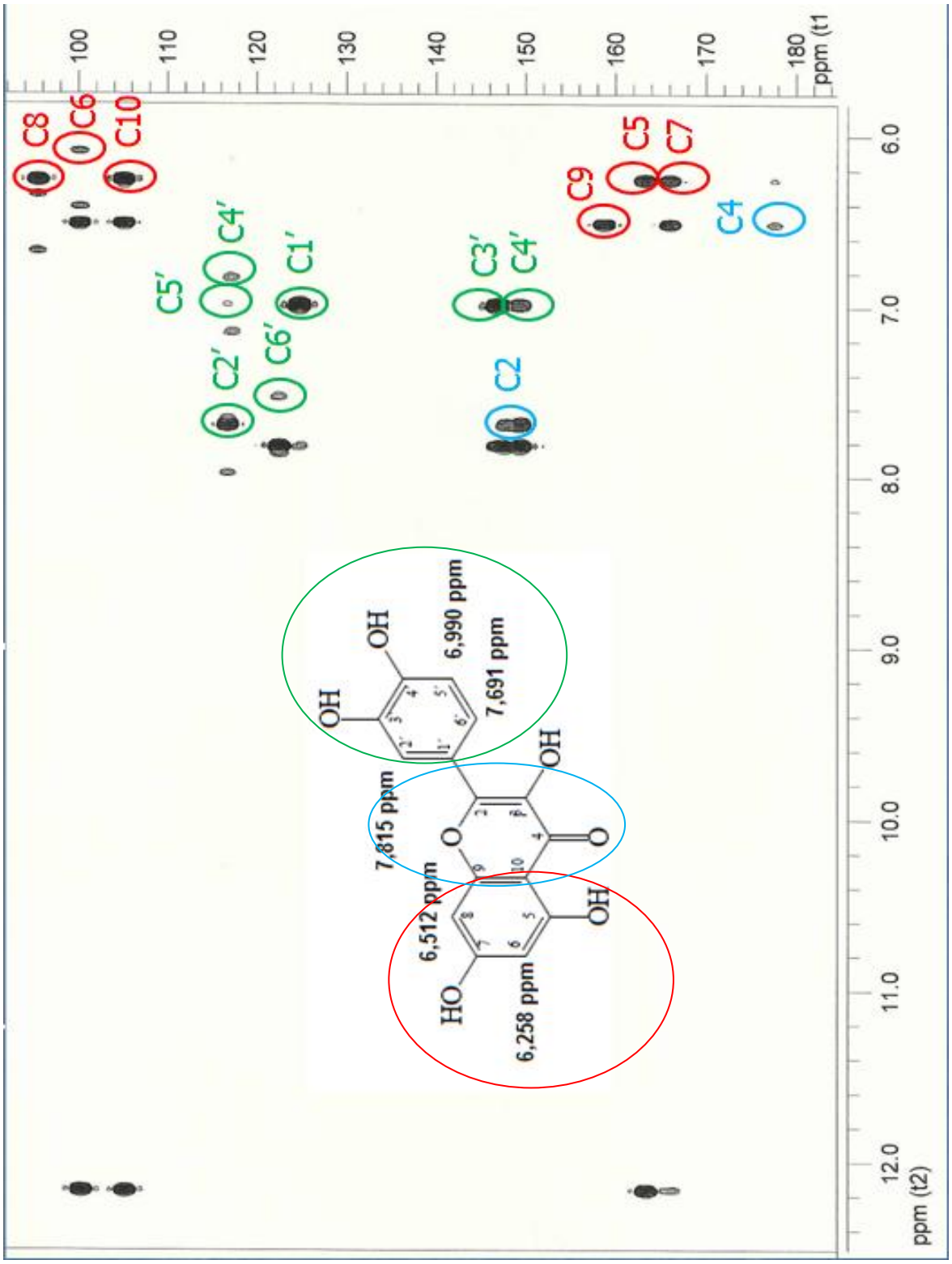


FIGURA 13 – ESPECTRO HMQC DA QUERCETINA ISOLADA DA FRAÇÃO CLOROFÓRMIO COM RELAÇÃO

5.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA

5.4.1 Bioensaios de germinação e crescimento

Em relação aos bioensaios de germinação e crescimento, a análise dos efeitos alelopáticos das frações de *Ocotea pulchella* indicaram que a intensidade dos efeitos variou em função das frações avaliadas e das concentrações utilizadas. Nos resultados da velocidade de germinação, foi verificado que apenas a fração hexânica afetou a velocidade de germinação e causou redução na germinabilidade de *L. sativa*, sendo que os efeitos mais acentuados foram verificados para as concentrações de 500 $mg.L^{-1}$ e 250 $mg.L^{-1}$. Entretanto, as mesmas não afetaram a porcentagem final de germinação, sendo que o EB e as frações FCL, FAE e HIDRO foram as que mais afetaram na porcentagem final das sementes com valores de inibição superiores a 50%, em todas as concentrações ensaiadas (Tabela 6). A fração HIDRO afetou de maneira significativa, promovendo a germinação de apenas ±7,31% e e ±3,91% para as concentrações de 1000 $mg.L^{-1}$ e 500 $mg.L^{-1}$, quando comparado ao controle. Efeito similar também foi observado para a FCL, com valores de germinação iguais a ±9,7 e ±10,36, para as maiores concentrações ensaiadas.

A literatura relata que os aleloquímicos quando liberados em quantidades suficientes causam efeitos alelopáticos que podem ser observados na germinação das espécies avaliadas (CARVALHO, 1993), corroborando com os resultados aqui obtidos. A interferência no processo de germinação pode afetar no crescimento e desenvolvimento radicular de plantas, (SOUZA *et al*., 1997), sendo constatado que no início do processo germinativo, o ciclo do glioxalato inicia uma função de mobilização dos triglicerídeos, onde durante cada estágio de germinação, enzimas como a isocitrato liase, aumentam sua atividade devido ao metabolismo de lipídeos armazenados nos tecidos de germinação (GNIAZDOWSKA E BOGATEK, 2005).

Nesse sentido, a inibição da mobilização de lipídeos na presença de ácido ferrúlico e p-cumárico foi detectada durante a germinação de colza (*Brassica napus*) (BALERONI et al., 2000). Esses resultados corroboram com (KUPIDŁOWSKA E BOGATEK, 2003), que observaram uma supressão da mobilização de lipídeos em sementes de mostarda tratadas com extrato de girassol. Compostos fenólicos

reduzem a atividade de enzimas envolvidas na glicólise e na via oxidativa das pentoses fosfato, as quais asseguram níveis de ATP e esqueletos de carbono suficientes para a germinação das sementes (GNIAZDOWSKA E BOGATEK, 2005).

Dessa forma, grande parte dos aleloquímicos atua no estresse oxidativo, produzindo espécies reativas de oxigênio, que atuam diretamente ou como sinalizadores para os processos de degradação celular, impedindo assim a germinação e o desenvolvimento inicial, bem como processos fisiológicos vitais às plantas.

TABELA 6 – ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG) E PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO (G%) DE ALFACE SUBMETIDAS A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB), FRAÇÃO HEXÂNICA (FH), FRAÇÃO CLOROFÓRMICA (FCL), FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (FAE) E HIDROALCOOLICA (HIDRO) DE *OCOTEA PULCHELLA.*

Índice de Velocidade de Germinação (IVG)			
Tratamento	250 mg.L^{-1}	500mg.L^{-1}	1.000mg.L^{-1}
Controle: 26,70 ± (2,85)			
EB	18,93 ± (5,26)^{ns}	22,31 ± (3,13) ^{ns}	20,01 ± (3,16) ^{ns}
FH	10,67 ± (3,58)*	12,26 ± (3,37)*	13,78 ± (3,09)*
Controle: 41,90 ± (5,46)			
FCL	40,18 ± (3,68) ^{ns}	38,30 ± (2,30) ^{ns}	37,84 ± (5,69) ^{ns}
FAE	41,55 ± (2,83) ^{ns}	40,75 ± (7,22) ^{ns}	32,56 ± (1,88) ^{ns}
HIDRO	37,05 ± (6,39) ^{ns}	39,37 ± (3,96) ^{ns}	38,84 ± (5,27) ^{ns}
Porcentagem de Germinação (% G)			
Tratamento	250 mg.L^{-1}	500 mg.L^{-1}	1.000mg.L^{-1}
Controle: 53,39 (5,70)			
EB	22,46 ± (10,52) *	11,28 ± (6,26) *	25,05 ± (6,31) *
FH	63,52 ± (6,18) ^{ns}	52,78 ± (6,61) ^{ns}	48,40 ± (6,18) ^{ns}
Controle: 83,80 (10,93)			
FCL	4,51 ± (7,36) *	10,36 ± (4,61) *	9,70 ± (11,38) *
FAE	0,48 ± (5,66) *	8,05 ± (14,45) *	22,30 ± (3,75) *
HIDRO	10,62 ± (12,79) *	3,91± (7,92) *	7,31 ± (10,53) *

*A média do tratamento difere significativamente (p<0,05) em comparação com a média do controle, pelo teste de Tukey. ^{ns} Não significativo.

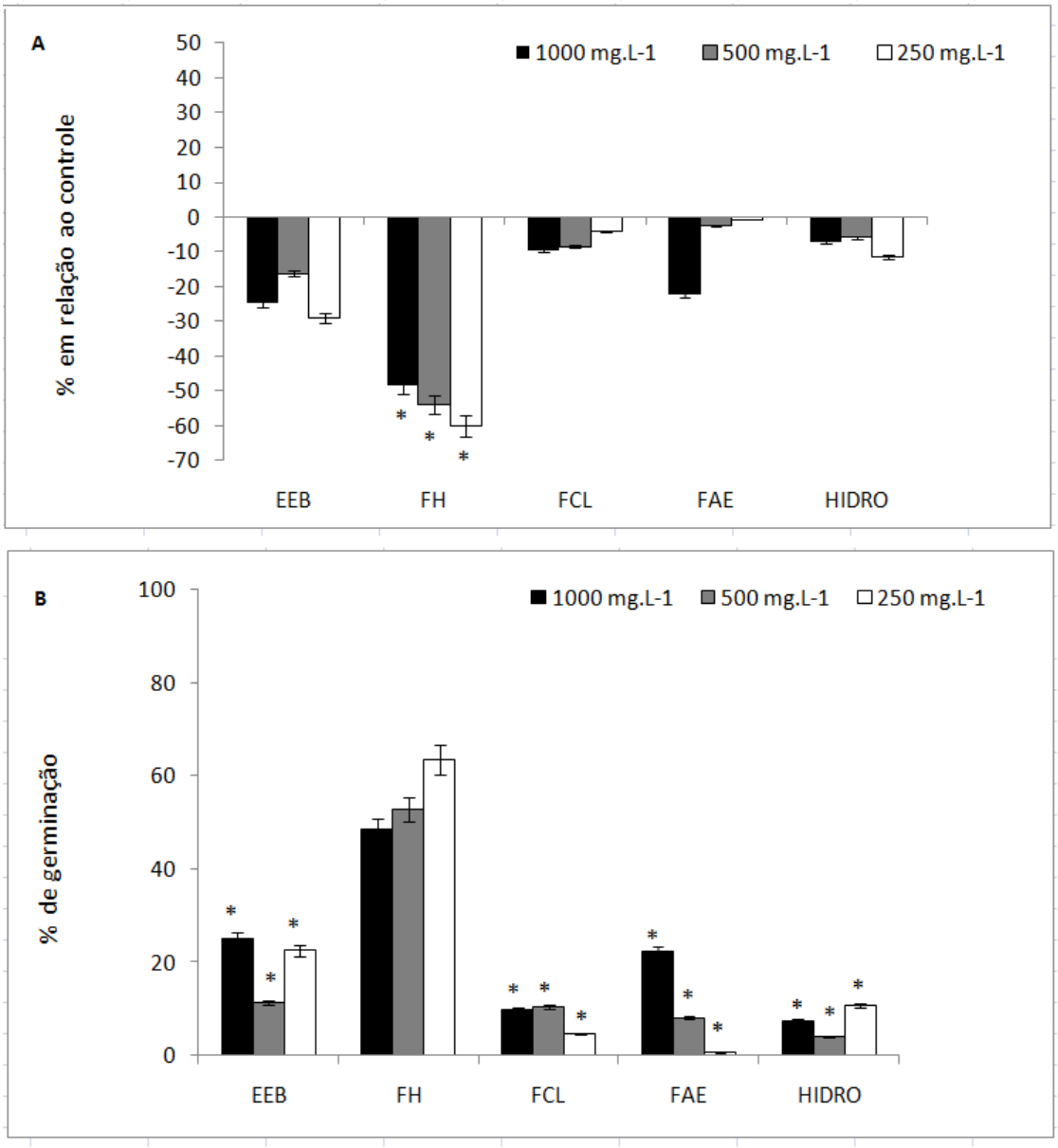


FIGURA 14 – ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (A) E PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO (B) DE PLÂNTULAS DE *L. SATIVA* SUBMETIDAS AO EXTRATO BRUTO, À FRAÇÃO HEXÂNICA (FH), FRAÇÃO CLOROFÓRMIO (FCL), FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (FAE) E HDROALCOOLICA (HIDRO) DE *OCOTEA PULCHELLA*. DADOS EXPRESSOS EM PERCENTUAL EM RELAÇÃO AO CONTROLE. *A MÉDIA DO TRATAMENTO DIFERE SIGNIFICATIVAMENTE (P<0,05) EM COMPARAÇÃO COM A MÉDIA DO CONTROLE, PELO TESTE DE TUKEY.

5.4.2 Teste de crescimento

Com relação ao crescimento, foi verificado que a maioria das frações causaram redução no tamanho das plântulas (Figura 15). No crescimento da raiz primária os efeitos mais acentuados foram para a FCL e HIDRO, com reduções na raiz primária de ±27,9% e 27,7% para a concentração de 1000 $mg.L^{-1}$ respectivamente, sendo o efeito mais severo observado para a FCL. No crescimento do hipocótilo, apenas a maior concentração da FH causou efeito inibitório, afetando em ±15,1% em relação ao controle. A menor concentração (250 $mg.L^{-1}$) da HIDRO estimulou o crescimento do hipocótilo em ±13,3%. Nos estudos também foi observado que não houve alterações na massa seca final de *L. sativa* indicando que as frações avaliadas, não causaram redução na biomassa vegetal da espécie em estudo (Figura 15).

As substâncias alelopáticas captadas pelas raízes e transportadas através da planta podem agir sobre a divisão, o alongamento e ultraestrutura das células, na permeabilidade das membranas, e interferir nos mecanismos hormonais de indução do crescimento, na síntese protéica, no metabolismo de lipídios e de ácidos orgânicos. Fenômenos fisiológicos como abertura estomática, fotossíntese e respiração podem ser alterados por compostos alelopáticos, da mesma forma como esses compostos, no solo, podem interferir na absorção de nutrientes (RICE, 1984).

A atividade alelopática do gênero *Ocotea* já foi investigada. Em investigações com extrato aquoso de *O. odorifera* foi observado que estes causaram drásticas reduções no desenvolvimento do sistema radicular do que na parte aérea de plantas de *L. sativa*, embora tenha sido registrada a inibição de ambos os compartimentos dessas plantas-teste (Borges *et al*., 1993). Nos bioensaios avaliados, a espécie-alvo foi testada em um estágio de desenvolvimento em que o crescimento do sistema radicular é priorizado. Portanto, os efeitos deletérios sobre o metabolismo desse órgão são mais drásticos, uma vez que é o alvo primário dos aleloquímicos, principalmente durante o desenvolvimento inicial da planta, que é caracterizado por alto metabolismo e sensibilidade ao estresse ambiental (CRUZ-ORTEGA *et al*., 1998).

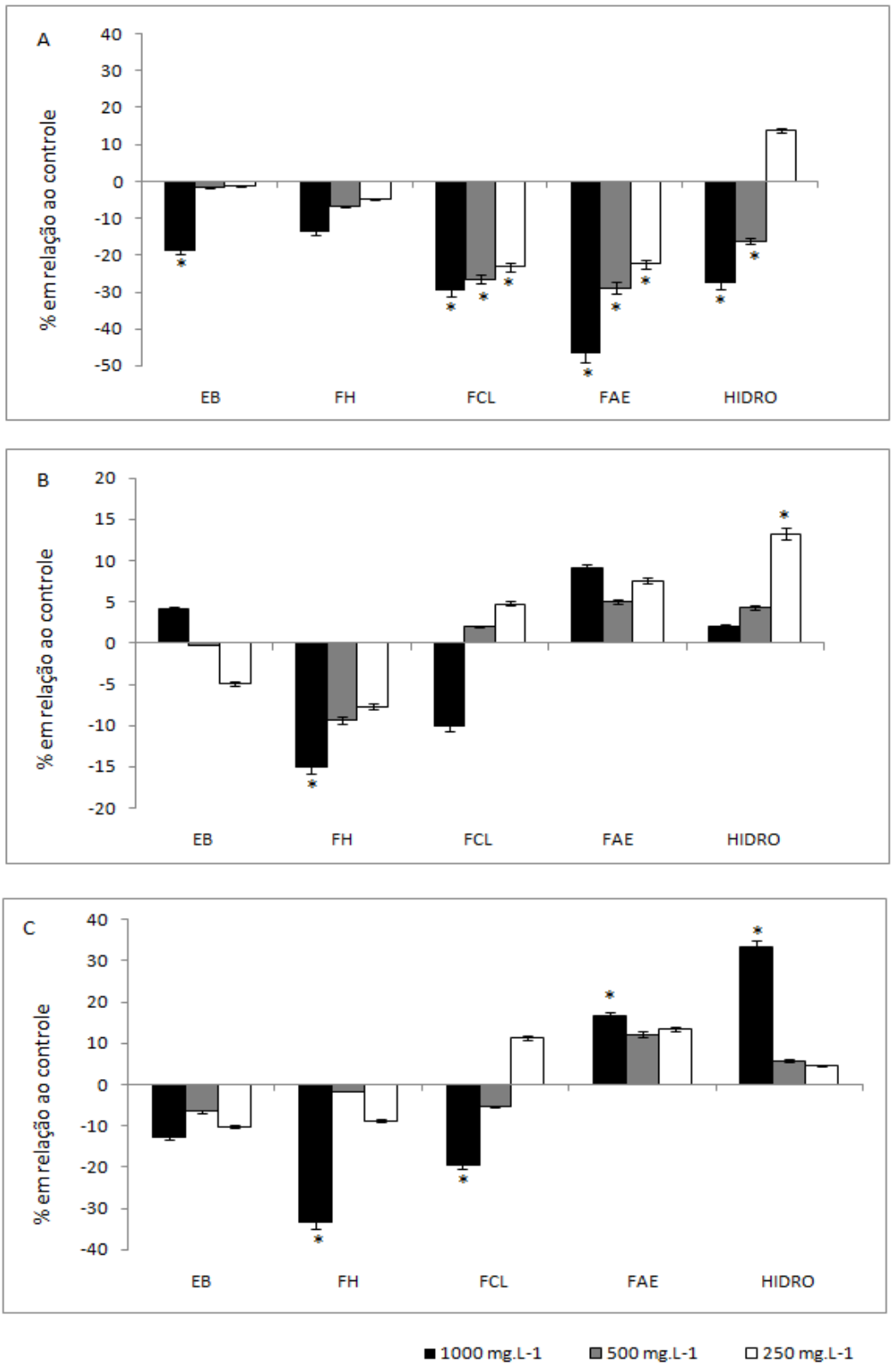


FIGURA 15 - EFEITO DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB) E FRAÇÕES HEXÂNICA (FH), CLOROFÓRMIO (FCL), ACETATO DE ETILA (FAE) E HIDROALCÓLICA (HIDRO) DE *O. PULCHELLA* NO CRESCIMENTO MÉDIO DA RAIZ PRIMÁRIA (A), HIPOCÓTILO (B) E MASSA SECA (C) DE PLÂNTULAS DE *L. SATIVA* .

*A média do tratamento difere significativamente (p<0,05) em comparação com a média do controle, pelo teste de Tukey.

5.4.3 Índice mitótico

No parâmetro divisão celular, foi observado que houve redução no número de células, em todas as concentração do extrato e frações ensaiadas, sendo os maiores efeitos depressivos verificado na concentração de 1000 $mg.L^{-1}$, para as FAE e HIDRO. Os resultados das observações citológicas em células meristemáticas das raízes de plântulas de *L. sativa*, tratadas com diferentes concentrações das frações de *Ocotea pulchella* são apresentados na Figura 16.

Comparando-se as freqüências das diferentes fases da mitose dentro de cada tratamento, foi observada maior freqüência de anáfase e menor, na prófase. Como houve interferência na divisão celular em todas as fases da mitose causada pela ação do extrato com acentuado efeito sobre a morfologia do sistema radicular, provavelmente represente um dos mecanismos de ação do extrato sobre o desenvolvimento da planta-teste. A citotoxicidade de substâncias é avaliada pelo surgimento de alterações no processo de divisão celular sobre o organismo teste, tanto pela inibição do índice mitótico como pela incidência de mutações cromossômicas, como quebras cromatídicas, perda de cromossomos inteiros ou formação de micronúcleos, sendo algumas destas alterações visualizadas no presente trabalho (Figura 17).

A análise do índice mitótico é um método eficiente usado para avaliar o efeito alelopático de uma planta sobre outra. A observação em microscópio torna-se imprescindível na detecção de anomalias nas fases da mitose, bem como de formas atípicas das estruturas celulares (GNIAZDOWSKA E BOGATEK, 2005). RIZVI *et al.* (1992) ainda citam que estruturas citológicas e ultra-estruturas podem afetar a absorção de minerais; movimento dos estômatos, síntese de pigmentos e fotossíntese; respiração; síntese de proteínas; atividade enzimática; relações hídricas e condução; materiais genéticos, induzindo alterações no DNA e RNA.

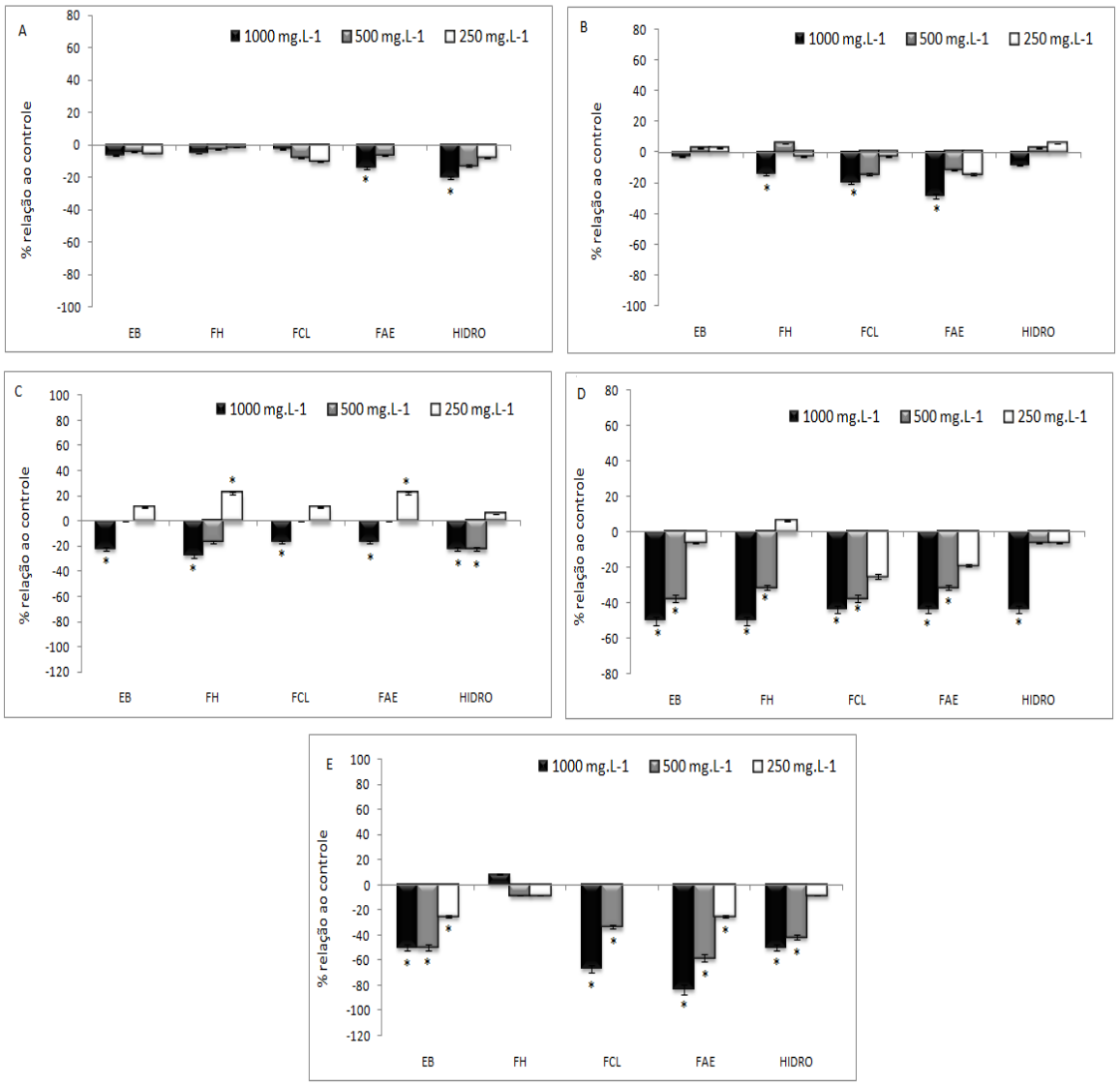


FIGURA 16 - EFEITO DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB) E FRAÇÕES HEXÂNICA (FH), CLOROFÓRMIO (FCL), ACETATO DE ETILA (FAE) E HIDROALCÓLICA (HIDRO) DE *O. PULCHELLA* NO ÍNDICE MITÓTICO (A), PRÓFASE (B) METÁFASE (C) ANÁFASE (D) E TELÓFASE (E) DE PLÂNTULAS DE *L. SATIVA* . *A MÉDIA DO TRATAMENTO DIFERE SIGNIFICATIVAMENTE (P<0,05) EM COMPARAÇÃO COM A MÉDIA DO CONTROLE, PELO TESTE DE TUKEY.

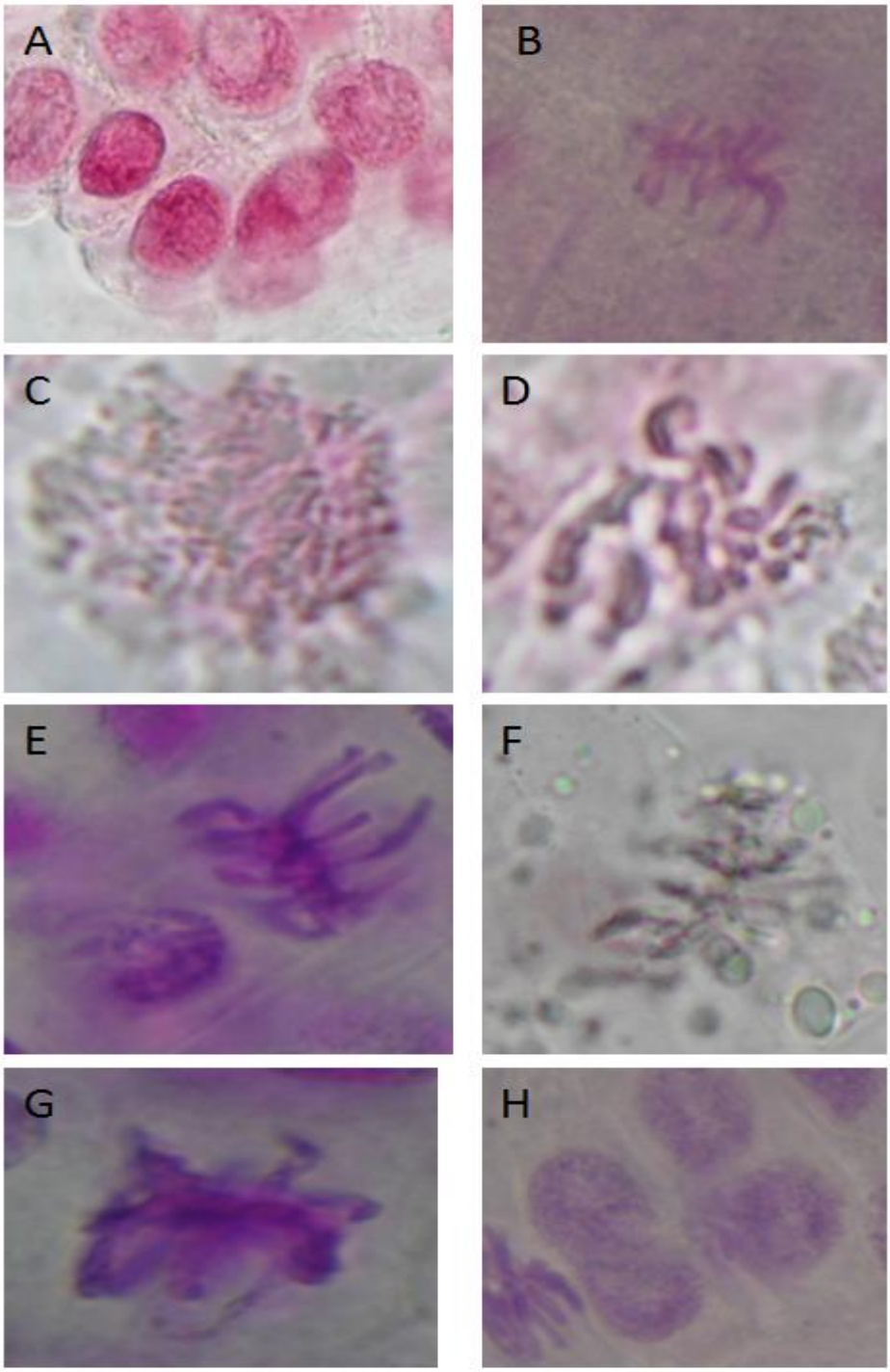


FIGURA 17 - ALTERAÇÕES CELULARES MERISTEMÁTICAS DE *L. SATIVA* SUBMETIDAS AO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB) E FRAÇÕES HEXÂNICA (FH), CLOROFÓRMIO (FCL), ACETATO DE ETILA (FAE) E HIDROALCÓLICA (HIDRO) DE *O. PULCHELLA.* A- CÉLULAS NORMAIS, B- ANÁFASE COM PONTE CROMOSSÔMICA, C,D- CÉLULA EM APOPTOSE, E- CÉLULA AMEBÓIDE COM RETARDO NA ANÁFASE, F, G- METÁFASE COM PERDA DE FILAMENTOS CROMOSSÔMICOS, H- CÉLULA AMEBÓIDE.

5.4.4 Respiração de raízes

Alterações no padrão de respiração das raízes de *L. sativa* também foram observadas. As frações FCL, FAE e HIDRO causaram redução acentuada em todas as concentrações, com reduções de ± 0,080. A FH apresentou aumento da respiração em raízes na maior concentração, quando comparados ao controle (Figura 18). Os compostos alelopáticos podem afetar vários processos. Tais alterações podem ter início na germinação das sementes, sendo os efeitos pronunciados no crescimento das plântulas, causando deficiência na assimilação de nutrientes, alterando processos como a respiração e atividade de outras enzimas com perda de nutrientes pelos efeitos na permeabilidade da membrana celular (DURIGAN E ALMEIDA, 1993). A perda de nutrientes pelos efeitos na permeabilidade da membrana celular, podem provocar uma interrupção da maioria e dos processos que estão conectados, interligados e interdependentes, entre estes a respiração e absorção de água (DURIGAN E ALMEIDA, 1993; RODRIGUES, *et al*., 1993; EINHELLIG, 1995).

5.4.5 Fotossíntese (Teor de clorofila)

Com relação ao teor de clorofila, foi observado que apenas a fração hexânica causou redução significativa no teor de clorofila em *L. sativa*, em todas as concentrações avaliadas, causando diminuição da atividade fotossintética, em ± 3,00 mg/L na concentração de 250 $mg.L^{-1}$ (Figura 18). De forma similar, os extratos aquosos de folhas e cascas de tronco de canela-sassafrás inibiram a produção de clorofila de plântulas de sorgo (CARMO *et al.,* 2007), sendo reportado na literatura que certas classes de aleloquímicos interferem na fotossíntese por induzir mudanças no conteúdo de clorofila das plantas (CHOU, 1999). RIZVI *et al*. (1992) reportam-se aos ácidos fenólicos, às cumarinas, aos polifenóis e aos flavonoides como os principais aleloquímicos responsáveis pela inibição da fotossíntese, por alterarem o transporte de elétrons e a fosforilação nos fotossistemas.

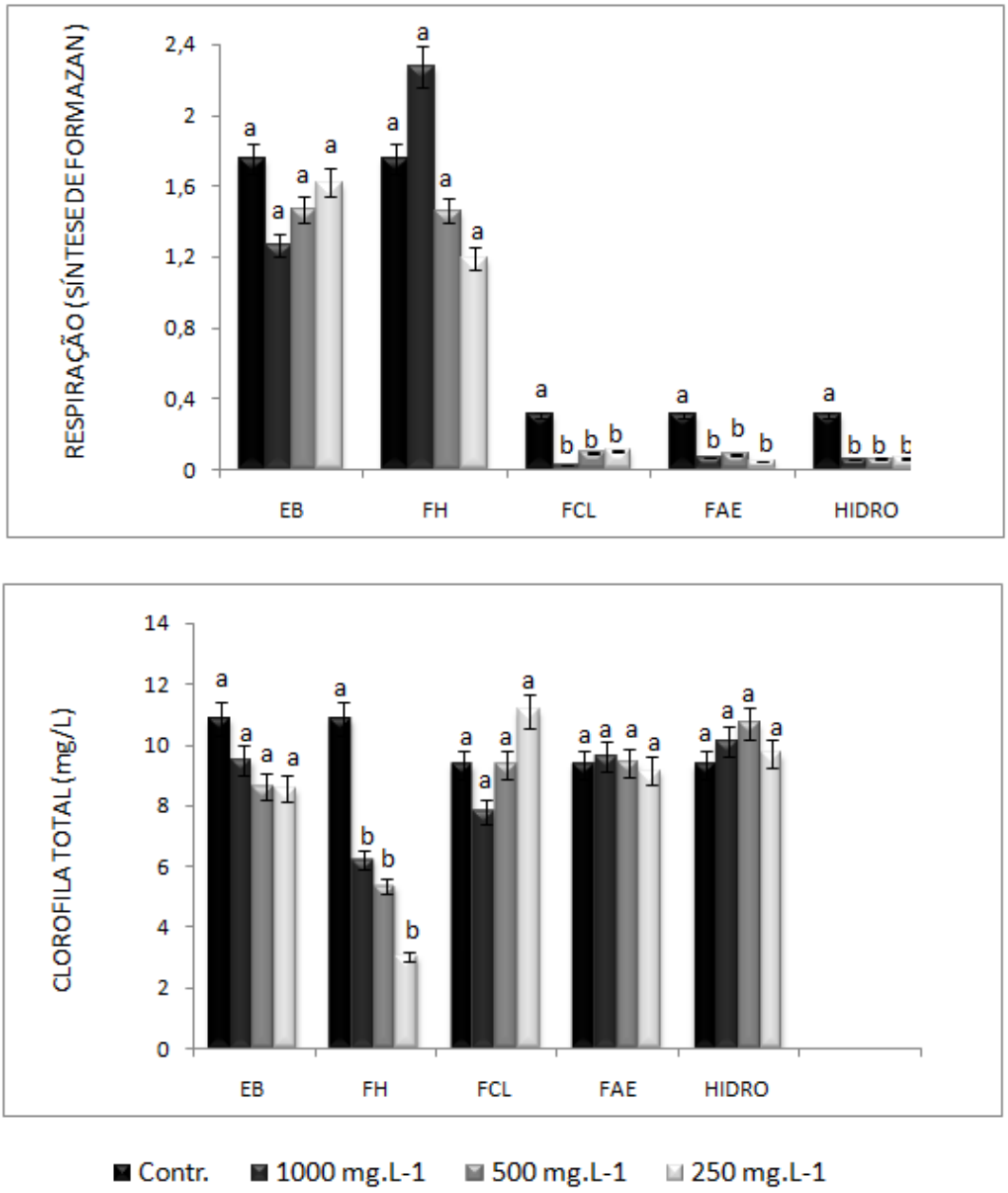


FIGURA 18 – RESPIRAÇÃO E TEOR DE CLOROFILA EM RAÍZES DE PLÂNTULAS DE *L. SATIVA* SUBMETIDAS À FRAÇÃO CLOROFORMIO (FH), FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (FAE) E FRAÇÃO HIDROALCOOLICA (HIDRO) DE *OCOTEA PULCHELLA.* MÉDIAS SEGUIDAS DE MESMA LETRA NÃO DIFEREM SIGNIFICATIVAMENTE (P < 0,05) EM COMPARAÇÃO COM A MÉDIA DO CONTROLE, PELO TESTE DE TUKEY.

5.4.6 Atividade enzimática

5.4.6.1 Atividade da peroxidase

Os extratos e frações avaliados aumentaram a atividade da peroxidase, sendo os efeitos mais acentuados nas frações FH, FAE e HIDRO, tendo uma variação da atividade enzimática nas concentrações em estudo, onde as plântulas de *L. sativa* foram mais sensíveis às FH e HIDRO , com aumento de ± 37,40 UAE.mg.MF e 40,13 UAE.mg.MF. Segundo Taiz e Zeiger (2004) as oxidases, tal como a peroxidase, podem catalisar ligações cruzadas entre grupos fenólicos (tirosina, fenilalanina, ácido ferúlico) em proteínas de parede,
pectinas e outros polímeros de parede. Tal acoplamento fenólico é importante para a formação de ligações cruzadas de lignina e pode igualmente unir componentes diferentes da parede.

O papel da peroxidase no crescimento das plantas, demonstrado em muitas espécies, evidencia que a mesma está diretamente envolvida na modulação do crescimento do hipocótilo com aumento da atividade da enzima e conseqüentemente no alongamento do tecido (AQUAD *et al.,* 1998). Assim a substância presente no extrato poderia estar inibindo a atividade dessa enzima e conseqüentemente reduzindo o crescimento principalmente da radícula, que foi avaliado durante o teste de germinação. Ao observar os resultados apresentados na Figura 19, infere-se a interferência de alguma substância presente no extrato na germinação dessas sementes.

As enzimas peroxidases encontram-se amplamente distribuídas nos vegetais, exercendo várias funções importantes em seu crescimento e no processo de diferenciação e desenvolvimento celular, ou seja, ela está diretamente envolvida com o crescimento, mecanismos de defesa e alongamento de tecidos. No presente trabalho, o crescimento relativo de *L. sativa* foi afetado, colaborando com as observações de Menezes *et al*., (2004).

5.4.6.2 Atividade da catalase

A atividade da enzima catalase foi acentuada nas frações FCL e FAE, em todas as concentrações utilizadas, tendo um aumento da atividade nas concentrações mais baixas (Figura 19). Existem muitos compostos alelopáticos com capacidade de modificar a síntese ou a atividade de enzimas tanto *in vivo* como *in vitro*. As alterações aqui observadas nas atividades das enzimas peroxidase e catalase indicaram a ocorrência de danos oxidativos em resposta aos extratos, embora os testes de algumas amostras tenham apresentado resultados negativos.

A atividade da catalase, em resposta ao extrato e frações, apresentou um comportamento distinto do observado para peroxidase, sendo sua atividade maior quando comparada a peroxidase. De acordo com Zhang e Kirkham (1996), a capacidade de manutenção, em níveis elevados, da atividade da catalase, sob condições de estresse, é essencial para a manutenção do equilíbrio entre a formação e a remoção do H_2O_2 do ambiente intracelular. Segundo Cakmak e Horst (1991), a redução na atividade da catalase indica que, em plantas mantidas sob condições de estresse, o H_2O_2 gerado é mais consumido em processos oxidativos, como na peroxidação de lipídios, do que eliminado do metabolismo.

O aumento nas atividades da peroxidase e catalase evidenciam que o metabolismo oxidativo das plantas de *L. sativa* foi ativado em resposta à ação fitotóxica dos extratos e frações. A ativação de metabolismo oxidativo nas plantas parece resultar no acumulo de H_2O_2 e, por conseguinte, na peroxidação de lipídios. De acordo com Buege e Aust (1978), a peroxidação de lipídios tem início com a remoção de um átomo de hidrogênio das moléculas de ácidos graxos insaturados. O subseqüente rearranjo das duplas ligações resulta na formação de um dieno-conjugado que, após o ataque por oxigênio molecular, produz os radicais peroxilipídicos e os endoperóxidos (GUTTERIDGE E HALLIWELL, 1990). A formação de endoperóxidos, a partir de ácidos graxos insaturados, que apresentam pelo menos três grupos metilenos interrompidos por ligações duplas, pode resultar na formação de dialdeído malônico (MDA), um produto da degradação dos lipídios (BUEGE & AUST, 1978).

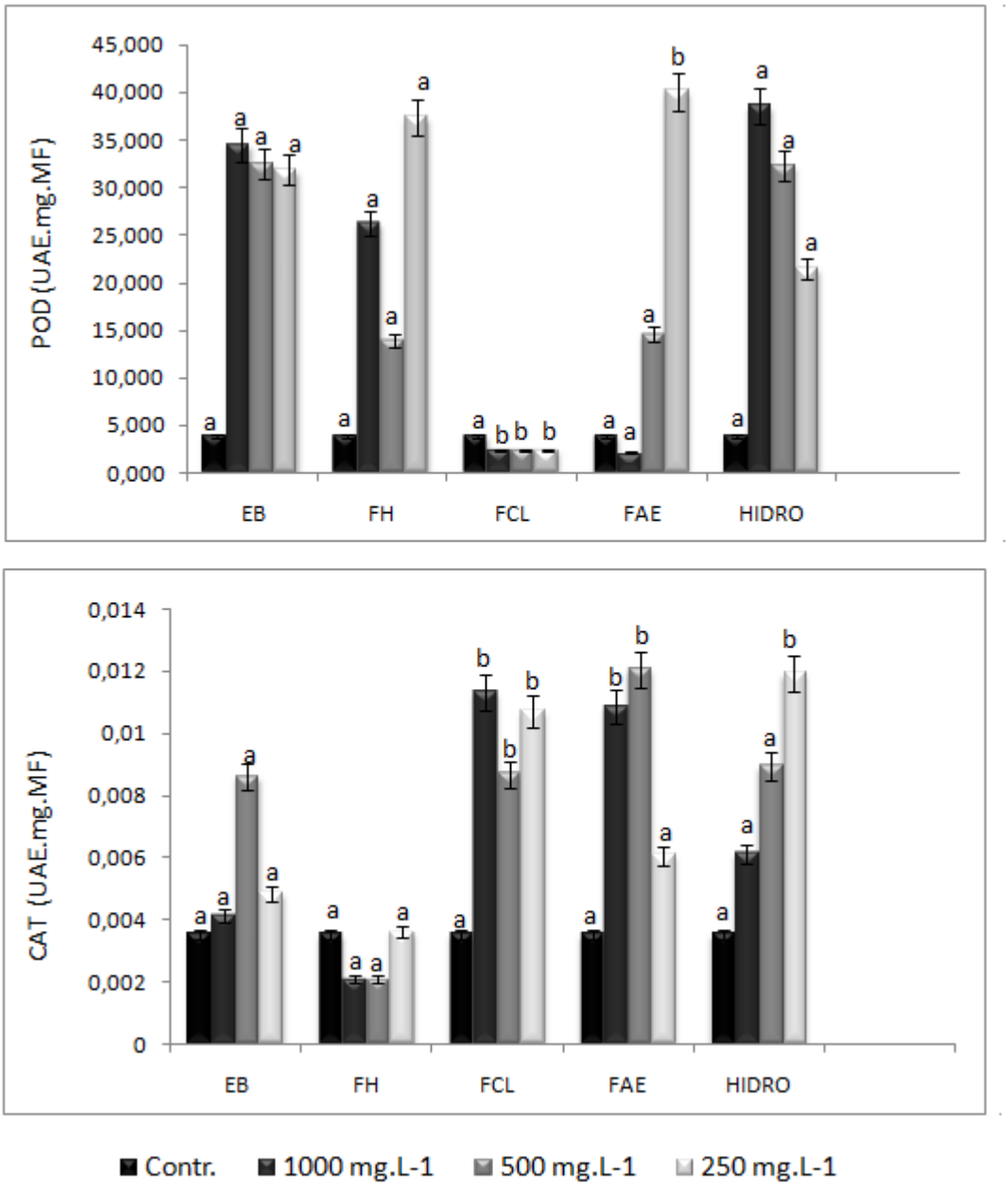


FIGURA 19 – ATIVIDADE DA PEROXIDASE (POD) E CATALASE (CAT) EM PLÂNTULAS DE *L. SATIVA* SUBMETIDAS À FRAÇÃO CLOROFORMIO (FH), FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (FAE) E FRAÇÃO HIDROALCOOLICA (HIDRO) DE *OCOTEA PULCHELLA*. MÉDIAS SEGUIDAS DE MESMA LETRA NÃO DIFEREM SIGNIFICATIVAMENTE ($P < 0,05$) EM COMPARAÇÃO COM A MÉDIA DO CONTROLE, PELO TESTE DE TUKEY.

5.4.6.3 Atividade da superóxido dismutase

Na atividade da SOD, foi verificado que houve reduções drásticas no conteúdo desta enzima, apresentando valores inferiores ao controle. As frações hexânica (FH) e clorofórmio (FCL) foram as que apresentaram os menores valores de SOD, em todas as concentrações ensaiadas, com declínio de 1,77 UEA. mg. MF para a concentração de 250 mg.L^{-1} e -1,83 UEA. mg. MF para a concentração de 500 mg.L^{-1}, não sendo estatisticamente significativo quando comparado ao controle (Figura 20).

A diminuição observada na atividade da SOD pode indicar que o EEB e frações não apresentam ação direta sobre o metabolismo oxidativo das plantas, e dessa forma diminuindo a formação de H_2O_2 e do radical superóxido ($O_2^{-\cdot}$), principais substratos dessa enzima. O radical $O_2^{-\cdot}$ transforma-se, espontaneamente, em H_2O_2. Todavia, a reação é muito mais rápida, se catalisada pela SOD. A ação combinada da SOD e da CAT reduz o risco da formação de $OH^{\cdot}$ (radical hidroxila), um radical livre de elevada reatividade (SCANDALIOS, 1993). Contudo, o H_2O_2 produzido representa uma outra espécie química, potencialmente tóxica, devendo ser rapidamente eliminada do metabolismo (FOYER *et al*., 1994). A ação combinada da SOD, da CAT e de diferentes formas de peroxidase, além da ação de substâncias antioxidantes de baixo peso molecular como o ascorbato pode, efetivamente, eliminar e imobilizar espécies tóxicas de oxigênio (SCANDALIOS, 1993; SIEGEL, 1993).

5.4.6.4 Atividade da α-amilase

Com relação ao gasto energético (α- amilase), não foi observado a redução nos níveis dessa enzima, quando comparado ao controle, evidenciando que os extratos e frações aqui estudados, não influenciaram no gasto energético das plântulas avaliadas (Figura 20). O processo de germinação de sementes leva a desencadeamentos enzimáticos capazes de desdobrarem reservas nutritivas com a finalidade de nutrição do eixo embrionário. Dentre as reservas está o amido e entre as enzimas hidrolíticas a α- amilase (BUCKERIDGE *et al.,* 2004).

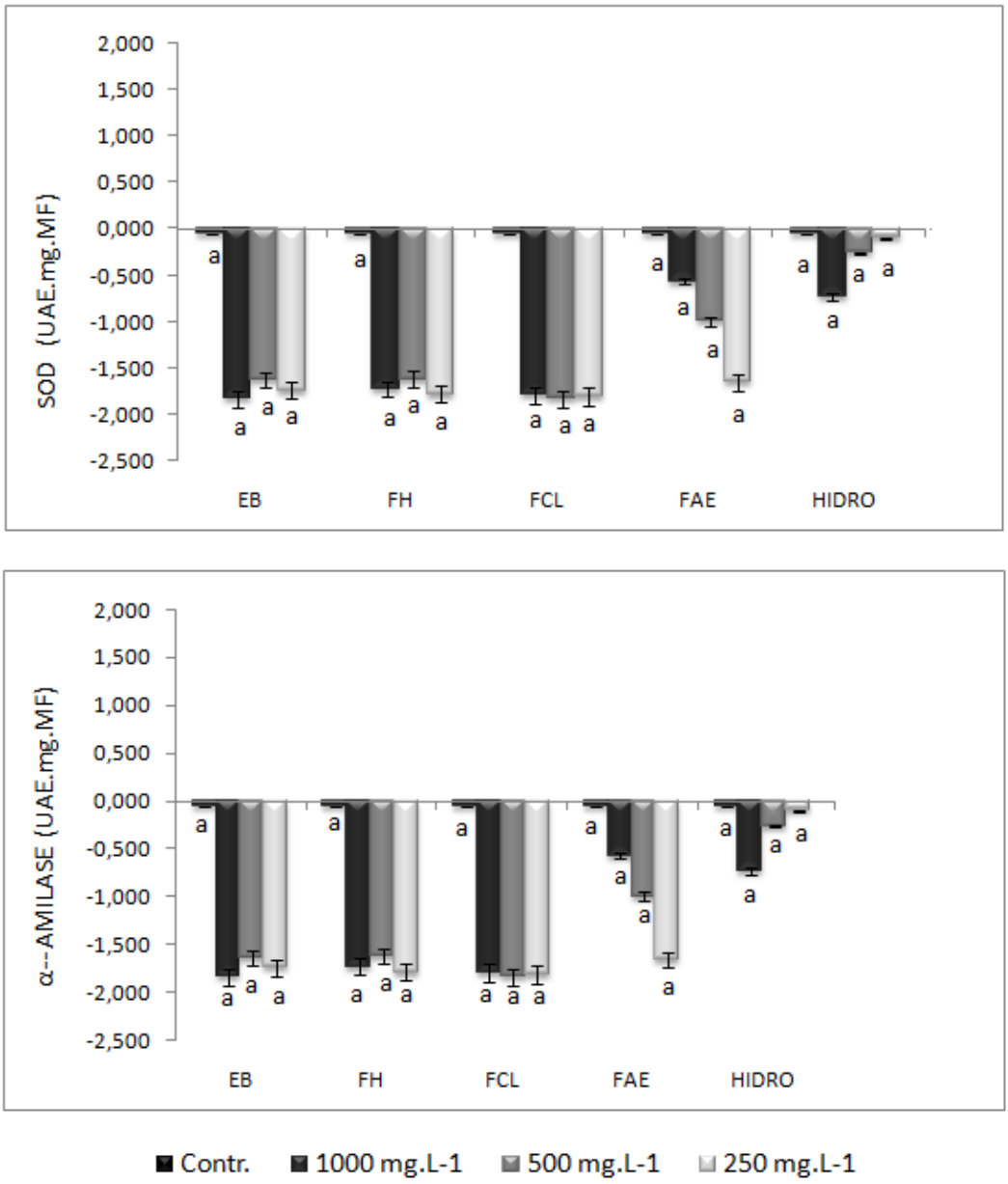


FIGURA 20 – ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD) E A- AMILASE, EM PLÂNTULAS DE *L. SATIVA* SUBMETIDAS À FRAÇÃO CLOROFORMIO (FH), FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (FAE) E FRAÇÃO HIDROALCOOLICA (HIDRO) DE *OCOTEA PULCHELLA*. MÉDIAS SEGUIDAS DE MESMA LETRA NÃO DIFEREM SIGNIFICATIVAMENTE ($P < 0,05$) EM COMPARAÇÃO COM A MÉDIA DO CONTROLE, PELO TESTE DE TUKEY.

5.4.6.5 Atividade da polifenoloxidase

Com relação à atividade da polifenoloxidase, foi verificado que houve variação na concentração desta enzima, sendo independente das concentração utilizadas. Valores significativos foram observados para o EEB na concentração de 1.000 $mg.L^{-1}$, com estímulo de 4,03 UEA. mg. MF e FCL na concentração de 500 $mg.L^{-1}$ com 4,49 UEA. mg. MF. também não sendo estatisticamente significativo quando comparado ao controle (Figura 21). A atividade da polifenoloxidase tem sido utilizada como parâmetro de avaliação da peroxidação de lipídios, e da produção de compostos fenólicos (MAYER, 1987). O acúmulo de compostos fenólicos e o aumento na atividade da polifenoloxidase podem gerar substâncias reativas, tais como as quinonas derivadas do ácido caféico que, juntamente com outros compostos fenólicos, são ativas na produção do superóxido ($O_2^{-\cdot}$) e, conseqüentemente, na peroxidação de lipídios (MARSCHNER, 1995).

5.4.6.6 Quantificação de proteínas totais

Na quantificação de proteínas pelo método de Bradford, foi observado que as maiores concentrações do extrato bruto, FH e FCL causaram aumento no conteúdo de proteínas totais (Figura 21). O EB na concentração de 1.000 $mg.L^{-1}$, causou estímulo de 5,64 UEA e na concentração de 500 $mg.L^{-1}$ 4,93 UEA., sendo estatisticamente significativo quando comparado ao controle (Figura 23). O decréscimo no conteúdo de proteína pode refletir o retardamento na síntese protéica ou aceleração na sua degradação, levando ao aumento na quantidade de aminoácidos livres ou à inibição da incorporação destes aminoácidos nas proteínas. Isso indica que, provavelmente, houve inibição da síntese protéica. Segundo Martinez e Cerda (1989), o estresse iônico interfere no transporte de nitrato dos vacúolos para o citoplasma, diminuindo assim a capacidade das células em incorporar nitrogênio (nitrato) para o crescimento, principalmente para a síntese de proteínas. Este fato foi associado ao decréscimo nos aminoácidos livres (GARG *et al.*, 1997).

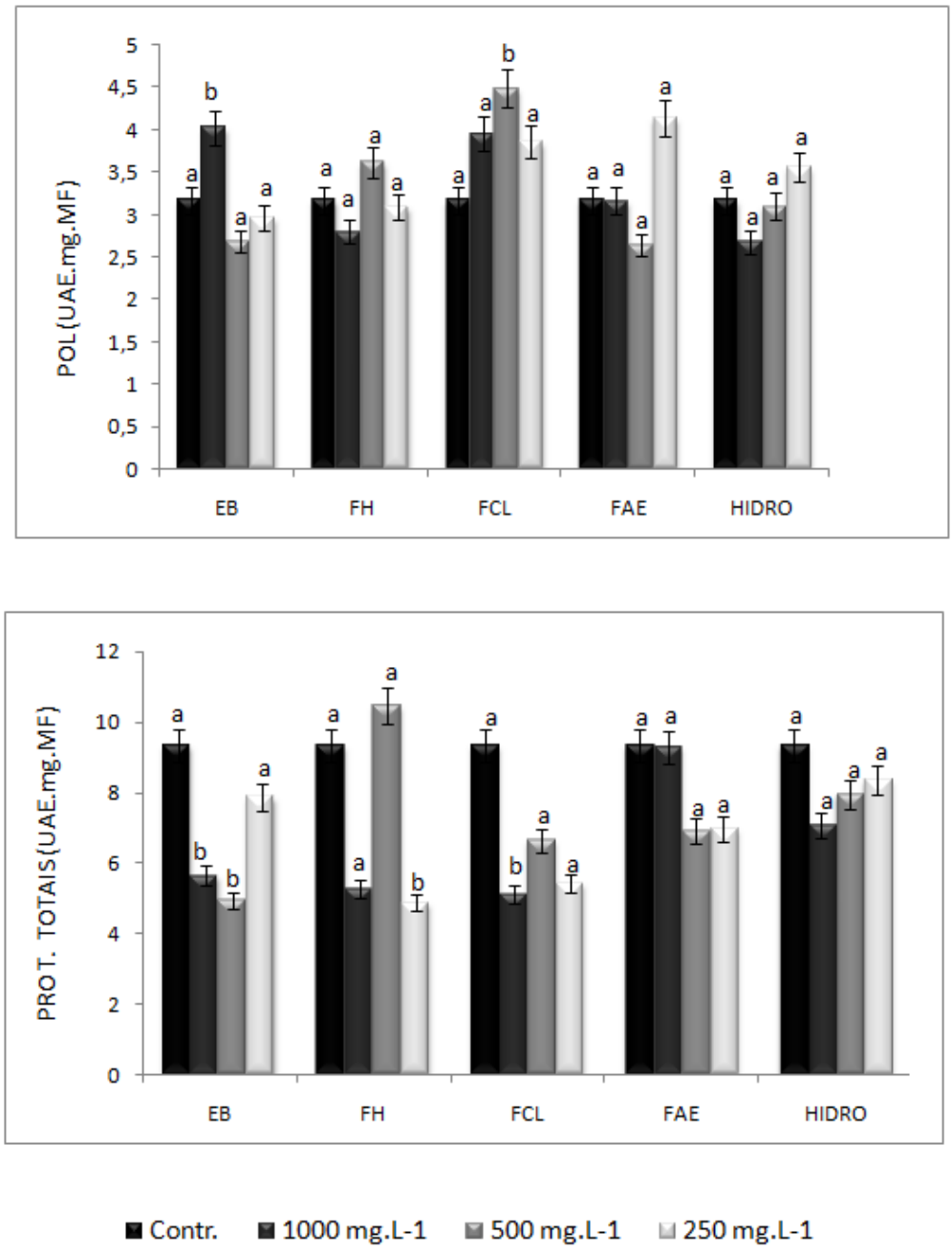


FIGURA 21 – ATIVIDADE DA POLIFENOLOXIDASE (POL) E PROTEÍNAS TOTAIS, EM PLÂNTULAS DE *L. SATIVA* SUBMETIDAS À FRAÇÃO CLOROFORMIO (FH), FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (FAE) E FRAÇÃO HIDROALCOOLICA (HIDRO) DE *OCOTEA PULCHELLA.* MÉDIAS SEGUIDAS DE MESMA LETRA NÃO DIFEREM SIGNIFICATIVAMENTE ($P < 0,05$) EM COMPARAÇÃO COM A MÉDIA DO CONTROLE, PELO TESTE DE TUKEY.

5.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

5.5.1 Avaliação da capacidade antioxidante pela formação de um complexo de fosfomolibdênio

A atividade antioxidante dos extratos e frações foi calculada em relação à vitamina C e a rutina, atividade considerada 100% como mostrado na Figura 22. Os resultados encontrados são mostrados nas Tabelas 7 e 8 e na Figura 22. De acordo com os dados obtidos é possível concluir que todos os extratos e frações testadas, apresentam atividade antioxidante por redução do complexo do fosfomolibdênio. Considerando as atividades da rutina e vitamina C como referências, todas as amostras apresentaram atividade antioxidante por redução do complexo do fosfomolibdênio, inferior a vitamina C, sendo que as amostra que demonstraram maior atividade (FC e FAE), apresentaram uma atividade em torno de 20% da atividade da vitamina C. Quando comparados à rutina essas amostras (FC e FAE) também se mostraram menos ativas que este padrão, mas com uma atividade entre 75 e 85% da atividade da rutina.

TABELA 7 – VALORES DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE POR FORMAÇÃO DE UM COMPLEXO DE FOSFOMOLIBDÊNIO DO EXTRATO E FRAÇÕES EM RELAÇÃO À VITAMINA C

Amostra	Absorbância	% em relação a vitamina C
Vitamina C	1,322	100
EE	0,253	19,11
FH	0,234	17,73
FC	0,310	23,45
FAE	0,287	21,71

TABELA 8 – VALORES DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE POR FORMAÇÃO DE UM COMPLEXO DE FOSFOMOLIBDÊNIO DO EXTRATO E FRAÇÕES EM RELAÇÃO À RUTINA

Amostra	Absorbância	% em relação a rutina
Rutina	0,367	100
EB	0,253	68,78
FH	0,234	63,79
FCL	0,310	84,39
FAE	0,287	78,13

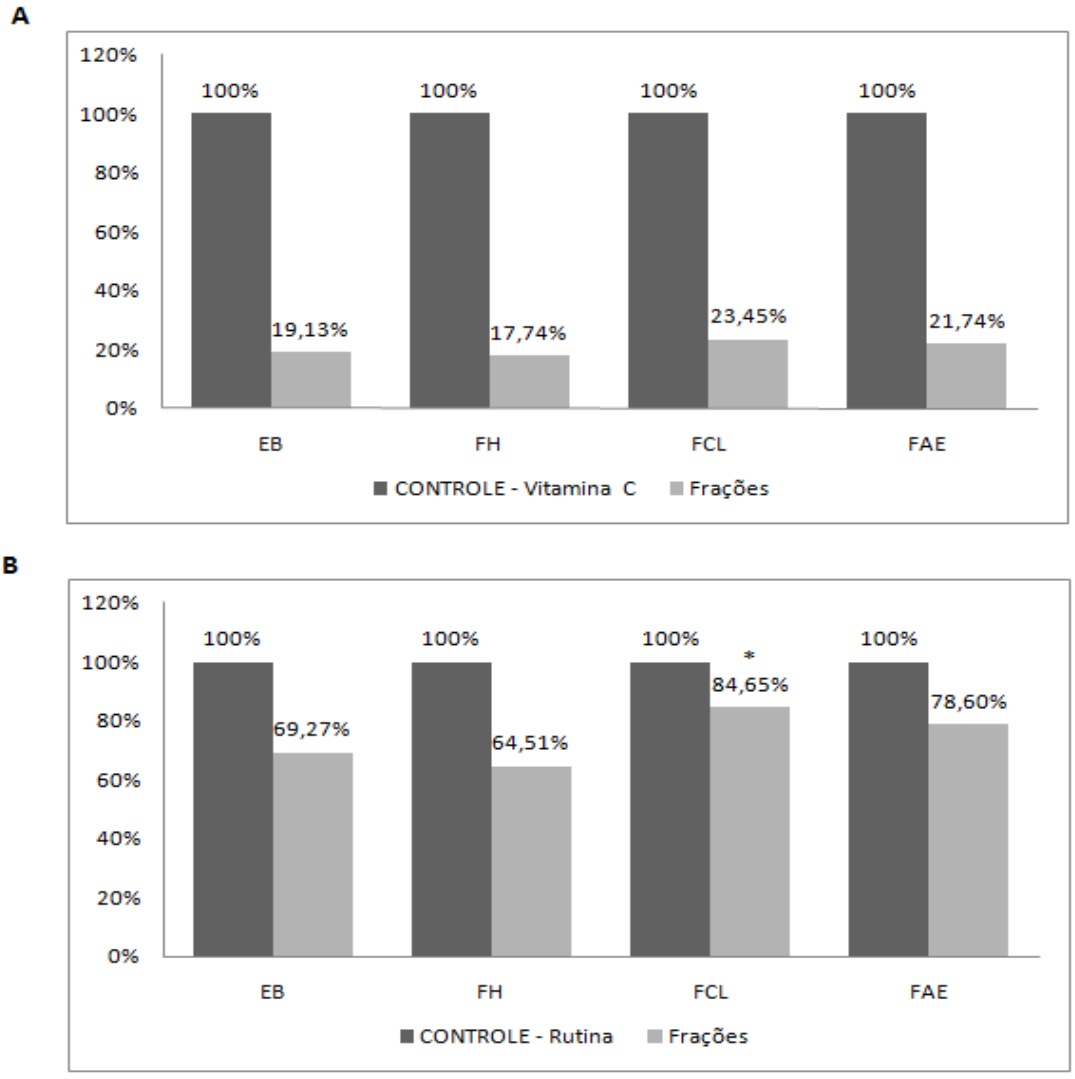


FIGURA 22 – PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO E FRAÇÕES EM RELAÇÃO A VITAMINA C (A) E RUTINA (B), PELA REDUÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO.

5.5.2 Avaliação do poder redutor

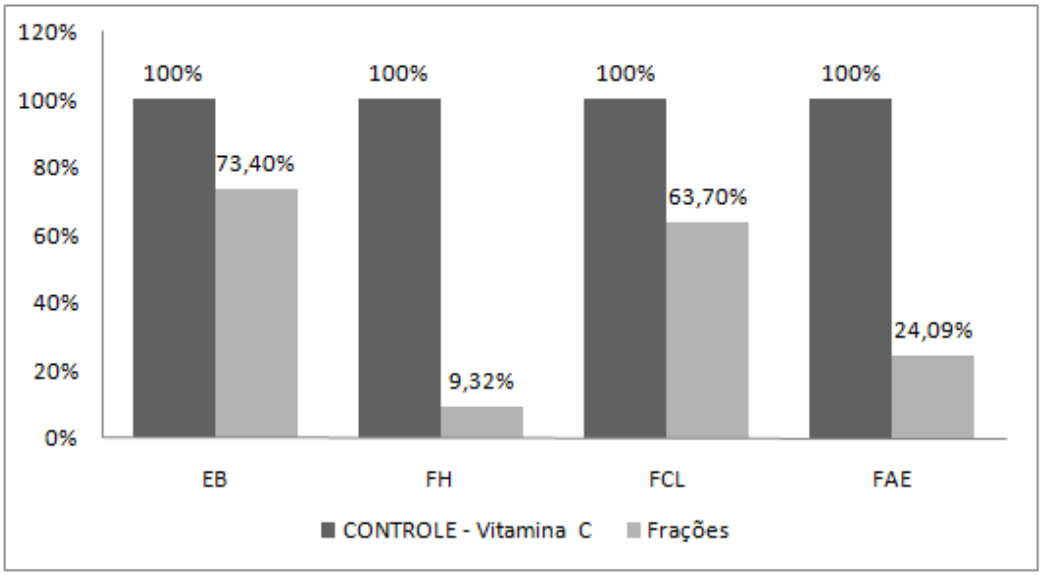
A avaliação do poder redutor dos extratos e frações foi calculada em relação à vitamina C e a catequina, atividade considerada 100%. Os resultados encontrados são mostrados na Tabela 9 e na Figura 23. De acordo com os dados obtidos é possível concluir que todos os extratos e frações testadas, apresentam atividade antioxidante pelo poder redutor de Fe^{+2}. Considerando as atividades da catequina e vitamina C como referências, todas as amostras apresentaram atividade antioxidante pelo poder redutor de Fe^{+2}, inferior a vitamina C, sendo que as amostra que demonstraram maior atividade, EE e FC, apresentaram uma atividade de 73,36% e 63,69% da atividade da vitamina C, respectivamente. Quando comparados à rutina essas amostras, EE e FC, também se mostraram menos ativas que este padrão e com atividade semelhante ao encontrado para vitamina C, mas com valores de 68,29% e 59,28% da atividade da rutina, respectivamente.

TABELA 9 – VALORES DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO PODER REDUTOR DE FE^{+2} DO EXTRATO E FRAÇÕES EM RELAÇÃO A VITAMINA C (A) E RUTINA (B)

[A]Amostra	Absorbância	% em relação a vitamina C
Vitamina C	1,041	100
EB	0,764	73,36
FH	0,097	9,29
FCL	0,663	63,69
FAE	0,251	24,14

[B]Amostra	Absorbância	% em relação a catequina
Catequina	1,118	100
EE	0,764	68,29
FH	0,097	8,64
FC	0,663	59,28
FAE	0,251	22,47

A



B

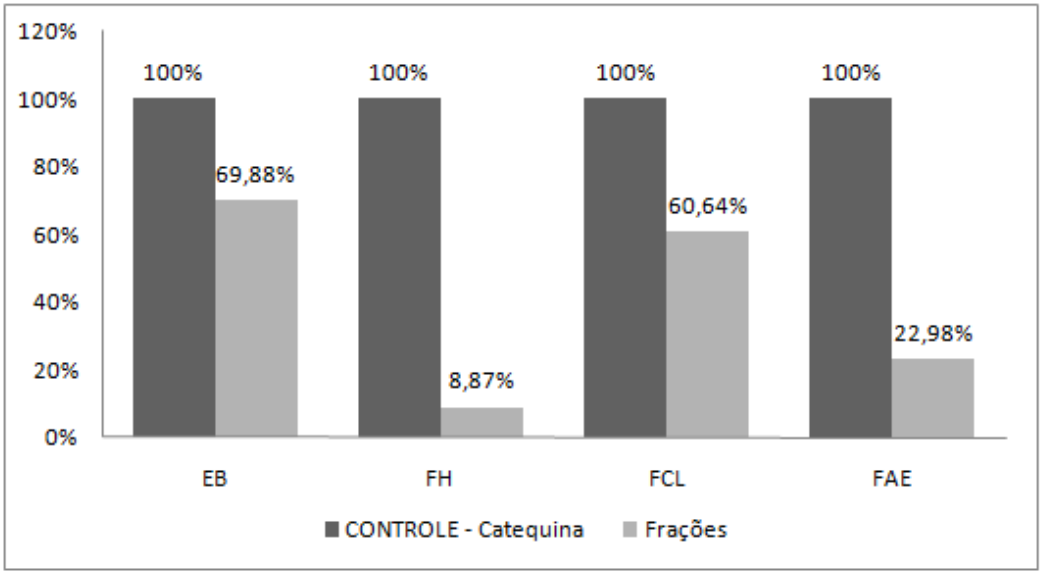


FIGURA 23 – PERCENTAGEM DE INIBIÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO E FRAÇÕES EM RELAÇÃO A VITAMINA C (A) E CATEQUINA (B) PELA AVALIAÇÃO DO PODER REDUTOR DE FE^{+2}

5.5.3 Avaliação da capacidade antioxidante contra radical livre estável DPPH•

A atividade antioxidante dos extratos e frações foi calculada em relação ao controle positivo com atividade considerada 100%. Os resultados encontrados são mostrados nas Tabelas 10, 11, 12 e nas Figuras 24, 25, 26 e 27.

De acordo com os dados o btidos é possível concluir que a curva de calibração do extrato bruto, fração hexano, fração clorofórmio, fração acetato de etila e hidroalcoolica encontra-se de acordo podendo seguir para o cálculo do IC 50 de extrato, frações e do padrões ácido ascórbico e rutina. Quanto menor for o valor do IC_{50}, maior é a capacidade antioxidante da substância. Os resultados do IC_{50} são apresentados na Tabela 11, corresponde à média das repetições.

Os resultados foram analisados estatisticamente, para verificar a diferença estatística entre as amostras utilizando-se ANOVA, e para localizar as diferenças o teste de Tukey ($p<0,05$).

Por meio destas análises verificou-se que todas as amostras diferem estatisticamente entre si. As FCL e FAE possuem atividade antioxidante menor que à vitamina C e rutina. Através da média da equação da reta obtida nos Figura 19 e 20 e considerando que o valor de y: 50, tem-se como resultado (24,81 mg/mL) para o FCL e (16,13 mg/mL) para FAE. Este valor significa que é necessária esta concentração para reduzir 50% da concentração inicial de DPPH.

Nenhuma das frações apresentaram atividade antioxidante acima de 500 µg/mL, sendo considerada uma atividade fraca, são menos ativas do que os padrões e amostras analisadas, sendo necessário uma quantidade maior de amostra para reduzir 50% da concentração de DPPH.

TABELA 10 – VALORES DA ABSORBÂNCIA DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÃO HEXÂNICA CONTRA RADICAL LIVRE ESTÁVEL DPPH• EM RELAÇÃO AO CONTROLE POSITIVO

Extrato Bruto		
µg/2,5 mL	ABS	%
25	0,152	81,00
15	0,410	48,75
10	0,555	30,63
5	0,637	20,38
2	0,790	1,25
Controle	0,800	100

Fração Hexânica		
µg/2,5 mL	ABS	%
130	0,100	85,71
100	0,141	79,86
70	0,292	58,29
40	0,436	37,71
10	0,583	16,71
Controle	0,700	100

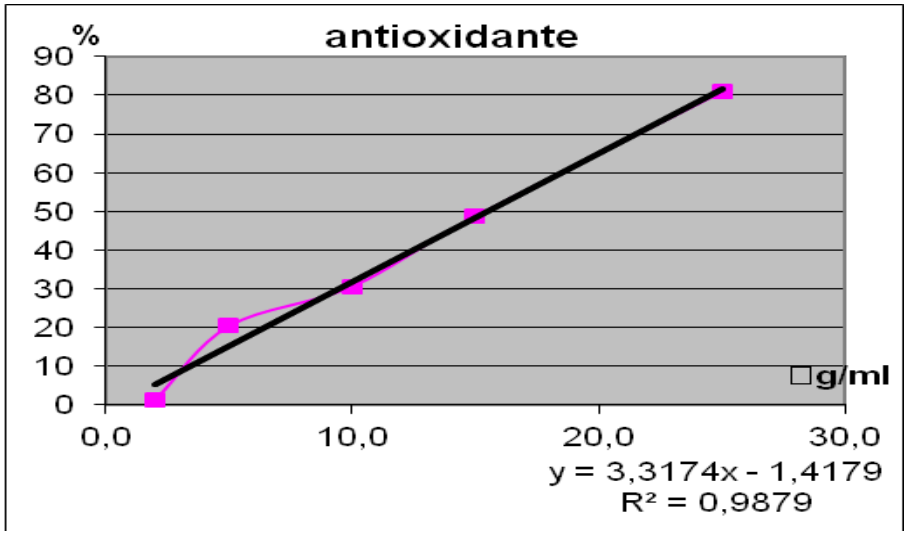


FIGURA 24 – CURVA DE CALIBRAÇÃO DO EXTRATO BRUTO CONTRA RADICAL LIVRE ESTÁVEL DPPH• EM RELAÇÃO AO CONTROLE POSITIVO

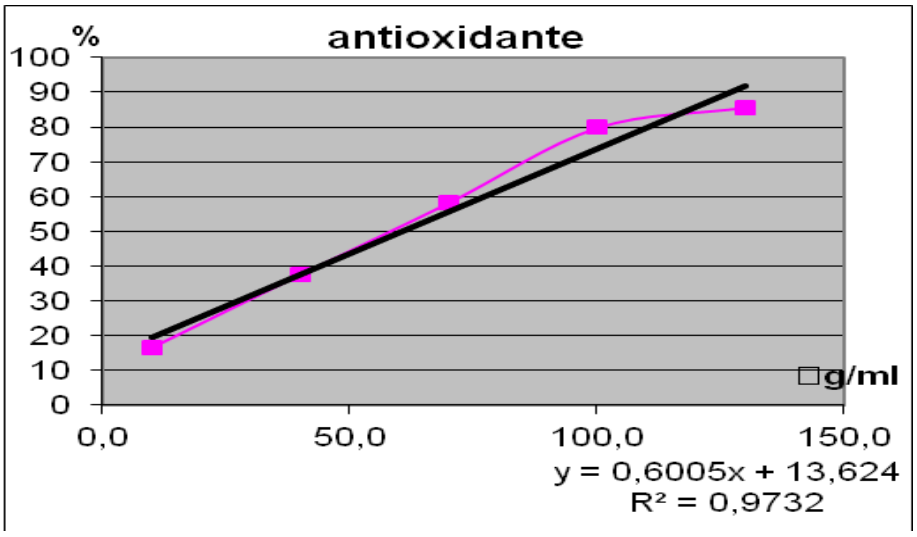


FIGURA 25 – CURVA DE CALIBRAÇÃO DA FRAÇÃO HEXANO CONTRA RADICAL LIVRE ESTÁVEL DPPH• EM RELAÇÃO AO CONTROLE POSITIVO.

TABELA 11 – VALORES DA ABSORBÂNCIA DA FRAÇÃO CLOROFORMIO CONTRA RADICAL LIVRE ESTÁVEL DPPH• EM RELAÇÃO AO CONTROLE POSITIVO

Fração Clorofórmio

µg/2,5 mL	ABS	%
3	0,116	84,37
20	0,261	64,82
10	0,458	38,27
5	0,557	24,93
1	0,653	11,99
Controle	0,742	100

Fração Acetato de Etila

µg/2,5 mL	ABS	%
15	0,099	85,96
7	0,325	53,90
1	0,505	28,37
0,5	0,550	21,99
0,2	0,510	19,15
Controle	0,705	100

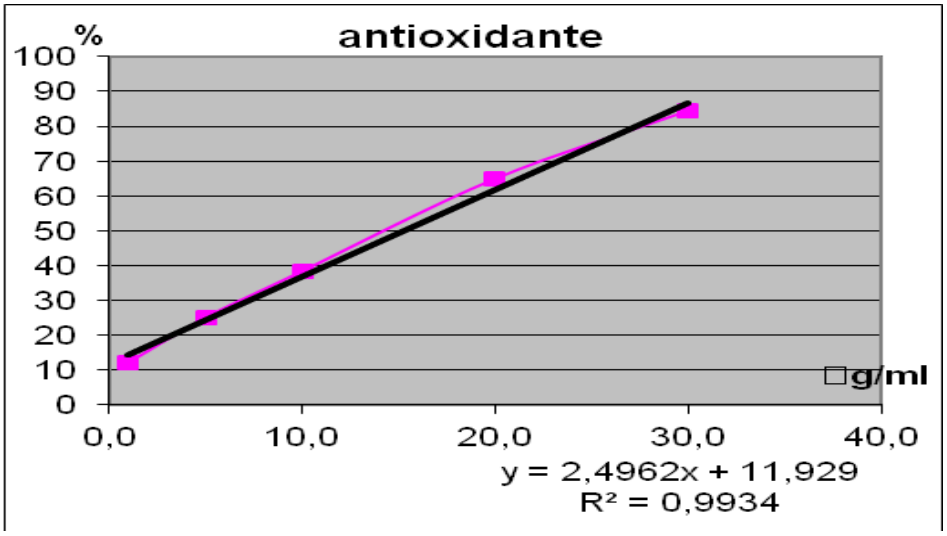


FIGURA 26 – CURVA DE CALIBRAÇÃO DA FRAÇÃO CLOROFORMIO CONTRA RADICAL LIVRE ESTÁVEL DPPH• EM RELAÇÃO AO CONTROLE POSITIVO

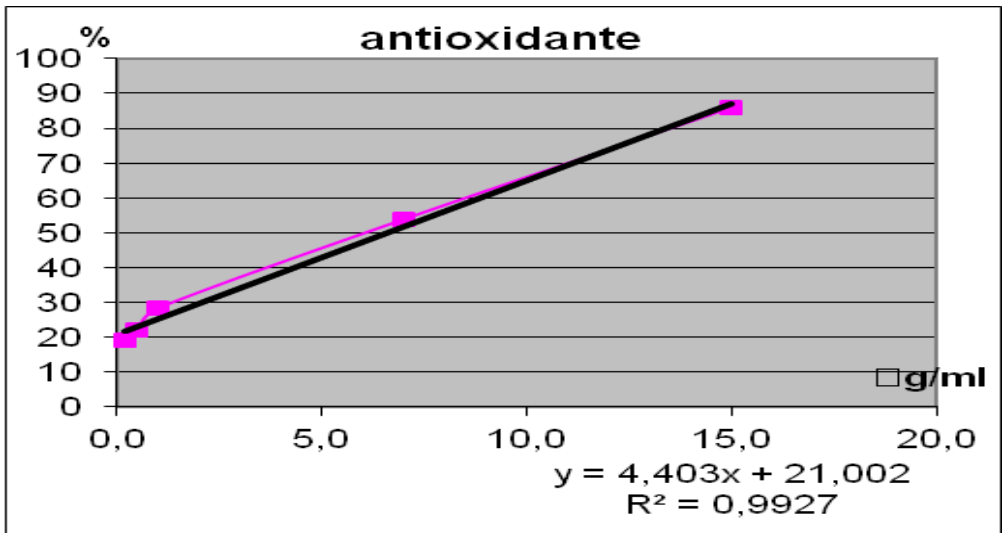


FIGURA 27 – CURVA DE CALIBRAÇÃO DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA CONTRA RADICAL LIVRE ESTÁVEL DPPH• EM RELAÇÃO AO CONTROLE POSITIVO

TABELA 12 – RESULTADO DE IC_{50} E TESTE DE TUKEY PARA REDUÇÃO DO DPPH

Amostra	**Média IC_{50} (µm)**	**Resultado do Teste de Tukey**
Vitamina C	8,65	a^1
Rutina	14,43	a^2
Extrato Bruto	15,50	a^3
Fração Hexano (FH)	105,16	a^4
Fração Clorofórmio (FCL)	24,81	a^5
Fração Acetato de etila (FAE)	16,13	a^6

(*) – Amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente

5.6 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE FRENTE À *Artemia salina*

Com relação aos resultados obtidos para a toxicidade em *Artemia salina*, pode-se observar que entre as amostras testadas apenas a FCL, FAE e HIDRO (Tabela 13) possuiram toxicidade significativa frente a este crustáceo, pois 172,78 µg/mL foram capazes de provocar a mortalidade de 50% dos náupilos. Este resultado também sugere uma considerável bioatividade frente à *Artemia salina*, pois segundo Meyer *et al.* (1982), extratos com valores de CL_{50} inferiores a 1000 µg/mL são considerados bioativos. O EB e a fração FH não apresentaram toxicidade frente à *Artemia salina*, pois os valores de CL_{50} foram maiores que 1000 µg/mL.

TABELA 13 – MORTALIDADE DE *ARTEMIA SALINA E* ESTIMATIVA DE CL_{50}

Amostra	**100 (µg/mL)**	**250 (µg/mL)**	**500 (µg/mL)**	**1000 (µg/mL)**	**CL 50**
EB	0	0	0	0	>1000
FH	0	0	0	3	>1000
FCL	0	5	2	1	< 1000
FAE	0	4	4	8	< 1000
HIDRO	5	5	5	5	< 1000

Nota : A = amostra, CL50 = concentração média letal

5.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA FRENTE AO *AEDES AEGYPTI*

Foram submetidas a esta avaliação amostras das FAE e HIDRO por estas terem apresentado resultados significativos frente ao ensaio com *Artemia salina*. Conforme os resultados que estão demonstrados na Figura 28, pode-se observar que todas as amostras testadas possuiram atividade larvicida significativa frente a larva do *Aedes Aegypti*. Este resultado também sugere uma relação causa e efeito, pois as quantidades de larvas mortas foram diminuindo com as menores concentrações da fração em estudo.

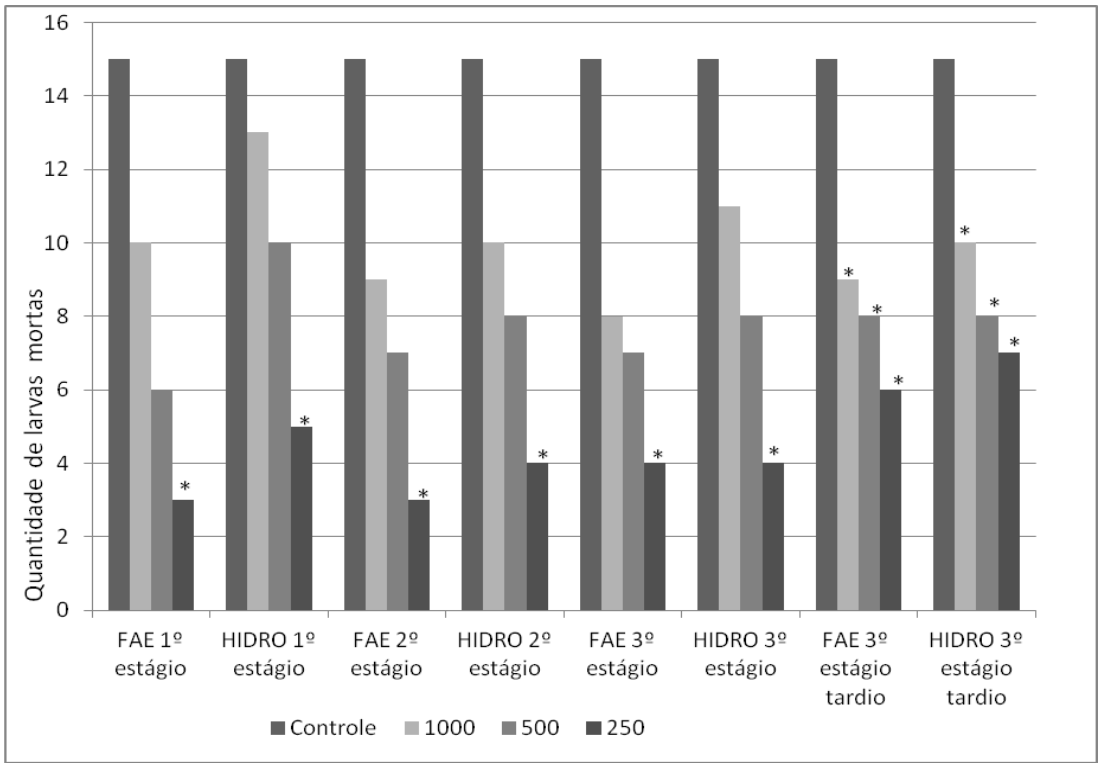


FIGURA 28 – ATIVIDADE LAVIRCIDA, EM *AEDES AEGYPTI* SUBMETIDAS À FRAÇÃO FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (FAE) E HIDROALCOOLICA (HIDRO) DE *OCOTEA PULCHELLA*.

5.7.1 Período de atividade larvicida

Com relação ao período de atividade larvicida as larvas do 1º, 2º, 3º e 3º estágio tardio, submetidas a FAE e HIDRO apresentaram efeito nas 16 horas de exposição (Figura 29 e 30). Já os demais estágios provocaram a mortalidade em um espaço de tempo mais curto, sendo que antes das 24 horas, havia causado mortalidade em todas as larvas investigadas. Com estes resultados pode-se inferir que a FAE e HIDRO possuem atividade larvicida por serem efetivos em todos os estágios, além de atuarem na mortalidade em um curto espaço de tempo. A concentração que causou mortalidade nas primeiras horas observadas foi capaz de causar mortalidade superior a 70% após 24 horas.

Tendo em vista os resultados obtidos, pode-se sugerir que os extratos aqui investigados são promissores como agente larvicida, pois de acordo com a literatura (CHENG et al., 2003), substâncias com valores de CL50 menores que 100µg/mL são consideradas bons agentes larvicidas.

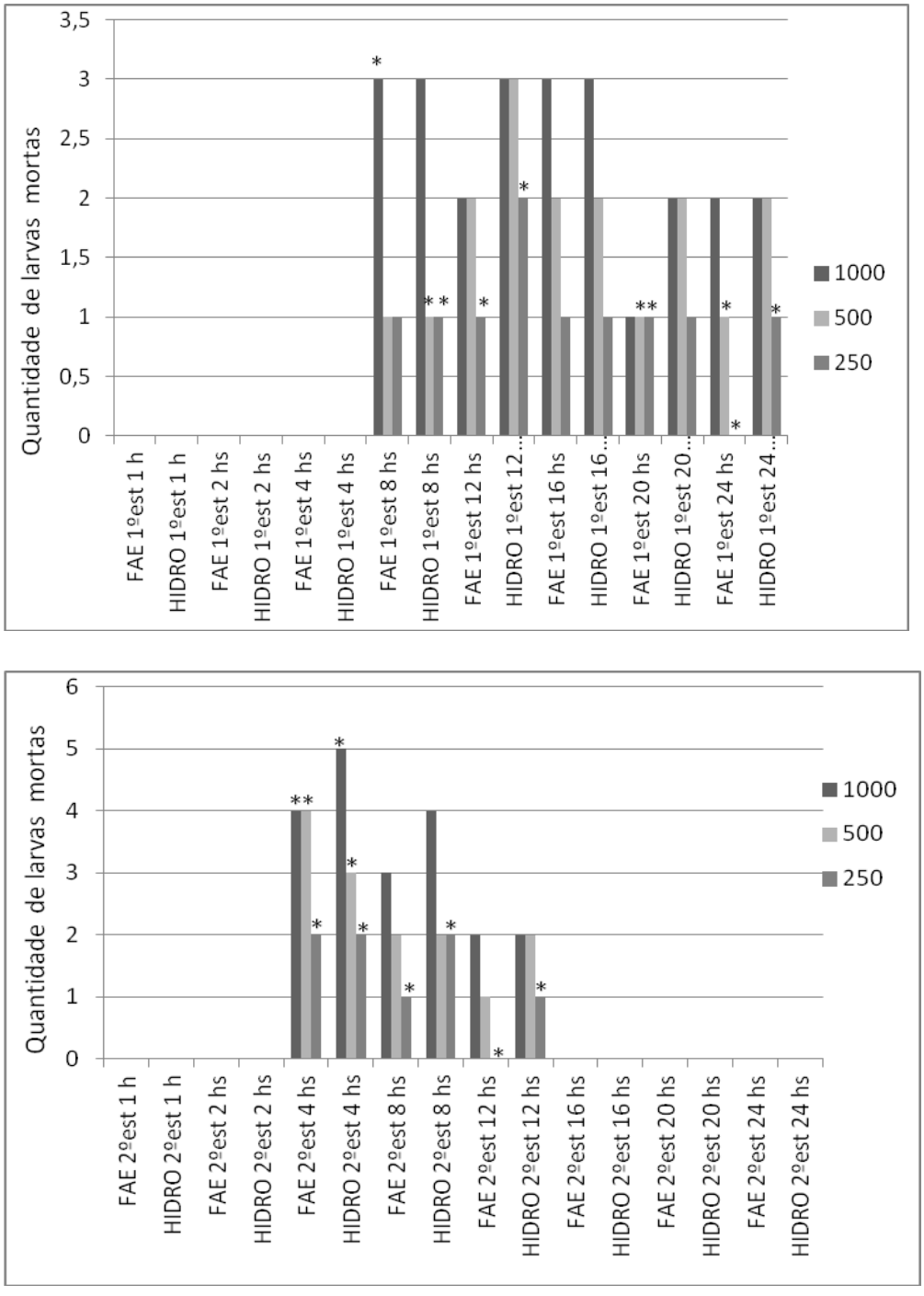
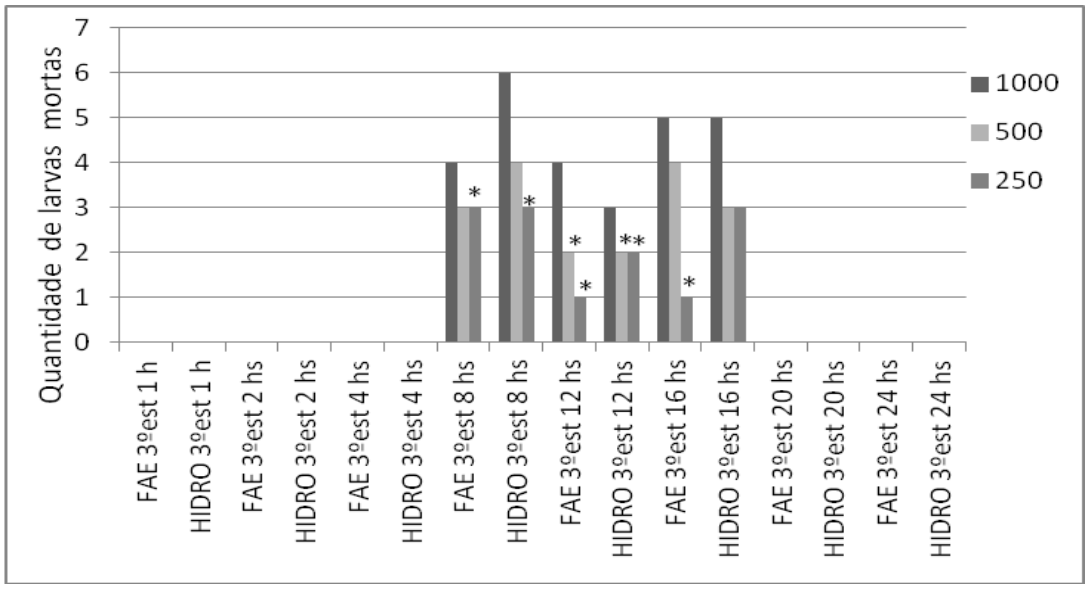


FIGURA 29 – PÉRIODO DE ATIVIDADE LAVIRCIDA, EM LARVAS DE 1º E 2º ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO DE *AEDES AEGYPTI* SUBMETIDAS À FRAÇÃO FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (FAE) E HIDROALCOOLICA (HIDRO) DE *OCOTEA PULCHELLA*.



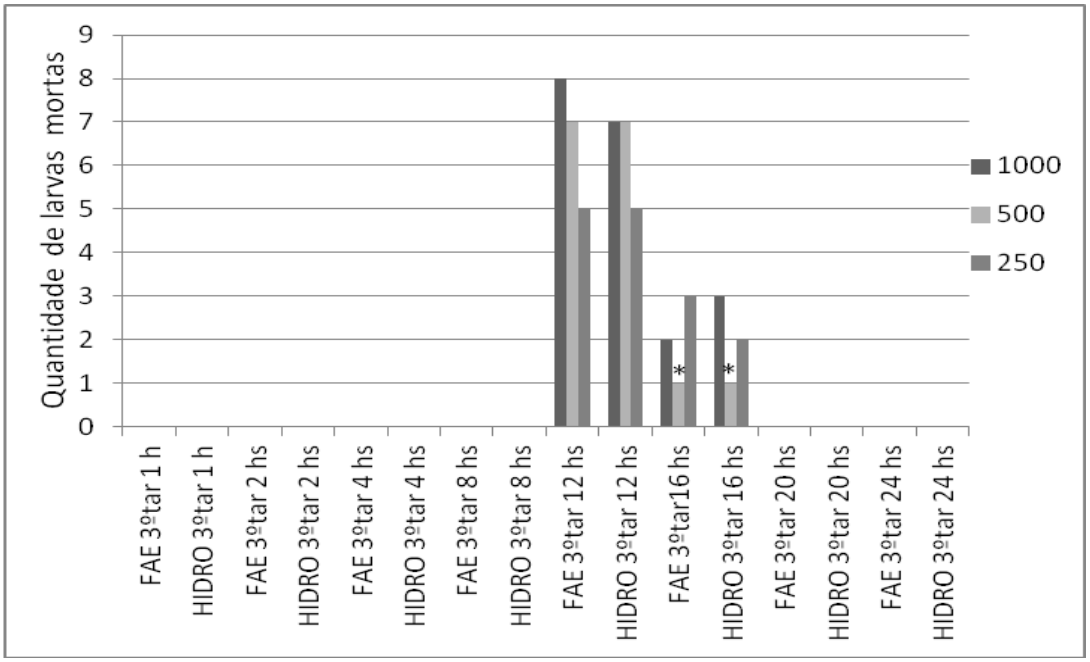


FIGURA 30 – PÉRIODO DE ATIVIDADE LAVICIDA, EM LARVA DE 3º E 3º ESTÁGIO TARDIO DE *AEDES AEGYPTI* SUBMETIDAS À FRAÇÃO FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (FAE) E HIDROALCOOLICA (HIDRO) DE *OCOTEA PULCHELLA*.

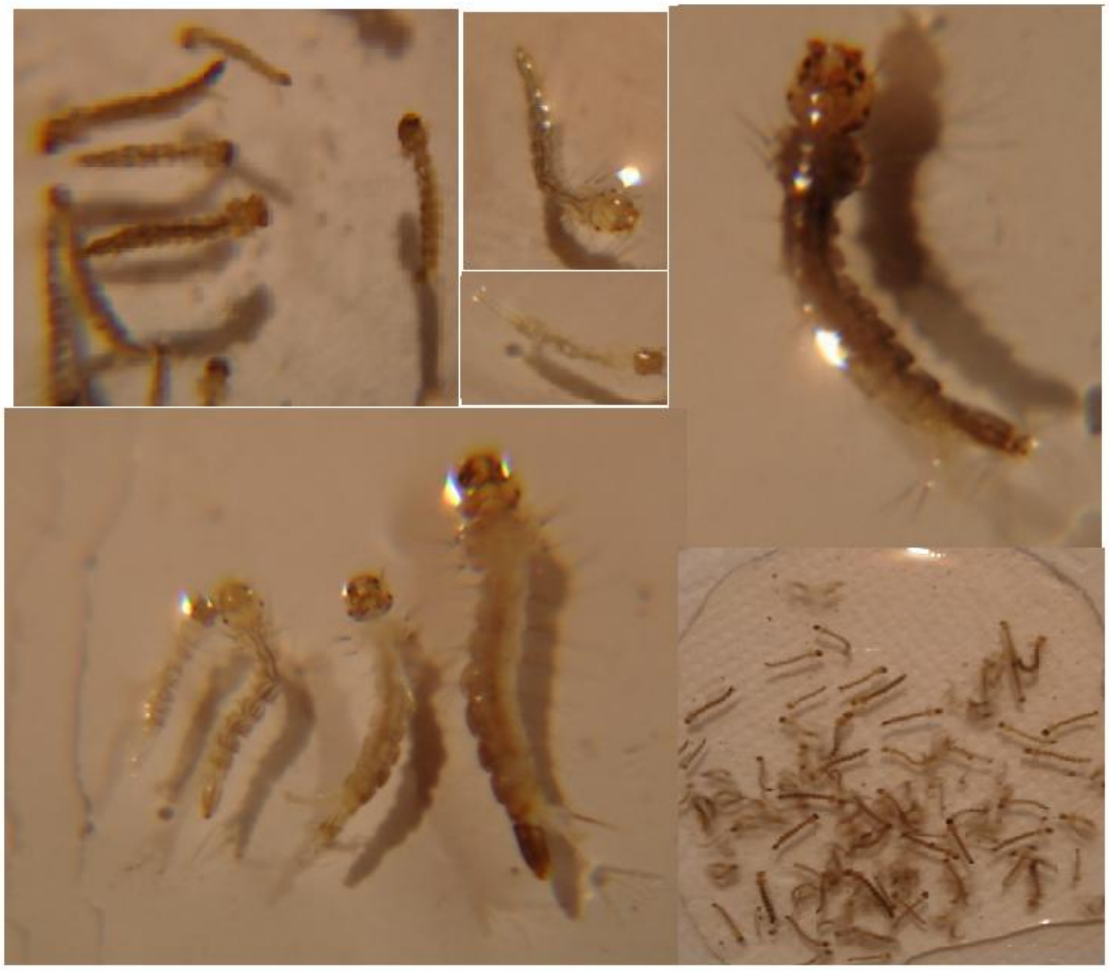


FIGURA 31 – LARVAS DE *AEDES AEGYPTI* SUBMETIDAS AOS BIOENSAIOS COM AS FRAÇÕES ACETATO DE ETILA (FAE) E HIDROALCOOLICA (HIDRO) DE *OCOTEA PULCHELLA*. FONTE: O AUTOR (2011)

5.7.2 Taxa de sobrevivência

Os resultados da taxa de sobrevivência corroboram com os resultados obtidos para atividade larvicida realizada, e pode ser inferida uma relação entre causa e efeito, pois as quantidades de larvas vivas foram aumentando com a menor concentração das frações em estudo (Figura 32).

Portanto, na ausência de produtos que possuam compostos altamente letais, um produto de origem botânica capaz de prolongar o desenvolvimento de imaturos e inibir a eclosão de adultos pode ser essencial no controle de vetores. O prolongamento do estágio imaturo de *A. aegypti* em campo além de diminuir o número de gerações, o deixará exposto por um período maior de tempo a condições adversas.

Conforme Shaalan *et al.* (2005), a aplicação de produtos naturais em doses sub-letais podem não só levar a novas estratégias de controle, mas podem inibir o desenvolvimento de resistência dos insetos aos inseticidas sintéticos existentes.

Assim, os resultados obtidos nestes bioensaios confirmam o potencial larvicida e o considerável efeito inibidor da emergência do adulto, causados por FAE e HIDRO da *O. pulchella* sobre *A. aegypti*. Estes resultados evidenciam que os efeitos da espécie investigada sobre a biologia de *A. aegypti*, são ocasionados pela diversidade de compostos químicos presentes nestes produtos de origem botânica que atuam sinergicamente.

Apesar de FAE e HIDRO da *O. pulchella* apresentarem considerável atividade inseticida contra mosquitos, ainda permanece desconhecido o papel individual de seus principais componentes bioativos no controle do principal vetor do vírus da dengue. Novas investigações são necessárias para determinar a atividade larvicida, de *O. pulchella* sobre outras distintas espécies de mosquitos. Do mesmo modo, identificar os principais componentes da *O. pulchella* que atuam na atividade larvicida e inibição na eclosão de adultos. A fim de utilizá-los na preparação de uma formulação comercial, capaz de causar letalidade larval além de inibir a eclosão de adultos.

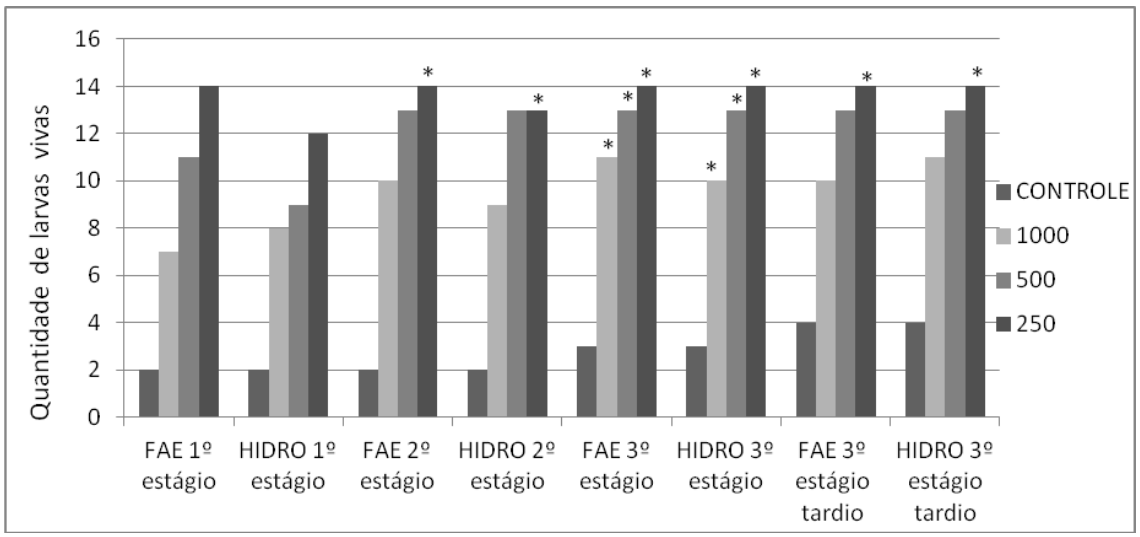


FIGURA 32 – TAXA DE SOBREVIVÊNCIA DAS LARVAS DE *AEDES AEGYPTI* SUBMETIDAS À FRAÇÃO FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (FAE) E HIDROALCOOLICA (HIDRO) DE *OCOTEA PULCHELLA*.

5.7.3 Reversibilidade

Com relação ao ensaio de reversibilidade foi observado que o mesmo ainda causou a mortalidade das larvas após submetido aos extratos (Figura 33), demonstrando assim que o efeito da FAE e HIDRO sobre as larvas são prolongados. Este efeito é mais pronunciado na concentração de 250 $mg.L^{-1}$ podemos inferir que estas frações são ativas mesmo em baixas concentrações, não existindo uma relação de dose- dependência. As alterações no período de desenvolvimento de *A. aegypti*, expostos a concentrações sub-letais de *O. pulchella*, pode prolongar o estágio imaturo provocando alterações morfológicas que inviabilizam a emergência de adultos e demonstram a eficácia destas frações no controle deste vetor.

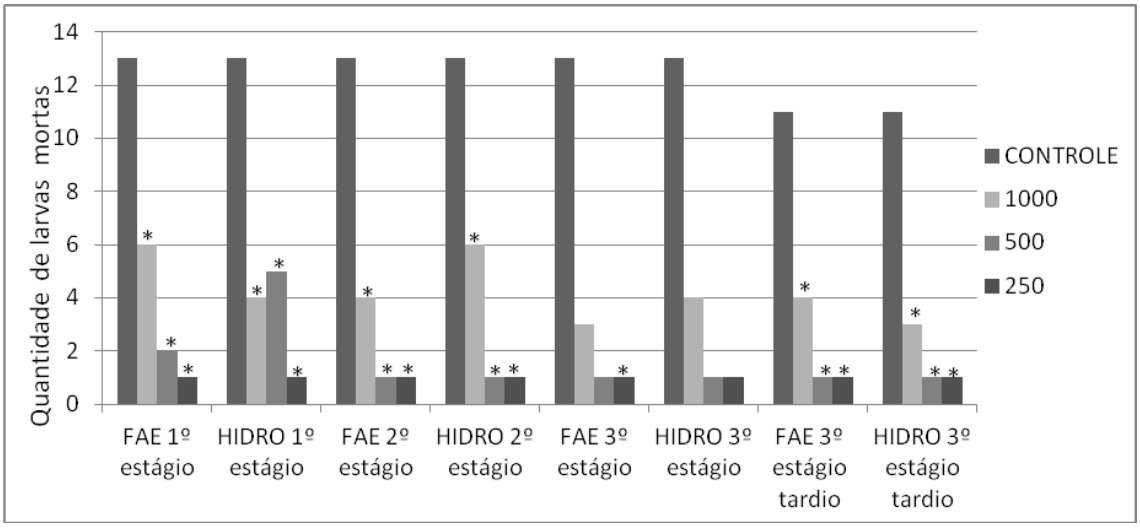


FIGURA 33 – ENSAIO DE REVERSIBILIDADE DAS LARVAS DO AEDES AEGYPTI SUBMETIDAS À FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (FAE) E HIDROALCOOLICA (HIDRO) DE *OCOTEA PULCHELLA*.

CONCLUSÃO

Considerando os objetivos propostos para este trabalho de estudo da composição fitoquímica e avaliação das atividades alelopática, antioxidante, antilarvicida e citotóxica pode-se fazer algumas conclusões:

- A espécie *Ocotea pulchella* Mart., pertencente à família Lauraceae, não apresenta descrição na literatura sobre sua composição fitoquímica. Em uma pesquisa fitoquímica preliminar, esta espécie evidenciou a presença de grupos fitoquímicos como: leucoantocianidinas,flavonoides (flavonois e heteroídeos flavônicos), esteróides, triterpenos, taninos condensados e hidrolisáveis. Foi isolado e identificado um composto, como sendo um flavonoides: que foi identificado como quercetina
- Nos bioensaios de atividade alelopática, foi verificado que os extratos não afetam a germinação, mas causam interferência no crescimento, sendo estes efeitos decorrentes do estresse oxidativo, observado pelo aumento das enzimas antioxidantes. Estes dados corroboram com os obtidos no índice mitótico, e com as alterações mutagênicas observadas
- Os extratos causaram interferência nos processos fisiológicos da espécie investigada. Entretanto os efeitos mais acentuados foram observados para a FAE e HIDRO com maior interferência nas enzimas antioxidantes e FH quando se avalia a taxa de crescimento, e são independentes das concentrações utilizadas, e não afetam a espécie investigada, quando se avalia o gasto energético.
- De acordo com os dados obtidos é possível concluir que todos os extratos e frações testadas, apresentam atividade antioxidante por redução do complexo do fosfomolibdênio, pelo poder redutor de Fe^{2+}, Nenhuma das frações apresentaram atividade antioxidante acima de 500 µg/mL, sendo considerada uma atividade pouco acentuada.
- Apenas as FCL, FAE e HIDRO possuíram toxicidade significativa frente *A. salina,*
- Nos ensaios de atividade larvicida, a FAE e HIDRO mostraram- se promissoras no controle e prevenção de *A. aegypti*, sendo o efeito observado

após 16 horas de exposição, e podem provocar alterações morfológicas que inviabilizam a emergência de adultos e demonstram a eficácia destas frações no controle deste vetor.

A soma destes resultados abre espaço para a busca de outras atividades das amostras testadas, principalmente das frações clorofórmio pelo seu potencial antioxidante e das frações acetato de etila e hidroalcoólica pelo seu potencial antilarvicida bem como da substância identificada.

REFERÊNCIAS

ABDOLLAHI, M. et al. Pesticides and oxidative stress: a review. **Medical Science Monitor**, Warsaw, v.10, n.6, p.RA144-147. 2004.

ADEGAS, F.S.; VOLL, E.; PRETE, C.E.C. Embebição e germinação de sementes de picão-preto (*Bidens pilosa*). V. 21, n. 1, p. 21-25, 2003;

AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Methods. Enzymology**. v.105, p121-126, 1984.

AMAKO, K., CHEN, G. X.; ASADA, K. Separate assays specific for ascorbate peroxidase and guaiacol peroxidase and for the chloroplastic and cytosolic isozymes of ascorbate peroxidase in plants. **Plant Cellular Physiology**, v.35, n.3, p.497-504, 1994.

AMER, A.; MEHLHORN, H. Larvicidal effects of various essential oils against *Aedes*, *Anopheles*, and *Culex* larvae (Diptera, Culicidae). **Parasitology Research,** v. 99, p. 466-472, 2006a.

AMER, A.; MEHLHORN, H. Persistency of larvicidal effects of plant oil extracts under different storage conditions. **Parasitology Research**, v. 99, **p**. 473-477, 2006b.

ANDERSEN, O. M.; MARKHAM, K. R. Flavonoids, Chemistry, Biochemistry and Applications**. CRC Press**, New York, 2006.

AOAC (Association Of Official Agricultural Chemists), **Official methods of analysis**. 10 ed. Washington: Editorial Board, 909p, 1965.

AOUAD, A.; BAAZIZ, M.; MERGOUM, M. Quantitative aspects of peroxidases in some moroccan cereal varieties. In: **Actes des Premieres Journees de l'Arbre. Morrocco:** Laboratorie de Biochimie Amélioration des Plantes/Université Cadi Ayyad, 1998. 7p

ARBOS, K. A. **Estudo do potencial antioxidante de vegetais da família Cruciferae de diferentes cultivos**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Área de Medicamentos, Insumos e Correlatos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

ARNON, D. J.,Copper enzymes in isolated chloroplast polyphenoloxidases in *Beta vulgaris*,**Plant Physiol,**v.24, p.1-15,1949.

ATTARD, E.;BRINCAT, M. P.;CUSCHIERI, A. Immunomodulatory activity of cucurbitacin E isolated from Ecballium elaterium. **Fitoterapia**, Milano, v.76, n.5, p.439- 441. 2005.

BALLABENI, V., et. al. Ocotea quixos Lam. essential oil: In vitro and in vivo investigation on its anti-inflammatory properties, **Fitoterapia**, 2009.

BALERONI C.R.S., FERRARESE, M.L.L.; SOUZA, N.E.; FERRARESE, F.O. Lipid accumulation during canola seed germination in response to cinnamic acid derivatives. **Biology Plantarum**, v.43, v. 2, p.313-316, 2000.

BALESTRIN, L. **Estudo fitoquímico e avaliação das atividades alelopáticas, antibacteriana e antioxidante de *Dorstenia multiformis* Miquel, Moraceae**. 117 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

BANCROFT TL. On the etiology of dengue fever**. Australasian Medical Gazette**. 25: 17-18, 1906.

BARNES, J.P.; Putnan, A.R.; Burke, B.A. & Aasen, A.J. Isolation and characteriza-tion of allelochemicals in rye herbage. **Phytochemistry**, v.26 n.5, p.1385-1390, 1987.

BARRERA, E. D. C., SUAREZ, L. E. C. Aporphine alkaloids from leaves of *Ocotea macrophylla* (Kunth) (Lauraceae) from Colombia**, Biochemical Systematics and Ecology**, v. 37, p. 522–524, 2009.

BIANCO, E.M. **Química e potencial antioxidante de folhas e caules de *Bauhinia microstachya* (Raddi) Macbr., Caesalpiaceae**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2003.

BORTOLOTTO, Tiago. **Avaliação da atividade tóxica e genotóxica de percolados do aterro sanitário de Sombrio-SC, utilizando *Artemia sp. e Allium cepa L*.** 2007. 79 f. Trabalho de conclusão de curso (graduação em Ciências Biológicas) Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma.

BOTSARIS, A. S. Plants used traditionally to treat malaria in Brazil: the archives of Flora Medicinal. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v.18, n.3, 2007.

BRADFORD, M. M. A rapid e sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analitycal Biochemistry,** v.72, p.248-254, 1976.

BROTTO, M. L**. Estudo taxonômico do gênero *Ocotea* aubl. (lauraceae) na floresta ombrófila densa no estado do Paraná.** 92 f. (Mestrado em botânica, Universidade Federal do Paraná), 2010.

BUEGE, J.A.; AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, v.52, p.302-310, 1978.

BÜRGER, D. Ações da Quercetina como Agente Cicatrizante. **Revista Ciência em Curso**, v.3, n.2, 2008.

CABRAL, M.M.O. et. al. Neolignans from plants in northeastern Brazil (Lauraceae) with activity against Trypanosoma cruzi, **Experimental Parasitology**, v.124, p. 319–324, 2010;

CAKMAK, I.; HORST, W.J. Effect of aluminum on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). **Physiologia Plantarum**, v.83, n.4, p.463-468, 1991.

CARMO, F.M.S.; BORGES, E.E.L.; TAKAKI, M. Alelopatia de extratos aquosos de canela-sassafrás (*Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer). **Acta botânica Brasílica**, v. 221, n. 3, p. 697-705, 2007.

CARVALHO, S.I.C. **Caracterização dos efeitos alelopáticos de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu no estabelecimento das plantas de *Stylosanthes guianensis* var. vulgaris cv. 85 Bandeirante**. (Dissertação Mestrado em Zootecnia. Centro de Ciências Agrárias.) Universidade Federal de Viçosa, Brasil. 72p. 1993.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. Sementes ciência, tecnologia e produção. **Campinas: Fundação Cargill**, p. 49, 1983.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. Sementes ciência, tecnologia e produção. **Campinas: Fundação Cargill**, p. 97-101, 127, 1988.

CARVALHO, J. L. de C. **Contribuição ao estudo fitoquímica e analítico do *Nasturtium officinale* R. BR., Brassicaceae**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2001.

CHAMPAKAEW, D.; CHOOCHOTE, W.; PONGPAIBUL, Y.; CHAITHONG, U.; JITPAKDI, A.; TUETUN, B.; PITASAWAT, B. Larvicidal efficacy and biological stability of a botanical natural product, zedoary oil-impregnated sand granules, against *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). **Parasitology Research,** v. 100, p. 729-737. 2007.

CHASE, M. W.; REVEAL, J. L. A phylogenetic classification of the land plants to accompany APG III". **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 161, p. 122–127, 2009.

CHENG, S.S., HUANG, C.G.; CHEN, Y.J.; YU, J.J.; CHEN, W.J.; CHANG, S.T. Chemical compositions and larvicidal activities of leaf essential oils from two eucalyptus species. **Bioresource Technology** v. 1, p 123-126, 2008.

CHRISTOPHERS SR. *Aedes aegypti* (L.) The yellow fever mosquito. Its life history, bionomics and structure. **Science**. 6-35; 1960.

CHOI CW, Kim SC, Hwang SS, Choi BK, Ahn HJ, Lee MY, Park SH, Kim SK. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean

medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. **Plant Science**; 163: 1161-1168, 2002.

CHOU, C. H. & YOUNG, C. C. Effects of osmotic concentration and pH on plant growth. **Taiwania**, v. 19, n. 2, p. 157-165, 1974.

CHOU, C.H. Roles of allelopathy in plant biodiversity and sustainable agriculture. **Critical Reviews in Plant Sciences***, 18*: 609-630, 1999.

COMPORI, M. Lipid peroxidation and cellular damage in toxic liver injury. **Laboratory investigation**, Baltimore, v.53, p.599-620. 1985;

COUTINHO, D. F. et. al. Morphoanatomical study of the leaves of *Ocotea duckei* Vattimo (Lauraceae-Lauroideae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.16, n.4, p.537-544, Out./Dez, 2006;

CRUZ-ORTEGA, R.; ANAYA, A.L.; HERNÁNDEZ, B.E.; LAGUNA, G. Effects of allelochemical stress produced by *Sicyos deppei* on seedling root ultraestructure of *Phaseolus vulgaris* and *Cucurbita ficifolia*. **Journal of Chemical Ecology,** v.24, n. 3, p. 2039-2057, 1998.

DALL´STELLA, D. S. G **Estudo fitoquímico aplicado da facão solúvel do etrato etanólico da *Dorstenia multiformis* Miquel (Moraceae)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

DE FEO, V.; DE SIMONE, F.; SENATORE, F. Pottencial allelochemicals from the essential oil of *Ruta graveolens*. **Phytochemistry**, v. 61, n. 5, p. 573-578, 2002.

DIAS. J. F. G. **Estudo alelopático aplicado de *Aster lanceolatus*, Willd**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde – UFPR, Curitiba, 2005.

DIETZ, H,; WINTERHALTER, P.; Phytotoxic constituints from *Bunias orientalis* leaves. **Phytochemistry,** v. 42, n. 4, p. 1005-1010, 1996.

DUANGMAL, K.; APENTEN, R. K. O. A comparative study of polyphenoloxidasesfrom taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum*var. Romano). **Food Chemistry**, v.64, p.351-359, 1999.

DURIGAN, J. C.; ALMEIDA, F. S. Noções sobre a alelopatia. **Boletim Técnico**. Jaboticabal: UNESP/FUNEP, 28 p., 1993.

EINHELLIG, F. A. Plant x plant allelopathy: biosynthesis and mechanism of action. In: Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal, 1995, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, p. 59-74, 1995.

EINHELLIG, F.A. An integrated view of allelochemicals amid multiple stresses. In INDERJIT; DAKSHINI, K.M.M. & FOY, C.L. (Eds.) **Principles and practices in plant ecology.** Boca Raton, CRC Press,. p.479-494, 1999;

FERREIRA, A. G. et al. Allelopathy in Brazil. In: Rizvi, S. J. H.; Rizvi, V. (Ed.) **Allelopathy: basic and applied aspects.** London: Chapman & Hall, p. 243-250, 1992

FERREIRA, D. F. Sistema de análise de variância de dados balanceados (SISVAR). **Pacote computacional.** Lavras: UFLA, 2000.

FILHO, B. R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 229-239, 2010.

FOURNET, A. et. al. Phytochemical and antiprotozoal activity of Ocotea lancifolia. **Fitoterapia**, n. 78, p. 382–384, 2007.

FORATTINI OP. Culicidologia Médica. Identificação, Biologia, Epidemiologia. Editora da Universidade de São Paulo. São Paulo. 2002; v.2: 860.

FORATTINI OP**. Entomologia Médica.** São Paulo: Edusp. v.1, 67 p. 1962

FOYER, C.H.; LELANDAIS, M.; KUNERT, K.J. Photooxidative stress in plants. **Physiologia Plantarum**, v.92, p.696-717, 1994.

GARCEZ, W.S., YOSHIDA, M., GOTTLIEB, O.R. Benzylisoquinoline alkaloids and flavonols from *Ocotea velllosiana,* **Phytochemistry**, v. 39, n. 4, p. 815-816, 1995.

GARG, B. K.; KATHJU, S. P.; LAHIRI, A. N. Sensitivity of cluster bean to salt stress at various growth stages. **Indian Journal Plant Physiology**, v. 2, p. 49-53, 1997.

GERIS, R.; SILVA, I.G.; SILVA, H.H.; BARISON, A.; RODRIGUES-FILHO, E.; FERREIRA, A.G. Diterpenoids from Copaifera reticulata Ducke with larvicidal activity against *Aedes aegypti* (L.) (Diptera, Culicidae). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo,** v. 50, p.25-28, 2008.

GIORGETTI,M., et al. Brazilian plants with possible action on the central nervous system—A study of historical sources from the 16th to 19th century, **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, p. 338–347, 2007.

GLEISER, R.M.; ZYGADLO, J.A. Insecticidal properties of essential oils from *Lippia turbinata* and *Lippia polystachya* (Verbenaceae) against *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **Parasitology Research,** v.101**,** p.1349-1354, 2007

GNIAZDOWSKA, A.; BOGATEK, R. Allelopathic interactions between plants. Multisite action of allelochemicals. **Acta Physiology Plant**, v. 27, n. 3, p. 395-407, 2005.

GRAY, T. M., ARNOYS, E. J., BLANKESPOOR, S. Destabilizing effect of proline substitutions in two helical regions of T4 lysozyme: Leucine 66 to proline and leucine 91 to proline. **Protein Science**, v.5, p.742-751, 1996.

GUBLER DJ. Epidemic dengue/dengue hemorragic fever as a public health, social and economic problem in the 21 st century. **Trends in Microbiology** 10(2): 100-103, 2002.

GUPTA, A. S., WEBB, R. P., HOLADAY, A. S.; ALLEN, R. D. Overexpression of superoxide dismutase protects plants from oxidative stress. **Plant Physiology**, v.103, p.1067-1073, 1993.

GUTTERIDGE, J.M.C.: HALLIWELL, B. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems.**Trends in Biochemical Sciences**, v.15,n.3, p.129-135, 1990.

HALLIWELL, B. Antioxidants and human disease: a general introduction. **Nutrition Reviews**, New York, v.55, p.S44-S52. 1997.

HEMINGWAY J. e RANSON H. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. **Annual Review Entomology**. 45: 371-391, 2000.

ISHIGE, M., MOTIDOME, M., YOSHIDA, M. AND GOTTLIEB, 0. R., Neolignans from *Ocotea catharinensis*, ***Phytochemistry,*** v.30, p.4121-4128, 1991.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; DOWEL JR, V. R.; SOMMERS, H. M. **Diagnóstico microbiológico – texto e atlas colorido**. 2. ed. São Paulo: Medicina Panamericana Editora do Brasil Ltda, 1993;

KUPIDŁOWSKA, E.; BOGATEK, R. Allelopathic potential of sunflower. II. Ultrastructural changes in germinating white mustard (*Sinapis alba* L.) seeds treated with water extract from sunflower (*Helianthus annuus* L.) leaves. **Acta Physiology Plant**, v. 25, n.1, p.89-90, 2003.

KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B. **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: Abrates, p. 210, 1999.

LAWLER, S.P.; LANZARO, G.C. Managing mosquitoes on the farm. Regents of the University of California. **Division of Agriculture and Natural Resources,** p.1–19. 2005

LHUILLIER, M. A**. Contribution a L'etude Phytochique de Quatre Plantes Malgaches: *Agauri salicifolia* HOOK.F ex Oliver, *Agauria polyphylla* Baker (*Ericaceae*), *Tambourissa trichophyla* Baker (*Monimiaceae*) et *Embelia concinna* Baker (*Myrsinaceae*).** Toulouse. These (Docteur de L'institut National Polytechnique de Toulouse) - Sciences des Agroressources, École

doctorale: Transferts, Dynamique des Fluides, Energie et Procédés,2007.

LICHTENTHALER, B. K.,Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes,**Methods Enzimol**,v.148, p.350-382,1987.

*LIMA, M.R.F. de, et al., A*nti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants, **Journal of Ethnopharmacology***, v. 105, p.137–147, 2006.*

LORDELLO, A. L. L., YOSHIDA, M. Neolignans from leaves of Ocotea catharinensis, **Phytochemistry**, v. 46, n. 4, p. 741-744, 1997.

LUNA, J. de S. *et al*., A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil, **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 199–206, 2005.

MACIAS, F.A., CASTELLANO, D., MOLINILLO, J.M.G. Search for a standart phytotoxic biossay for allelochemicals. Selection of standard target species.**Journal Agricultural and Food Chemistry.** v.48, n.6, p.2512-2521, 2000.

MAGUIRE, J. D. Speed o germination – aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v.2, n.2, p. 176-177, 1962.

MALHEIROS, A.; PERES, M. T. L. P. Alelopatia: interações químicas entre espécies. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna.** Chapecó: Argos Editora Universitária, 2001. p. 503-523.

MARQUES, C. A., **Importância econômica da família Lauraceae Lindl.,** v. 8, n.1, p.195 - 206, jan./dez, 2001.

MARQUES, M. R., XAVIER-FILHO, J. Enzymatic and inhibitory activities of cashew tree gum exudate. **Phytochemistry**, v.30, n.5, p.1431-1433, 1991.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 2nd ed. London: cademic Press, 1995. 889p.

MART...INEZ, V.; CERDA, A. Nitrate reductase activity in tomato and cucumber leaves as influenced by NaCl and N source. **Journal Plant Nutrition**, v. 12, n.1, p. 1335-1350, 1989.

MATOS, J.M.D.; MATOS, M.E.O. Farmacognosia – Curso teórico-prático. Fortaleza: Edições UFC, p. 223-230, 1989.

MAYER, A.M. Polyphenol oxidases in plants: recent rogress. **Phytochemistry**, v.26, p.11-20, 1987.

MEDINA, J. C.; Cultura, In: **Abacaxi**. 2 ed. Campinas: SP, Ital. p. 1-133, 1987.

MENDONÇA, F.A.; SILVA, K.F.; SANTOS, K.K.; RIBEIRO, K.A.; SANT'ANA, A.E. Activities of some Brazilian plants against larvae of the mosquito *Aedes aegypti*. **Fitoterapia,** v. 76, p. 629-636, 2005.

MENEZES, S. M.; TILLMANN. M. A. A.; DODE, L. B.; VILLELA, F. A. Detecção de soja geneticamente modificada tolerante ao glifosato por métodos baseados na atividade de enzimas. **Revista Brasileira de Sementes**. Pelotas, v. 26. n. 2, p. 150-155, 2004.

MIGUEL, O. G. **Ensaio sistemático de análise fitoquímica.** Apostila da disciplina de fitoquímica do curso de farmácia da UFPR, Curitiba, 2003.

MOREIRA, E. A. Marcha sistemática de análise em fitoquímica, **Tribuna Farmacêutica**. v. 47, n. 1, p. 1-19, 1979.

MULLAI, K., JEBANESAN, A.; PUSHPANATHAN, T. Effect of bioactive fractions of *Citrullus vulgaris* Schrad. leaf extract against *Anopheles stephensi* and *Aedes aegypti*. **Parasitology Research,** v.102, p. 951-955, 2008.

MUTHAURA, C.N., et. al. Phytotherapy of some remedies used in treatment of malaria in Meru district of Kenya**, South African Journal of Botany**, v. 73, p. 402–411, 2007.

MWANGI RW, Rembold H. Growth-inhibiting and larvicidal effects of *Melia volkensii* extracts on *Aedes aegypti* larvae. **Entomologia Experimentalis et Applicata**. 46(2):103-108, 1988**.**

NELSON MJ. *Aedes aegypti*: biologia y ecologia. Washington, DC, Organización Panamericana de la Salud. 1986.

OLIVEIRA, V.R.; SCAPIM, C.A.; OLIVEIRA JR., R.S.; & PIRES, N.M. Efeito do herbicida trifluralin sobre a germinação de sementes e índice mitótico em raízes de milho (*Zea mays* L.). **Revista Unimar**, v.18p.537-544, 1996.

PAVELA, R. Larvicidal effects of various Euro-Asiatic plants against *Culex quinquefasciatus* Say larvae (Diptera: Culicidae). **Parasitology Research,** v.102, p. 555- 559, 2008.

PENIDO, C.; COSTA, K.A.; COSTA, M.F.S.; PEREIRA, J.F.G.; SIANI, A.C.; M.G.M.O., HENRIQUES. Inhibition of allergen-induced eosinophil recruitment by natural tetranortriterpenoids is mediated by the suppression of IL-5, CCL11/eotaxin and NFnB activation. **International Immunopharmacology, v. 6, p.** 109-121,2006.

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of natural products**, Cincinatti, v.63, p.1035 -1042. 2000.

Pinheiro, F. & Ribeiro, J.F. **Síndromes de dispersão de sementes em Matas de Galeria do Distrito Federal**. In: Riberio, J.F.; Fonseca, C.E.L. da; Sousa-

Silva, J.C. eds. **Cerrado: caracterização e recuperação de matas de galeria. Planaltina: Embrapa-Cerrados**, pp. 335-375, 2001;

PINTO, A. C. *et. al.* Produtos Naturais: Atualidades, desafios e perspectivas. **Química. Nova**, v. 25, S. 1, p. 45-61, 2002;

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGU I LAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E**. Anal Biochem***,* 337-341 p., 1999;

PUSHPANATHAN, T.; JEBANESAN, A.; GOVINDARAJAN, M. The essential oil of *Zingiber officinalis* Linn (Zingiberaceae) as a mosquito larvicidal and repellent agent against the filarial vector *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). **Parasitology Research**, v. 102, p.1289-1291, 2008.

PUTTER, J. Peroxidase. In: **Methods of Enzymatic Analysis**, Bergmeyer, H.U. (Ed.), Verlag Chemie, Weinhan, pp.685-690, 1974.

QUINET, A., BAITELLO, J.B., MORAES, P.L.R. de 2010. Lauraceae *in* **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (*http://floradobrasil.jbrj.gov.br/201 0/FB008480*).

Qureshi SA, Mohiuddin SFB, Badar Y**.** Laboratory studies on some plant extracts as mosquito larvicides. **Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research**. 29 (5) 361-365, 1986.

RAHUMAN, A.A.; GOPALAKRISHNAN, G.; VENKATESAN, P.; GEETHA, K. Larvicidal activity of some Euphorbiaceae plant extracts against *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **Parasitology Research,** n.102, p. 867-873. 2008.

REIGOSA, M. J.; SÁNCHEZ-MOREIRAS, A.; GONZÁLEZ, L.Ecophysiological approach in allelopathy. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 18, p. 577-608, 1999;

RICE, E. L. **Allelopathy**. 2 ed. New York: Academic Press, 422 p. 1984;

RIZVI, S.J.H.; HAQUE, H.; SINGH, V.K.; RIZVI, V. A discipline called allelopathy. p. 1-8. In: Rizvi, S.J.H. and V. Rizvi (eds.). Allelopathy: basic and applied aspects. Chapman and Hall Publishers, London, U.K. 480 p, 1992.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Farmacognosia e Farmacobiotecnologia**. São Paulo: Premier, 1997.

RODRIGUES, L. R. A.; ALMEIDA, A. R. P.; RODRIGUES, T. J. D. Alelopatia em forrageiras e pastagens. In: Simpósio sobre ecossistema de pastagens, 2., 1993, Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal: FUNEP, p. 100-129, 1993.

ROZENDAAL JA. Vector control methods for use by individuals and comnunities. Geneve: World Health Organization. 1997a; 398.

SASAKI, C. M. **Estudo fitoquímico e avaliação das atividades alelopáticas e antimicrobianas das partes aéreas de Pterocaulon lorentzii Malme (ASTERACEAE)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

SCANDALIOS, J.G. Oxygen stress and superoxide dismutases. **Plant Physiology**, v.101,n.1, p.7-12, 1993.

SCHMUTTERER, H., Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. **Annual Review of Entomology,** v. 35, n.1, p. 271-297, 1990.

SHAALAN, E.A.S.; CANYON, D.V.; YOUNES, M.W.F.; WAHAB, H.A.; MANSOUR, A.H. Effects of sub-lethal concentrations of synthetic insecticides and *Callitris glaucophylla* extracts on the development of *Aedes aegypti*. **Journal of Vector Ecology, v.**30, **p.** 295- 298, 2005.

SHIH, C. C.;WU, W. C.;LIN, W. C. Antihyperglycemic and antioxidant properties of *Anocetochilus formosanus* in diabetic rats. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, Oxford, n.29, p.684-688. 2002.

SIEGEL, B.Z. Plant peroxidase: an organismic perspective. **Plant Growth Regulation**, v.12, p.303-312, 1993.

SILVA HHG, SILVA IG e LIRA KS. Metodologia de criação, manutenção de adultos e estocagem de ovos de Aedes aegypti (Linnaeus, 1762) em laboratório. **Revista de Patologia Tropical**. 27(1): 53-63, 1998.

SILVA, O.S.; ROMÃO, P. R.; BLAZIUS, R.D.; PROPHIRO, J.S. The use of andiroba *Carapa guianensis* as larvicide against *Aedes albopictus*. **Journal of the American Mosquito Control Association,** v. 20, p. 456-457, 2004.

SILVA, W.J.; DÓRIA, G.A.; MAIA, R.T.; NUNES, R.S.; CARVALHO, G.A.; BLANK, A.F.; ALVES, P.B.; MARÇAL, R.M.; CAVALCANTI, S.C. Effects of essential oils on *Aedes aegypti* larvae: Alternatives to environmentally safe insecticides. **Bioresource Technology**, v.99, p. 3251-3255, 2008.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRIL, T. C. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 5ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994.

SIMÕES,C.M.O. et al. **Farmagnosia da planta ao medicamento,** 2. ed. Porto Alegre e Florianópolis : Ed. Universidade UFRGS e Editora da UFSC, 2000.

SIQUEIRA, J. M.; BOMM, M. D.; PEREIRA, N. F. G.; GARCEZ, W. S; BOAVENTURA, M. A. D. Estudo fitoquímico de Unonopsis lindmanii –

Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre a Artemia salina Leach. **Química Nova**, 21 (5), p. 557- 559, 1998.

SOUZA FILHO, A.P.; RODRIGUES, L.R.A.; RODRIGUES, T.J.D. Efeitos do potencial alelopático de três leguminosas forrageiras sobre três invasoras de pastagens. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 32, n.2, p.165-170, 1997.

SOUZA, G. C. *et al.* , Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil, **Journal of Ethnopharmacology**, v.90, p.135–143, 2004.

STEPONKUS, P.L.; LANPHEAR, F.O. Refinement of the triphenyl tetrazolium chloride method of determining cold injury. **Journal of Plant Physiology,** v.42, p1423-26, 1967.

SUKAMAR, K., PERICH, M.J.; BOOBAR, L.R. Botanical derivatives in mosquito control: a review. **Journal of the American Mosquito Control Association,** v. 7,p. 210- 237, 1991.

TAKAKU, S., et. al. Leaf essential oil composition of 10 species of Ocotea (Lauraceae) from Monteverde, Costa Rica. **Biochemical Systematics and Ecology**, n. 35, p.525-532, 2007;

THATHEYUS, J.A. Bio control of mosquitoes In: Defeating the public enemy, the mosquito: a real challenge. **Loyola,** v. 01, p. 76–94, 2007.

WASICKY, R. Uma modificação do aparelho de Clevenger para extração de óleos essenciais. **Rev. Farm. Bioq.** v.1, n.1, p. 77-81, 1963;

WHITTAKER, R. W.; FEENY, P. P. Allelochemics: chemical interactions between species. **Science**, v. 171, n. 3973, p. 757-769, 1971.

WHO – World Health Organization Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides. World Health Organization, Geneva, 1981.

WU, S. J.;NG, L. T. Antioxidant and free radical scavenging activities of wild bitter melon (Momordica charantia Linn. var. abbreviata Ser.) in Taiwan. **LWT - Food Science and Technology**, Oxford, v.41, p.323-330. 2008.

YILDRIM, A., OKTAY, M., BÜLALOÚLU, V. The Antioxidant Activity of the Leaves of Cydonia vulgaris**. Turk J Med Sci**, 31, 23-27, 2001;

ZANIN, S. M. W. **Alcaloides aporfinóides em mudas de *Ocote puberula* (Reich.) Nees (Lauraceae)**. Tese (Doutorado em Química) – Setor de Ciências Exatas – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

ZHANG, J.; KIRKHAM, M.B. Lipid peroxidation in sorghum and sunflower seedlings as affected by ascorbic acid, benzoic acid, and propyl gallate. **Journal of Plant Physiology**, v.149, n.1, p.489-493, 1996.