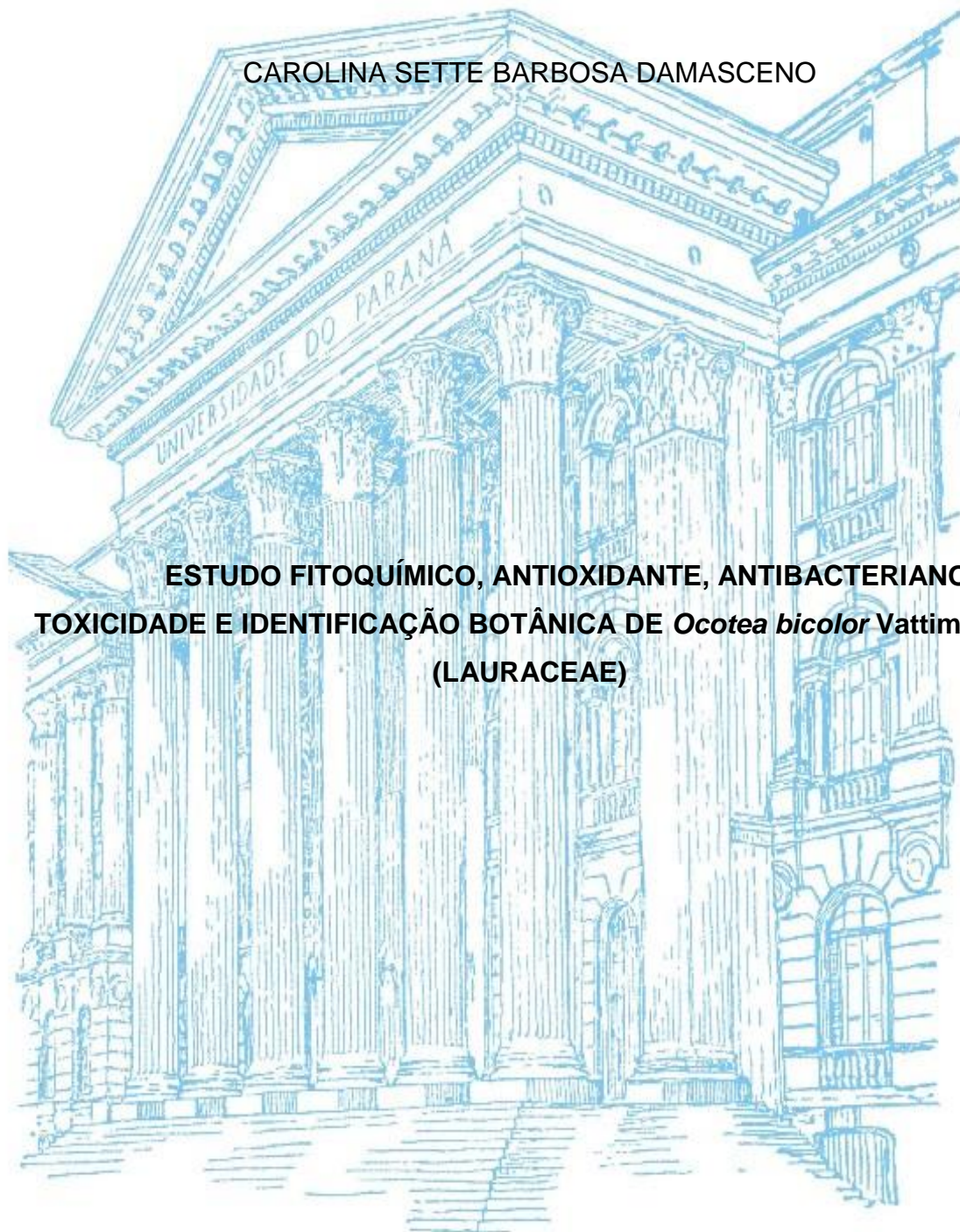


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CAROLINA SETTE BARBOSA DAMASCENO



**ESTUDO FITOQUÍMICO, ANTIOXIDANTE, ANTIBACTERIANO,  
TOXICIDADE E IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA DE *Ocotea bicolor* Vattimo-Gil  
(LAURACEAE)**

CURITIBA

2017

CAROLINA SETTE BARBOSA DAMASCENO

**ESTUDO FITOQUÍMICO, ANTIOXIDANTE, ANTIBACTERIANO, TOXICIDADE E IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA DE *Ocotea bicolor* Vattimo-Gil (LAURACEAE)**

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

Orientador: Prof. Dr. Obdulio G. Miguel  
Coorientadora: Profa. Dra. Marilis D. Miguel

CURITIBA

2017

Damasceno, Carolina Sette Barbosa

Estudo fitoquímico, antioxidante, antibacteriano, toxicidade e identificação botânica de *Ocotea bicolor* Vattimo-Gil (Lauraceae) / Carolina Sette Barbosa Damasceno - Curitiba, 2017.

123 f. : il. (algumas color.) ; 30 cm

Orientador: Professor Dr. Obdulio G. Miguel

Coorientadora: Professora Dra. Marilis D. Miguel

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

Inclui bibliografia

1. Lauraceae. 2. Ocotea. 3. Flavonoides. 4. Antioxidante. 5. Toxicidade. I. Miguel, Obdulio G. II. Miguel, Marilis D. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.


CDD 583.931

# TERMO DE APROVAÇÃO

**CAROLINA SETTE BARBOSA DAMASCENO**

Título: "ESTUDO FITOQUÍMICO, ANTIOXIDANTE, ANTIBACTERIANO, TOXICIDADE E IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA DE *Ocotea bicolor* Vattimo-Gil (LAURACEAE)"


Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Insumos, medicamentos e correlatos.



Prof. Dr. Obdúlio Gomes Miguel  
Orientador



Prof.ª Dra. Cristiane da Silva Paula de Oliveira  
Universidade Federal do Paraná



Prof. Dr. Vinícius Bednarczuk de Oliveira  
Centro Universitário Campos de Andrade

Curitiba, 22 de fevereiro de 2017.

Dedico este trabalho ao meu querido esposo, pelo apoio incondicional em todos os momentos, principalmente nos de incerteza, muito comuns no trilha de novos caminhos e ao meu filho Randy pela compreensão e carinho.

Também dedico aos meus pais que dignamente me apresentaram a importância da família e o caminho da honestidade e persistência.

## **AGRADECIMENTOS**

Este trabalho não foi resultado apenas de um esforço individual. Consiste em fruto de significativas contribuições que recolhi durante minha trajetória acadêmica, profissional e como cidadã, no contato com pessoas e instituições que foram fundamentais a essa construção.

Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom da vida e por me dar forças, sabedoria e paciência nesta jornada.

A Universidade Federal do Paraná e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel, por ter acreditado em mim. Pela orientação, amizade e compartilhamento de seus conhecimentos sempre com muita disposição e paciência.

À minha coorientadora, Profa. Dra. Marilis Dallarmi Miguel, pelos ensinamentos, grande incentivo no fazer pesquisa e por sua amizade.

A Profa. Dra. Élide Pereira dos Santos pela amizade, valiosa ajuda e contribuição com os conhecimentos na área de botânica.

As Profas. Dra. Josiane de Fátima Gaspari Dias e Sandra Zanin pelo companheirismo, conselhos e ensinamentos.

Aos demais professores das disciplinas cursadas por repassarem conhecimentos que foram essenciais na realização desse estudo.

Aos meus amigos do grupo de pesquisa (desculpe por não citar cada um). Todos vocês foram especiais, tornando os meus dias mais alegres e o percurso mais prazeroso, aos quais pretendo continuar cultivando a amizade por toda minha vida.

Aos amigos doutorandos e mestrandos que auxiliaram em diversas análises: Ellis Marina, Angela Maria Souza, Vanessa Bobek, Francis Merino, Letícia Freire e Katlin Rech. A amizade e ajuda de vocês foi muito valiosa.

Ao Engenheiro Florestal do Museu Botânico Municipal, Marcelo Leandro Brotto e ao estagiário no Herbário EFC Rafael Rosenstock Voltz pela identificação e coleta do material botânico respectivamente.

Aos técnicos Graça, Paulo e Maurício, pelo auxílio e cordialidade. Também ao secretário Jean Godoi pela pronta disposição nos atendimentos.

Ao Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná pelos espectros de ressonância magnética nuclear e CG/MS.

Ao Departamento de Botânica e Bioquímica da Universidade Federal do Paraná pela análise de DNA.

Aos servidores e funcionários da Universidade Federal do Paraná, pela prestação de serviços que contribuíram nesta jornada.

Ao meu irmão, minha sogra e demais familiares e amigos, que tanto me incentivaram e torceram por mim.

Aos amigos do coração Zulma de Rivas, Samuel de Rivas, Márcia Souza que tanto me apoiaram.

A CAPES pelo auxílio financeiro.

As demais pessoas que contribuíram direta ou indiretamente na elaboração deste trabalho ou participaram da minha vida, e que, por ventura, eu tenha me esquecido de agradecer.

“Ser um empreendedor é executar os sonhos, mesmo que haja riscos.  
É enfrentar os problemas, mesmo não tendo forças.  
É caminhar por lugares desconhecidos, mesmo sem bússola.  
É ter consciência de que quem vence sem obstáculos triunfa sem glória.  
É não esperar uma herança, mas construir uma história...”

Augusto Cury

## RESUMO

*Ocotea bicolor* Vattimo-Gil (LAURACEAE) espécie nativa do Brasil ocorre na região Sul e Sudeste, sendo a Floresta Atlântica seu domínio fitogeográfico. Motivado pela incipiência de estudos sobre a espécie o objetivo deste trabalho foi investigar a composição química, realizar o estudo morfoanatômico, *DNA barcode*, atividades antioxidante, antimicrobiana e toxicidade da espécie vegetal. O material foi coletado na cidade de Curitiba, Paraná, Brasil. O estudo morfoanatômico foi realizado a partir das folhas e caules e de acordo com metodologia padrão de microscopia ótica e eletrônica. *Ocotea bicolor* apresentou cutícula lisa, mesofilo dorsiventral e estômatos paracíticos na lâmina foliar. A ausência de tricomas nas estruturas estudadas difere do proposto para Lauraceae, ao passo que células secretoras foram observadas, indo ao encontro com o descrito para outros gêneros da família. O *DNA barcode* realizado por metodologia proposta pelo *Consortium for the Barcode of Life* permitiu o sequenciamento de duas regiões do DNA plastidial (*matK* e *rbcL*) as quais foram depositadas no GenBank. Após extração do óleo essencial em aparato de Clevenger modificado foi identificado como compostos majoritários os sesquiterpenos  $\delta$ -cadineno e  $\beta$ -sesquifelandreno por técnica cromatográfica. Obteve-se a partir das folhas o extrato bruto cetônico, o qual foi particionado utilizando solventes em escala crescente de polaridade para obtenção das frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e remanescente. Qualitativamente foram detectados alcaloides, flavonoides, esteroides, terpenos e cumarinas por meio de cromatografia em camada delgada e identificado o flavonoide astilbina (3-O- $\alpha$ -ramnosídeo de taxifolina) na fração remanescente do sólido por meio de ressonância magnética nuclear. Os ensaios antioxidantes indicaram boa capacidade antioxidante, com destaque da fração hexânica do sólido pelo método de formação do complexo fosfomolibdênio com resultados de 52,33% e 180,41% comparada a vitamina C e rutina respectivamente. No teste de Redução do Radical DPPH a fração remanescente do sólido apresentou o melhor desempenho, com  $IC_{50}$  = 8,05 ( $\mu$ g/mL), estatisticamente semelhante aos padrões utilizados. As amostras apresentaram fraco potencial antimicrobiano sobre os organismos testados e bioatividade sobre *Artemia salina* com destaque para o óleo essencial enquadrado como altamente tóxico aos organismos em questão.

Palavras-chave: Morfoanatomia. *DNA barcode*. Flavonoides. Antioxidante. Toxicidade.

## ABSTRAT

*Ocotea bicolor* Vattimo-Gil (LAURACEAE) is a species native of Brazil that occurs in the South and south-west regions, being the Atlantic Forest its phytogeographic domain. Motivated by the incipience of studies on the species the aim of the present study was to evaluate the chemical composition, to conduct the morphoanatomic study, DNA barcode, antioxidante and antimicrobial activities and toxicity of this plant. The plant material was collected in Curitiba city, state of Paraná, Brazil. Morphological studies were carried out on leaves and stems using the standard methodology of optical and electronic microscopy. *Ocotea bicolor* showed smooth cuticle, dorsiventral mesophyll and paracytic stomata on blade leaf. The absence of trichomes in studied structures differs from that proposed for Lauraceaes, whereas secretory cells were observed, in accordance with other family genera. The DNA barcode performed by the methodology proposed by Consortium for the Barcode of Life, allowed the sequencing of two regions of plastid DNA (matK and rbcL) which were deposited in GenBank. After the essential oil extraction in modified Clevenger apparatus, sesquiterpenes  $\delta$ -cadinene and  $\beta$ -sesquifelandreno were identified as major compounds by chromatographic technique. The ketone crude extract was obtained from the leaves, which was partitioned in solvents of increasing polarity to obtain the hexane, chloroform, ethyl acetate and remaining fractions. Qualitatively, alkaloids, flavonoids, steroids, terpenes and coumarins were detected by thin layer chromatography and the flavonoid astilbin (3-O- $\alpha$ -ramnosil-taxifolin) were identified in the remaining fraction of the solid by nuclear magnetic resonance. The antioxidant capacity results obtained were good, with emphasis on hexane fraction of the solid by the antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex, with results of 52.33% and 180.41%, respectively, compared to vitamin C and rutin. The remaining fraction of the solid in Antioxidant Activity by DPPH Radical Scavenging Method, showed the best performance, with  $IC_{50} = 8.05$  ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ ), statistically similar to the standards used. The samples presented no significant antimicrobial potential on the organisms tested and low bioactivity on *Artemia salina* with emphasis on the essential oil framed as highly toxic to the organisms in question.

Keywords: Morphoanatomy. DNA barcode. Flavonoids. Antioxidant. Toxicity.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – DISTRIBUIÇÃO MUNDIAL DO GÊNERO <i>Ocotea</i> Aubl.....	28
FIGURA 2 – DISTRIBUIÇÃO DO GÊNERO <i>Ocotea</i> Aubl.NO BRASIL.....	29
FIGURA 3 – DISTRIBUIÇÃO DA ESPÉCIE <i>Ocotea bicolor</i> Vattimo-Gil.NO BRASIL .....	33
FIGURA 4 – <i>Ocotea bicolor</i> Vattimo-Gil .....	35
FIGURA 5 – FOTOGRAFIA DA ESPÉCIE <i>Ocotea bicolor</i> NO LOCAL DA COLETA .....	46
FIGURA 6 – FLUXOGRAMA DAS ETAPAS DO DESENVOLVIMENTO DA PESQUISA.....	47
FIGURA 7 – ILUSTRAÇÃO ESQUEMÁTICA DO APARELHO DE CLEVENGER .	52
FIGURA 8 – <i>Ocotea bicolor</i> Vattimo-Gil – CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS EXTERNAS.....	63
FIGURA 9 – <i>Ocotea bicolor</i> Vattimo-Gil - FOLHA EM CORTE PARADÉRMICO E SECÇÃO TRANSVERSAL.....	64
FIGURA 10 – <i>Ocotea bicolor</i> Vattimo-Gil – PECÍOLO EM SECÇÃO TRANSVERSAL .....	66
FIGURA 11 – <i>Ocotea bicolor</i> Vattimo-Gil – CAULE EM SECÇÃO TRANSVERSAL	67
FIGURA 12 – SEQUÊNCIA DA REGIÃO PLASTIDIAL <i>matK</i> DE <i>Ocotea bicolor</i> Vattimo-Gil .....	68
FIGURA 13 – RESULTADO NO BOLD SYSTEMS PARA A SEQUÊNCIA DA REGIÃO PLASTIDIAL <i>matK</i> DE <i>Ocotea bicolor</i> .....	69
FIGURA 14 – SEQUÊNCIA DA REGIÃO PLASTIDIAL <i>rbcL</i> DE <i>Ocotea bicolor</i> Vattimo-Gil .....	70
FIGURA 15 – RESULTADO NO BOLD SYSTEMS PARA A SEQUÊNCIA DA REGIÃO PLASTIDIAL <i>rbcL</i> DE <i>Ocotea bicolor</i> .....	70
FIGURA 16 – ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Ocotea bicolor</i> OBTIDOS ATRAVÉS DE HIDRODESTILAÇÃO.....	71
FIGURA 17 – CROMATOGRAFIA GASOSA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE <i>Ocotea bicolor</i> .....	74
FIGURA 18 – COMPONENTES MAJORITÁRIOS DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Ocotea bicolor</i> .....	78
FIGURA 19 – BIOSÍNTESE DE ESQUELETO CADINANO .....	78

FIGURA 20 – CICLO BIOSINTÉTICO DE METABÓLITOS PRIMÁRIOS E SECUNDÁRIOS.....	82
FIGURA 21 – ESPECTRO DE RMN DE $^1\text{H}$ DO COMPOSTO OB06.....	84
FIGURA 22 – ESPECTRO DE RMN DE $^{13}\text{C}$ DO COMPOSTO OB06.....	85
FIGURA 23 – ESPECTRO DEPT DO COMPOSTO OB06 .....	86
FIGURA 24 – ESTRUTURA QUÍMICA DA ASTILBINA .....	88

## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 – NÚMERO DE NOMES ACEITOS DE ESPÉCIES DA FAMÍLIA LAURACEAE POR REGIÃO BRASILEIRA.....	25
GRÁFICO 2 – NÚMERO DE NOMES ACEITOS DE ESPÉCIES DO GENERO <i>Ocotea</i> Aubl. POR REGIÃO BRASILEIRA.....	29
GRÁFICO 3 – CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO DAS AMOSTRAS COMPARADAS A VITAMINA C .....	93
GRÁFICO 4 – CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO DAS AMOSTRAS COMPARADAS A RUTINA .....	93

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – UTILIZAÇÃO ECONÔMICA DE ALGUMAS ESPÉCIES DA FAMÍLIA LAURACEAE. ....	26
TABELA 2 – ATIVIDADES BIOLÓGICAS NO GÊNERO <i>Ocotea</i> .....	31
TABELA 3 – ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO DA ESPÉCIE <i>Ocotea bicolor</i> Vattimo-Gil .....	32
TABELA 4 – ÓLEO ESSENCIAL NA FAMÍLIA LAURACEAE, RESPECTIVOS COMPONENTES MAJORITÁRIOS E ATIVIDADES BIOLÓGICAS / FARMACOLÓGICAS .....	39
TABELA 5 – REATIVOS PARA O TESTE HISTOQUÍMICO .....	49
TABELA 6 – COMPOSIÇÃO DAS FASES MÓVEIS E REVELADORES DA CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA REALIZADA PARA EXTRATOS E FRAÇÕES. ....	56
TABELA 7 – RENDIMENTO DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS SECAS E FRESCAS DE <i>Ocotea bicolor</i> POR HIDRODESTILAÇÃO .....	71
TABELA 8 – COMPOSTOS QUÍMICOS PRESENTES NO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Ocotea bicolor</i> DETERMINADOS POR CROMATOGRAFIA GASOSA .....	75
TABELA 9 – UMIDADE E CINZAS TOTAIS DO MATERIAL VEGETAL .....	79
TABELA 10 – RENDIMENTO DAS FRAÇÕES OBTIDAS A PARTIR DO EXTRATO BRUTO .....	80
TABELA 11 – CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DAS FRAÇÕES DE <i>Ocotea bicolor</i> .....	81
TABELA 12 – DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE RMN DE <sup>13</sup> C E <sup>1</sup> H DO COMPOSTO OB06 EM COMPARAÇÃO COM DADOS DA LITERATURA PARA ASTILBINA.....	87
TABELA 13 – ATIVIDADES BIOLÓGICAS / FARMACOLÓGICAS DA ASTILBINA	90
TABELA 14 – FORMAÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO DO EXTRATO BRUTO, FRAÇÕES E ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Ocotea bicolor</i> .....	92
TABELA 15 – RESULTADO DE IC50 PARA REDUÇÃO DO DPPH· DO EXTRATO E FRAÇÕES .....	95

TABELA 16 – TOXICIDADE DOS EXTRATOS BRUTOS, FRAÇÕES E ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Ocotea bicolor</i> EM <i>Artemia salina</i> .....	96
TABELA 17 – ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE <i>Ocotea bicolor</i> A PARTIR DO TESTE DE CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MINIMA (CIM).....	100

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATCC	– <i>American type culture collection</i>
BSA	– Albumina de soro bovino
CCD	– Cromatografia em camada delgada
CG/EM	– Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
CIM	– Concentração inibitória mínima
CLAE/DAD	– Cromatografia líquida de alta eficiência com detector fotodiodo
CLSI	– <i>Clinical Laboratory Standards Institute</i>
CL <sub>50</sub>	– Concentração letal 50%
Cm	– Centímetro
CTBA	– Brometo de cetil-trimetilamônio
DEPT	– Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DMPP	– 3,3'- dimetilalil pirofosfato
DMSO	– Dimetilsulfóxido
DNA	– Ácido desoxiribonucléico
DPPH	– 2,2-difenil-1-picrilhidrazila
EB	– Extrato bruto do caule
EDTA	– ácido etilenodiamino tetra-acético
FAA	– Formol, ácido acético glacial, e álcool etílico a 70% (v/v)
FAE	– Fração acetato de etila
FAES	– Fração acetato de etila do sólido
FCF	– Fração clorofórmio
FCS	– Fração clorofórmio do sólido

FH	– Fração hexano
FHC	– Fração hexano do sólido
FR	– Fração remanescente
FRC	– Fração remanescente do sólido
FPP	– difosfato de farnesila
GGPP	– difosfato de geranilgeranila
GPP	– difosfato de geranila
IC <sub>50</sub>	– Concentração inibitória 50%
IPP	– 3-isopentenil pirofosfato
<i>matK</i>	– maturase <i>K</i>
MEV	– Microscopia eletrônica de varredura
MHB	– Caldo Muller Hinton Broth
OE	– Óleo essencial
PCR	– Reação de Cadeia de Polimerase
pH	– Potencial hidrogeniônico
<i>rbcL</i>	– ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase
RMN	– Ressonância magnética nuclear
RPM	– Rotação por minuto
SDS	– Dodecil sulfato de sódio
TTC	– Cloreto de 2,3,5-Trifeniltetrazólio
UFC	– Unidade formadora de colônia

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	20
1.1 OBJETIVOS .....	21
1.1.1 Objetivo Geral .....	21
1.1.2 Objetivos Específicos .....	22
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	23
2.1 PLANTAS MEDICINAIS .....	23
2.2 FAMÍLIA LAURACEAE .....	24
2.3 GÊNÉRO <i>Ocotea</i> Aubl. ....	28
2.4 <i>Ocotea bicolor</i> Vattimo-Gil.....	32
2.5 ESTUDO MORFOANATÔMICO .....	35
2.6 CÓDIGO DE BARRA DE DNA .....	36
2.7 ÓLEO ESSENCIAL .....	37
2.8 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .....	44
2.9 ATIVIDADE TÓXICA .....	44
2.10 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA .....	45
<b>3 METODOLOGIA</b> .....	46
3.1 MATERIAL BOTÂNICO.....	46
3.2 ESTUDO MORFOANATÔMICO .....	47
3.2.1 Preparo das lâminas.....	48
3.2.1.1 Técnica de diafanização ou clareamento .....	48
3.2.1.2 Lâminas semipermanentes .....	48
3.2.2 Testes histoquímicos.....	48
3.2.3 Microscopia eletrônica de varredura .....	49
3.3 CÓDIGO DE BARRA DE DNA.....	49
3.3.1 Extração do DNA.....	49
3.3.2 Amplificação em Reação de Cadeia de Polimerase (PCR).....	50
3.3.3 Reação de Sequenciamento .....	51
3.3.4 Análise das Sequências .....	51
3.4 EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL .....	52
3.4.1 Análise cromatográfica.....	53
3.5 DETERMINAÇÃO DE UMIDADE E CINZAS TOTAIS.....	53
3.6 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES.....	54

3.6.1 Extração por Soxhlet .....	54
3.6.2 Determinação do teor de sólidos do extrato bruto .....	55
3.6.3 Obtenção das Frações .....	55
3.7 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD) .....	56
3.8 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS CONTITUENTES QUÍMICOS .....	57
3.8.1 Isolamento .....	57
3.8.2 Identificação .....	57
3.9 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .....	57
3.9.1 Formação do Complexo Fosfomolibdênio .....	57
3.9.2 Avaliação da Atividade Antioxidante pela Redução do Radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) .....	58
3.10 AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS .....	59
3.10.1 Avaliação da toxicidade aguda frente à <i>Artemia salina</i> .....	59
3.10.2 Avaliação da atividade antibacteriana .....	60
3.10.2.1 Método de Microdiluição (Determinação da Concentração Inibitória Mínima). .....	61
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	62
4.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO .....	62
4.2 ESTUDO MORFOANATÔMICO .....	62
4.3 CÓDIGO DE BARRA DE DNA .....	68
4.3.1 Amplificação e Sequenciamento da Região <i>matK</i> .....	68
4.3.2 Amplificação e Sequenciamento da Região <i>rbcL</i> .....	69
4.4 ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS.....	70
4.4.1 Rendimento do óleo essencial .....	70
4.4.2 Análise cromatográfica do óleo essencial .....	72
4.5 UMIDADE E CINZAS TOTAIS .....	79
4.6 RENDIMENTO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DE <i>Ocotea bicolor</i> .....	80
4.7 ANÁLISE DOS COMPOSTOS POR CCD.....	81
4.8 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS CONTITUENTES QUÍMICOS .....	83
4.9 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .....	91
4.9.1 Formação do Complexo Fosfomolibdênio .....	91
4.9.2 Redução do Radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) .....	94
4.10 ATIVIDADES BIOLÓGICAS .....	96
4.10.1 TOXICIDADE EM <i>Artemia salina</i> .....	96

4.10.2 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA .....	99
<b>5 CONCLUSÃO .....</b>	<b>102</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>104</b>
<b>ANEXO 1 - AUTORIZAÇÃO DAS ATIVIDADES DE ACESSO AO PATRIMÔNIO GENÉTICO.....</b>	<b>121</b>
<b>ANEXO 2 - CURVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS PADRÕES, EXTRATO, FRAÇÕES E ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Ocotea bicolor</i> PELA REDUÇÃO DO DPPH .....</b>	<b>122</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas no tratamento e na cura de enfermidades é tão antigo quanto a espécie humana (MACIEL et al., 2002). Civilizações primitivas perceberam o potencial das plantas na cura de suas enfermidades, demonstrando a estreita relação do uso de plantas e a própria evolução do homem. Muitos povos descreveram a utilização de ervas e outros vegetais como medicamento, registrando-os em seus manuscritos (DEVIIENNE; RADDI; POZETTI, 2004).

No Brasil, o uso das plantas medicinais foi impulsionado, principalmente, pela cultura indígena. Em nosso país, plantas medicinais são comercializadas em feiras livres, mercados populares e encontradas em quintais residenciais, tanto nas regiões mais pobres do país, quanto nas grandes cidades (MACIEL et al., 2002).

As drogas vegetais têm contribuído ao longo dos anos para obtenção de inúmeros fármacos que são comumente utilizados na prática clínica. Estudos objetivando avaliar o potencial terapêutico de plantas medicinais e de alguns de seus constituintes tem sido alvo de pesquisas científicas cujas ações farmacológicas já foram determinadas através de testes pré-clínicos com animais (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998).

O uso popular, mesmo que empiricamente, deu margem a observação dos efeitos das plantas na saúde da população, instigando os cientistas a buscar suas atividades farmacológicas (DEVIIENNE; RADDI; POZETTI, 2004). Neste sentido a etnobotânica exerce um papel relevante. Segundo Amorozo (1996), etnobotânica é a ciência que se ocupa do estudo do conhecimento e dos conceitos desenvolvidos pelas sociedades a respeito dos vegetais, incluindo o uso dos mesmos. Como parte da etnobotânica a etnofarmacologia figura-se como uma ciência multidisciplinar que explora o estudo dos agentes biologicamente ativos, tradicionalmente empregados ou observados pelo homem (ELISABETSKY, 2003).

Dentro deste contexto, os estudos farmacobotânicos exercem uma importância indispensável. Estes estudos têm a sua origem a partir da correta identificação da espécie vegetal em estudo e, dentre as ferramentas utilizadas para esse fim, a morfoanatomia é uma das mais comuns. Esta etapa é fundamental, pois uma identificação errônea da espécie vegetal anulará todo o trabalho do químico, tornando-o impublicável e praticamente inútil (MACIEL et al., 2002).

Outro requisito essencial para a transformação da planta medicinal em um medicamento fitoterápico é o conhecimento dos aspectos da atividade biológica do vegetal. A atividade farmacológica deriva de alguma substância do metabolismo secundário, ou a um conjunto destes presentes nos vegetais (DE SMET; BROUWERS, 1997). A obtenção de um fitofármaco e, por consequência, sua utilização como medicamento, demanda muitos estudos, onde as áreas da química e biologia são muito importantes no isolamento, purificação, identificação e modificações estruturais de moléculas com potencial farmacológico (MIGUEL; MIGUEL, 1999).

O Brasil é um país que apresenta a maior biodiversidade do mundo. Há uma grande necessidade de estudos fitoquímicos e das atividades biológicas das plantas brasileiras para conhecer mais sobre as possíveis aplicações das mesmas (FUNARI; FERRO, 2005). Entretanto, as limitações relativas aos produtos naturais, como fonte de novos fármacos, são muitas, como a presença de misturas biológicas de difícil separação e caracterização, a complexidade do processo de avaliação, além da falta de investimentos e recursos para as pesquisas nessa área (SIMÕES et al., 2000).

Considerando a possibilidade desta biodiversidade brasileira ser aproveitada e eticamente explorada, e a importância do estudo fitoquímico para obtenção de novas substâncias de interesse farmacológico bem como para outras aplicações, se faz necessário o estudo de espécies nativas brasileiras.

*Ocotea bicolor* Vattimo-Gil oferece perspectiva de resultados promissores, por ser pertencente ao gênero *Ocotea* Aubl. cujos estudos tem atestado a presença de diversas substâncias de interesse farmacológico. Aliado a este fator, a espécie não possui estudos químicos, biológicos e morfoanatômicos conferindo ineditismo ao estudo proposto.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo Geral

Realizar o estudo fitoquímico, biológico, atividade antioxidante e identificação botânica de *Ocotea bicolor* Vattimo-Gil pertencente a família Lauraceae.

### 1.1.2 Objetivos Específicos

- Coletar o material botânico;
- Caracterizar a morfoanatomia das folhas, pecíolo e caules;
- Extrair, amplificar e sequenciar o DNA plastidial (*matK* e *rbcL*);
- Extrair o óleo essencial das folhas;
- Detectar os constituintes do óleo essencial;
- Obter o extrato cetônico bruto e frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e remanescente das folhas;
- Realizar o estudo fitoquímico da espécie;
- Isolar e identificar os componentes fitoquímicos no extrato e frações;
- Avaliar a atividade antioxidante do óleo essencial, extrato e frações.
- Estudar a bioatividade do óleo essencial e dos extratos e frações em *Artemia salina*;
- Avaliar a atividade antibacteriana do óleo essencial, extrato e frações.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 PLANTAS MEDICINAIS

Segundo a definição da Organização Mundial de Saúde (OMS) planta medicinal é todo e qualquer vegetal que possui substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semi-sintéticos (VEIGA JR. et al., 2005). Enquanto que os fitoterápicos ou medicamentos fitoterápicos são preparações à base de plantas padronizadas, constituídos por misturas complexas de uma ou mais plantas que são usados na maioria dos países para o tratamento de várias doenças (CALIXTO, 2000).

O registro mais antigo da utilização das plantas medicinais reporta-se a um Homem Neandertal (com 50.000 anos) cujo corpo estava rodeado de oito espécies diferentes de plantas, encontrado numa caverna na fronteira entre o Iraque e o Irã. Das oito plantas encontradas, atualmente sete ainda crescem na mesma área geográfica. A Ephedra, uma dessas plantas, deu origem a um potente broncodilatador, a efedrina, a qual é hoje sintetizada quimicamente (FOWLER, 2006).

Observações populares sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais têm contribuído na divulgação dos efeitos medicinais que produzem, apesar de não terem seus constituintes químicos conhecidos. O conhecimento sobre plantas medicinais simboliza muitas vezes o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos (MACIEL et al., 2002).

Ao longo do tempo variados procedimentos clínicos tradicionais têm sido registrados com a utilização de plantas medicinais. Muito embora tenha ocorrido uma grande evolução na medicina tradicional a partir da segunda metade do século XX, a utilização de formas farmacêuticas de origem sintética pelas populações carentes ainda enfrenta obstáculos básicos. A falta de acesso aos centros de atendimento hospitalares, dificuldade na obtenção de exames e dos próprios medicamentos é alguns deles. Estes motivos, aliados a fácil obtenção e a grande tradição do uso de plantas medicinais, contribuem para sua utilização pelas populações dos países em desenvolvimento (VEIGA JR. et al., 2005).

Desde a Declaração de Alma-Ata, em 1978, a Organização Mundial de Saúde (OMS) vem expressando a sua posição com respeito à valorização do uso de plantas medicinais no âmbito sanitário (BRASIL, 2005).

No Brasil, a investigação das plantas medicinais e implantação da fitoterapia como prática oficial da medicina foram norteadas por diretrizes do Ministério da Saúde (SILVA et al., 2006). Após a década de 80 diversas Resoluções, Portarias e Relatórios foram elaborados enfatizando a questão das plantas medicinais, sendo que, em 1988, a Resolução CIPLAN Nº 08/88 regulamentou a implantação da fitoterapia nos Serviços de Saúde, nas Unidades Federadas (BRASIL, 2001).

Dentre as ações realizadas pelo Ministério da Saúde, com intuito de desenvolver Políticas na área de Plantas Medicinais e Medicamentos Fitoterápicos destaca-se: a Proposta de Política Nacional de Plantas Medicinais e Medicamentos Fitoterápicos em 2001; o Seminário Nacional de Plantas Medicinais, Fitoterápicos e Assistência Farmacêutica em 2003; a Política de Medicina Natural em 2003; as Práticas Complementares no SUS em 2006; o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos em 2007; a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (Rennisus); a Resolução nº10 de 9 de março de 2010, que estabelece o marco regulatório para produção, distribuição e uso de plantas medicinais, particularmente sob a forma de drogas vegetais e a Resolução nº 26, de 13 de maio de 2014, que dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro/notificação de produto tradicional fitoterápico (BADKE et al., 2012; PETRY; ROMAN JÚNIOR, 2012).

## 2.2 FAMÍLIA LAURACEAE

A família Lauraceae composta por cerca de 2.750 espécies distribuídas em 54 gêneros é prevalente nas regiões tropicais das Américas e da Ásia, apresentando também grande número de espécies na Austrália e Madagascar, porém com número insignificante de espécies na África (VAN DER WERFF, RITCHER, 1996; MADRIÑÁN, 2004). O maior gênero é *Litsea* Lam. com aproximadamente 400 espécies, seguido por *Ocotea* Aubl., *Cryptocarya* R.Br. e *Cinnamomum* Schaeff, com aproximadamente 350 espécies cada (ROHWER, 1993).

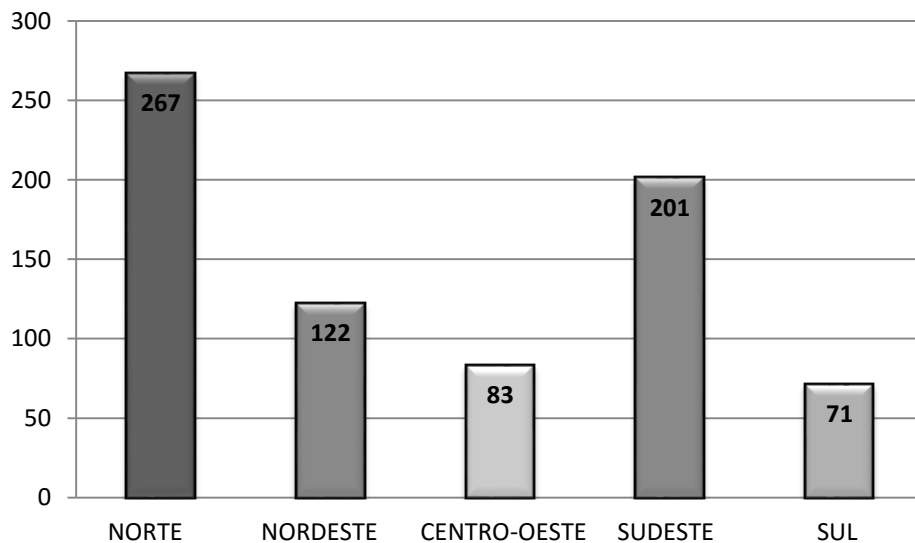
No Brasil, ocorrem 24 gêneros e cerca de 441 espécies distribuídas nas mais diversas regiões, estando presente nas restingas do litoral, nos cerrados e nas

matas, sendo seus domínios fitogeográficos na Amazônia, Caatinga, Cerrado, Floresta Atlântica e Pantanal. No (GRÁFICO 1) é apresentado o número de nomes aceitos de espécies por região brasileira (QUINET et al., 2015; COE-TEXEIRA, 1980).

Esta família encontra-se entre as mais primitivas famílias pertencentes à subclasse Magnoliidae, está posicionada na ordem Laurales, mostrando afinidades com Magnoliales (APG IV, 2016).

Com exceção do gênero *Cassytha* cujas plantas são trepadeiras parasitas as demais espécies são, predominantemente, árvores e, na sua maioria aromática (VAN DER WERFF, 1991). *Cinnamomum canphora* (L.) Presl. e *Lindera benzoin* (L.) Blume conhecidas popularmente por canela e benjoim respectivamente, estão entre as principais espécies produtoras de óleos essenciais da família (COE-TEIXEIRA, 1980).

GRÁFICO 1 - NÚMERO DE NOMES ACEITOS DE ESPÉCIES DA FAMÍLIA LAURACEAE POR REGIÃO BRASILEIRA



FONTE: Lista de Espécies da Flora do Brasil, QUINET et al. (2015).

A importância de Lauraceae na economia coloca-a em posição de destaque. Algumas espécies são utilizadas pelas indústrias para a fabricação de diversos produtos, como demonstrada na (TABELA 1).

TABELA 1 - UTILIZAÇÃO ECONÔMICA DE ALGUMAS ESPÉCIES DA FAMÍLIA LAURACEAE.  
(continua)

<b>Espécie</b>	<b>Nome popular</b>	<b>Usos/Importância econômica</b>
<b>Culinária</b>		
<i>Persea americana</i> Mill.	Abacateiro	Alimento
<i>Laurus nobilis</i> L.,	Louro, loureiro	Erva aromática
<i>Cinnamomum zeylanicum</i> Breyne	canela-do-ceilão	Especiaria
<i>Cinnamomum cássia</i> (Nees) NEES & EBERT ex Blume	canela-da-china	Especiaria
<b>Indústria madeireira</b>		
<i>Ocotea puberula</i> Nees	canela-babosa, louro-abacate, guaiacá	Caixotaria/fabricação de papel
<i>Ocotea organensis</i> (Meiss.) Mez	canela-goiaba, canela-parda, canela-preta	Carpintaria/ obras internas
<i>Ocotea diospyrifolia</i> (Mez)	canela	Postes e taboados de assoalho
<i>Ocotea guianensis</i> Aubl.	louro-branco, cajumari-ran	Pasta para Papel
<i>Ocotea acutifolia</i> Mez	louro-branco-do-paraná, canela-branca	Marcenaria e construções
<i>Ocotea aciphylla</i> (Nees) Mez	canela amarela, canela amarela de cheiro	Construção civil e taboados de assoalho
<i>Ocotea catharinensis</i> Mez	canela-broto, canela-bicho, canela-preta	Construção civil
<i>Ocotea. canaliculata</i> (Rich.) Mez	louro-faia, louro-pimenta, lacre, lacre-preto.	Marcenaria
<i>Ocotea. spectabilis</i> (Meiss.) Mez	canela-amarela, caneleiro, canela- mescla	Marcenaria e construção em geral
<i>Ocotea divaricata</i> (Nees) Mez	canela-soqueira	Marcenaria e construção em geral
<i>Ocotea porosa</i> (Nees) L. Barroso	imbuia, embuia	Marcenaria e construção em geral
<i>Ocotea elegans</i> Nees	canela-ferro, canela-preta	Marcenaria e construção em geral
<i>Aniba terminalis</i> Ducke	pau-rosa	Carpintaria e marcenaria
<i>Aniba firmula</i> (Nees et Mart. ex Nees) Mez	pau-rosa, lou ro-rosa	Carpintaria e marcenaria
<i>Nectandra megapotamica</i> (Spreng.) Mez	canela-amarela, canela-fedorenta, canelinha	Construção civil e naval
<i>Beilshmiedia rígida</i> (Mez) Kosterm.	canela-tapinha	Fabricação de Móveis
<b>Espécies Aromáticas</b>		
<i>Cinnamomum canphora</i> (L.) Presl.	cânfora	Perfumaria e medicamentos, produtora de óleo essencial (linalool)

TABELA 1 - UTILIZAÇÃO ECONÔMICA DE ALGUMAS ESPÉCIES DA FAMÍLIA LAURACEAE.  
(conclusão)

<b>Espécie</b>	<b>Nome popular</b>	<b>Usos/importância econômica</b>
<i>Lindera benzoin</i> (L.) Blume	benjoin	Produtora de óleo essencial (benjoin)
<i>Aniba fragans</i> Ducke	pau-rosa	Produtora de óleo essencial
<i>Aniba canellita</i> (H.B.K) Mez	pau-rosa, casca-preciosa	Perfumaria, produtora de óleo essencial (alibenzeno)
<i>Aniba parviflora</i> (Meissn) Mez	pau-rosa, louro-rosa	Perfumaria, produtora de óleo essencial (benzoato)
<i>Aniba roseodora</i>	pau-rosa	Produtora de óleo essencial (linalool)
<i>Aniba duckei</i>	pau-rosa	Produtora de óleo essencial (linalool)
<i>Aniba firmula</i>	pau-rosa, louro-rosa	Produtora de óleo essencial (benzoato)
<i>Aniba gardneri</i> (Meiss.) Mez	pau-rosa	Produtora de óleo essencial (benzoato)
<i>Aniba permolis</i> (Nees) Mez	pau-rosa	Produtora de óleo essencial (benzoato)
<i>Aniba guianensis</i> Aubl.	pau-rosa	Produtora de óleo essencial (benzoato)
<i>Aniba burchelli</i> Kosterm.	pau-rosa	Produtora de óleo essencial (benzoato)
<i>Aniba hostmanniana</i> (Nees) Mez	pau-rosa	Produtora de óleo essencial (alibenzeno)
<i>Aniba pseudocoto</i> (Reesby) Kosterm	pau-rosa	Produtora de óleo essencial (alibenzeno)
<i>Ocotea pretiosa</i> (Nees)	canela-sassafrás	Produtora de óleo essencial (safrol)
<i>Ocotea costulata</i> Mez	Louro amarelo	Produtora de óleo volátil da madeira com cerca de 45% de terebentina

FONTE: Adaptado de MARQUES (2001).

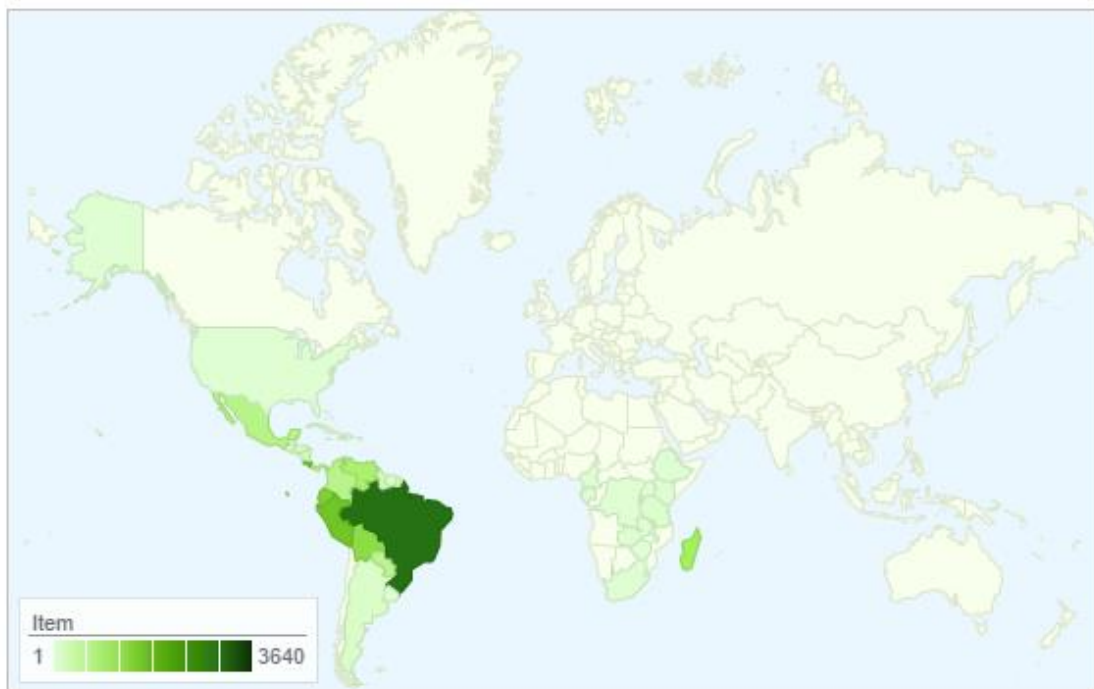
Na medicina popular, Lauraceae apresenta utilização variada, desempenhando diferentes funções contra as mais diversas doenças (MARQUES 2001). A infusão das folhas de *Persea americana* Mill (abacateiro) é utilizada para reumatismo e artrite (ALBUQUERQUE, 2001); *Cinnamomum zeylanicum* (canela) como anti-séptica, digestiva e antiinflamatória (CABRAL; MACIEL, 2011); frutos e folhas de *Nectandra pichurim* (Kunth) Mez são odoríferos e usados contra cólicas e problemas gástricos e o lenho de *Nectandra rodiei* Schomb. é reconhecido como tônico, antipirético, relaxante vascular e antimalárico (MARQUES 2001).

### 2.3 GENÉRO *Ocotea* Aubl.

O gênero *Ocotea* Aubl. foi descrito por Fusée Aublet no ano de 1775, recebendo esta denominação em virtude do nome “Ocoté” dado pelos nativos da Guiana Francesa a *Ocotea guianensis* (COE-TEIXEIRA, 1980). Sua distribuição é predominante na América do Sul e América Central, sendo o maior gênero no neotrópico, com uma representatividade de 300 a 350 espécies. Apresenta-se em menor grau no Oeste da África e Madagascar (FIGURA 1).

No Brasil aproximadamente 172 espécies pertencem a este gênero, apresentando ampla distribuição, com ocorrências confirmadas em todo o território nacional conforme exposto na (FIGURA 2) (QUINET et al., 2015).

FIGURA 1 – DISTRIBUIÇÃO MUNDIAL DO GÊNERO *Ocotea* Aubl.

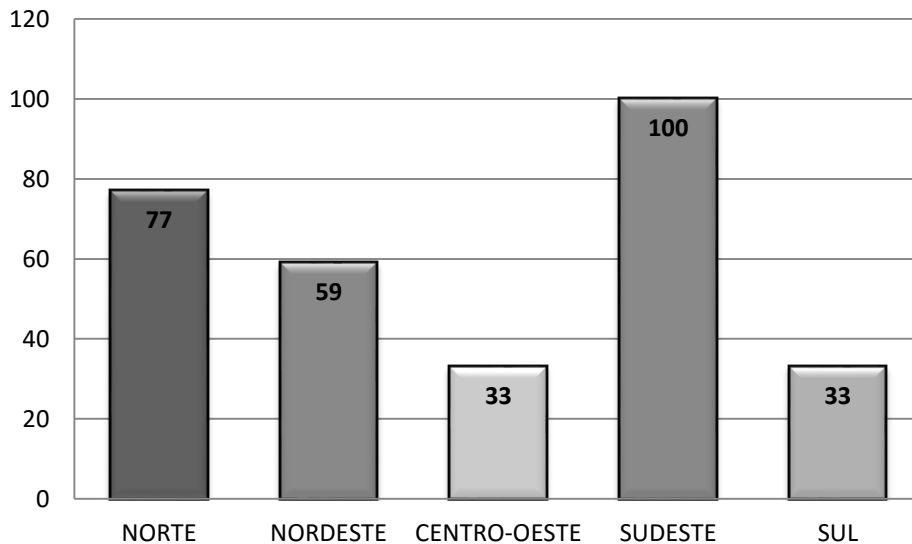


FONTE: TRÓPICOS (2016)

FIGURA 2 – DISTRIBUIÇÃO DO GÊNERO *Ocotea* Aubl. NO BRASIL

FONTE: Lista de Espécies da Flora do Brasil, QUINET et al. (2015).

Os nomes aceitos de espécies do gênero *Ocotea* Aubl. por região brasileira estão demonstrados no (GRÁFICO 2).

GRÁFICO 2 - NÚMERO DE NOMES ACEITOS DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Ocotea* Aubl. POR REGIÃO BRASILEIRA

FONTE: Lista de Espécies da Flora do Brasil. QUINET et al. (2015).

Na lista de Espécies da Flora do Brasil são citadas 33 espécies para o Sul do Brasil. Em um levantamento realizado por Brotto, Cervi e Santos (2013) foi

confirmada a presença de 31 espécies de *Ocotea* no estado do Paraná, sendo que a maioria das espécies se encontra na Floresta Atlântica.

Este gênero apresenta uma grande variabilidade morfológica, por esta razão serve como última opção para espécies que não são prontamente acomodadas em outros gêneros (VAN DER WERFF, 1991).

O gênero *Ocotea* se sobressai pela sua ampla distribuição no território nacional e pela sua utilização no comércio madeireiro. Como exemplo, refere-se às espécies *O. porosa* (imbuia), *O. odorifera*, (sassafrás), *O. puberula* (Rich.) Nees, *O. organensis* (Meisn.) Mez, *O. diospyrifolia* (Meisn.) Mez, *O. guianensis* Aubl. e *O. acutifolia* (Nees) Mez, *O. aciphylla* (Nees & Mart.) Mez, *O. catharinensis* Mez, *O. canaliculata* (Rich.) Mez., *O. spectabilis* (Meisn.) Mez, *O. divaricata* (Nees) Mez, *O. porosa* (Nees & Mart.) Barroso e *O. elegans* Mez utilizadas para diversos fins como fabricação de papel, obras internas e carpintaria, construções de postes e tábuas de assoalho, marcenaria e na construção civil (LORENZI, 2002; MARQUES, 2001).

Em relação ao uso etnomedicinal deste gênero, destacam-se: as folhas de *O. aciphylla* (Nees & Mart.) Mez que são utilizadas como tônico e estomáquico e sua casca como anti-reumática e depurativa; a casca e as folhas de *O. pulchella* (Nees & Mart.) Mez foram relatadas como sendo estomáquicas, emenagogas e tônicas do útero; *O. teleiandra* (Meisn.) Mez, usada contra “dores no peito” e *O. indecora* (Schot) Mez como sudorífica, anti-reumática e até antisifilítica (MARQUES, 2001); *O. bullata* utilizada no tratamento de dor de cabeça, desordens urinárias e problemas estomacais e *O. duckei* no tratamento de enfermidades como neuralgia, dispepsia e anorexia (VILLAMIZAR, 2010).

O gênero *Ocotea* apresenta o maior número de espécies medicinais em sua família, com atividade antioxidante (BRUNI et al., 2004), antimicrobiana e antifúngica (SOUZA et al., 2004), efeito depressor do SNC (MORAIS, BARBOSA-FILHO, ALMEIDA, 1998), atividade antiinflamatória (CHAO et al., 2005) dentre outras atividades, sendo um dos mais estudados na família Lauraceae. A (TABELA 2) apresenta algumas atividades biológicas presentes neste gênero.

TABELA 2 – ATIVIDADES BIOLÓGICAS NO GÊNERO *Ocotea*

<b>Espécies</b>	<b>Atividades</b>	<b>Referências</b>
<i>O. quixos</i>	Atividade inibitória de agregação plaquetária	VILLAMIZAR, 2010
<i>O. bullata</i>	Moderada ação inibitória da ciclooxigenase-1 e lipooxigenase-5	VILLAMIZAR, 2010
<i>O. duckei</i>	Atividade leishmanicida	MONTE NETO et al., 2007
<i>O. odorífera</i>	Atividade antimicrobiana e antioxidante	CANSIAN et al., 2010
<i>O. bullata</i>	Atividade anti-inflamatória	ZSCHOCKE et al., 2000
<i>O. acutifolia</i>	Atividade antimicrobiana	BARNECHE et al., 2010
<i>O. lancifolia</i>	Atividade leishmanicida	FOURNET et al., 2007
<i>O. pulchella</i>	Atividade alelopática	CANDIDO et al., 2016
<i>O. cymosa</i>	Atividade contra <i>Aedes aegypti</i> e atividade antiplasmodial	RAKOTONDRAIBE et al., 2015
<i>O. puberula</i>	Atividade antinociceptiva	MONTRUCCHIO et al., 2012

FONTE: A autora (2016).

A atividade antinociceptiva utilizando a dicentrina, um alcaloide aporfinoide descrita por Montrucchio e colaboradores (2012), foi alvo de patente. O pedido intitulado: “Identificação da propriedade antinociceptiva (analgésica) do alcaloide aporfínico S-(+) –dicentrina e usos do mesmo” está depositado no Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI) sob nº 016339-5 A2 (MIGUEL et al., 2014).

Com relação aos metabólitos secundários, o gênero *Ocotea* é conhecido por ser fonte de alcaloides benzilisoquinoleínicos (TAKAKU; HABER; SETZER, 2007), de lignanas e neolignanas (SILVA; BRAZ-FILHO; GOTTLIEB, 1989) e óleos essenciais constituídos por monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanoides (BRUNI et al., 2004). Vários estudos têm relatado a presença de alcaloides no gênero *Ocotea*. Em uma revisão realizada por Zanin e Lordello (2007), foi descrito a ocorrência de 54 alcaloides aporfinoide dentro do gênero. Vários alcaloides desta classe comumente encontrados em *Ocotea* apresentam pronunciada bioatividade, como a nantenina (bloqueador de contração muscular, translocação de  $Ca^{2+}$ ) (RIBEIRO et al., 2003), e derivados da nantenina (antagonista  $\alpha$  1- adrenoreceptor) (INDRA et al., 2002).

Apesar dos flavonoides serem uma classe de metabólitos secundários frequente nos vegetais, são menos descritos no gênero *Ocotea* quando comparados aos alcaloides. A maioria dos flavonoides isolados no gênero são derivados das agliconas quercetina e de diidroquercetina. Garret e colaboradores (2012) isolou proantocianidina, isoquercitrina, quercitrina, afzelina, catequina, epicatequina e kaempferol e os flavonoides glicosilados quercetina-3-O-β-D-xilose, quercetina O-β-D-glicopiranosídeo a partir das folhas de *O. notata* (Nees & Mart.) Mez. Os flavonoides afzelina e isoquercitrina também foram encontrados em *Ocotea notata* (COSTA et al., 2015). Os flavonoides glicosilados quercetina-3-O-β-D-glicose, quercetina-3-O-β-Dgalactose e quercetina-3-O-β-D-xilose foram encontrados nas folhas de *O. corymbosa* (BATISTA et al., 2010).

#### 2.4 *Ocotea bicolor* Vattimo-Gil

Popularmente esta espécie é conhecida como canela-merda ou canela-fedida, justificado pelo odor desagradável que a madeira apresenta (BROTTO, CERVI; SANTOS, 2013). Tem como sinonímia *Ocotea gurgelii* (VATTIMO-GIL, 1956), *Ocotea paulensis* (VATTIMO-GIL, 1962) e *Ocotea camanducaiensis* (COE-TEIXEIRA, 1980). A (TABELA 3) apresenta os níveis hierárquicos de organização taxonômica desta espécie.

TABELA 3 - ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO DA ESPÉCIE *Ocotea bicolor* Vattimo-Gil

Hierarquia	Taxonomia
Classe	Equisetopsida C. Agardh
Subclasse	Magnoliidae Novák ex Takht.
Superordem	Magnolianaes Takht.
Ordem	Lurales Juss. ex Bercht. & J. Presl
Família	<i>Lauraceae</i> Juss.
Gênero	<i>Ocotea</i> Aubl.

FONTE: TROPICOS (2016).

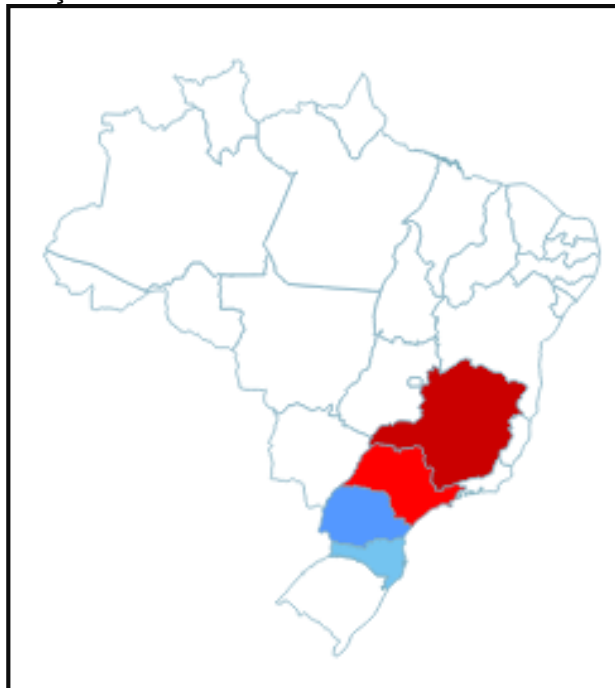
Espécie nativa do Brasil ocorre na região Sudeste, nos estados de Minas Gerais e São Paulo e na região Sul, nos estados do Paraná e Santa Catarina, sendo a Floresta Atlântica seu domínio fitogeográfico, conforme apresentado na (FIGURA

3). Os tipos de vegetação onde está inserida esta espécie são: Campo Rupestre, Cerrado (lato sensu), Floresta Estacional Semidecidual, Floresta Ombrófila (= Floresta Pluvial), Floresta Ombrófila Mista (QUINET et al., 2015). De acordo com Brotto, Cervi e Santos (2013) a espécie é amplamente distribuída no estado do Paraná com exceção do terceiro planalto, sendo frequente na Floresta Ombrófila Densa e Floresta Ombrófila Mista e rara na Floresta Estacional Semidecidual.

Rohwer (1986) considerou que *O. bicolor* é sinônima de *O. corymbosa* (Mesin.) Mez, porém de acordo com Brotto, Cervi e Santos (2013), as principais características que diferem nestas duas espécies são flores e inflorescências pilosas, pistilo com estilete maior e pecíolos com 0,8–2,0 cm de comprimento em *O. corymbosa* enquanto que *O. bicolor* tem flores e inflorescências glabras, pistilo com estilete muito curto ou ausente e pecíolos menores.

Em material fresco a coloração dos frutos maduros é preta e das flores varia entre branca, alva e creme, exalando odor suave. Floresce de novembro a fevereiro, em maio, junho e setembro, com pico de floração entre novembro e fevereiro, frutifica durante o ano todo (BROTTO; CERVI; SANTOS, 2013).

FIGURA 3 – DISTRIBUIÇÃO DA ESPÉCIE *Ocotea bicolor* Vattimo-Gil. NO BRASIL

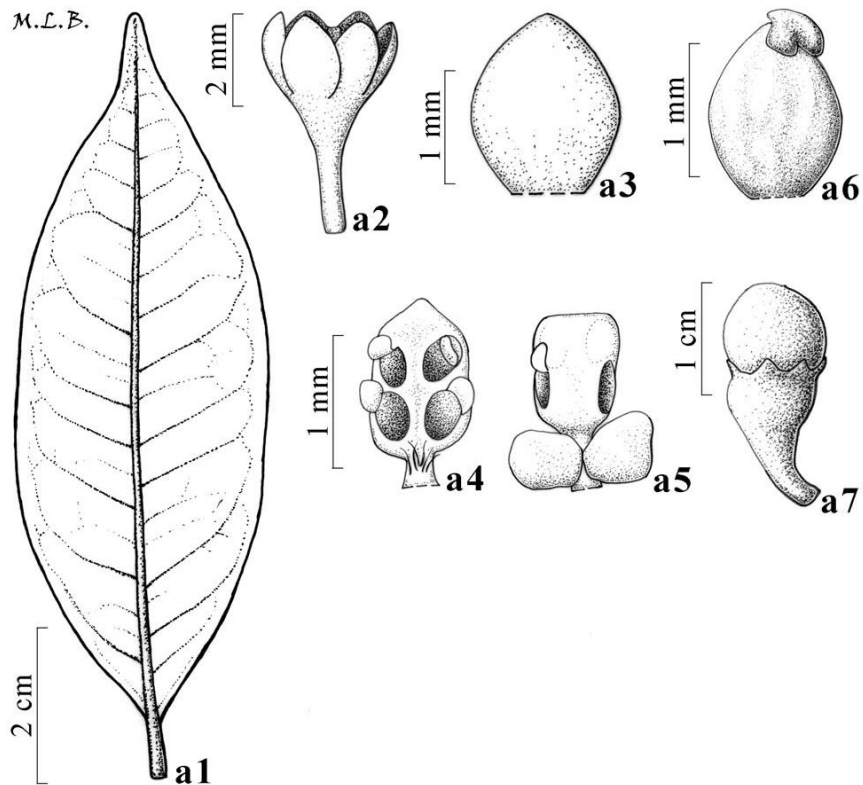


FONTE: Lista de Espécies da Flora do Brasil, QUINET et al. (2015).

Segundo Brotto, Cervi e Santos (2013) o hábito desta espécie é arbustivo, podendo chegar a 12 m de altura com ramos cilíndricos, glabros. As folhas são

alternas, com pecíolo variando de 0,3–1,2 cm comprimento, subcanaliculado, glabro; estreito-elíptica ou elíptica, ápice acuminado, base cuneada, face adaxial glabra, lustrosa, reticulação subdensa, conspícua, nervuras planas, face abaxial glabra, reticulação densa, nervura primária subsaliente, secundárias planas, 6–10 pares, ângulo de divergência 30°–65°, nervação broquidódroma, domácias ausentes. Inflorescências axilares; tirsóide 3–13 cm comprimento, multiflora, glabra. Flores unissexuadas; estaminadas com pedicelo 1,5–3 mm comprimento, hipanto inconspícuo, internamente pubérulo; tépalas 1,6–2,2 mm comprimento, ovalado-elípticas, glabras em ambas as faces, papilas incospícuas no ápice; estames das séries I e II 1–1,3 mm comprimento, filetes  $\frac{1}{2}$  a  $\frac{1}{3}$  do comprimento das anteras, glabrescentes, anteras ovalado-triangulares a ovalado-quadrangulares, ápice agudo, glabras, locelos introrsos; estames da série III 1,1–1,5 mm comprimento, filetes pouco mais curtos que as anteras, glabrescentes, anteras retangulares, ápice truncado, locelos superiores introrsos e inferiores lateral-extrorsos; estaminódios da série IV inconspícuos ou ausentes; pistiloide filiforme ou ausente; pistiladas com estaminódios ca. 0,6 mm comprimento, pistilo ca. 1,5 mm comprimento, glabro, ovário globoso, estilete muito curto ou ausente, estigma capitado. Cúpulas ca. 1 × 1 cm, trompetiformes, margem hexalobada. Frutos ca. 2 × 1,2 cm, elipsoides ou globosos.

A (FIGURA 4) ilustra o formato da folha, flor, tépala, estames, pistilo e fruto desta espécie.

FIGURA 4– *Ocotea bicolor* Vattimo-Gil

FONTE: BROTTTO; CERVI; SANTOS (2013).

NOTA: **a1**, folha (face abaxial); **a2**, flor (♂); **a3**, tépala; **a4**, estame série I; **a5**, estame série III; **a6**, pistilo; **a7**, fruto.

## 2.5 ESTUDO MORFOANATÔMICO

Os estudos anatômicos têm grande importância na resolução de problemas taxonômicos e filogenéticos. Dados de anatomia elucidam com certo grau de confiabilidade, as homologias dos caracteres morfológicos auxiliando a interpretar direções evolucionárias (STUESSY 1991).

A família Lauraceae, apresenta dificuldades na caracterização de suas espécies, devido a uma acentuada uniformidade morfológica (METCALFE 1987; OLIVEIRA; CALLADO; MARQUETE, 2001) além de uma grande homogeneidade nos caracteres anatômicos (CRONQUIST, 1988).

A morfologia dos estames e o desenvolvimento da cúpula do fruto são considerados os caracteres morfológicos de maior importância pelos especialistas na família, e são usualmente empregados nas chaves de identificação, para a

separação entre espécies de Lauraceae (COE-TEIXEIRA, 1980; BROTTTO; CERVI; SANTOS, 2013).

Desse modo, estudos anatômicos de espécies de Lauraceae têm apoiado os estudos taxonômicos do grupo, atuando como uma ferramenta adicional na identificação de táxons (COUTINHO et al., 2006).

## 2.6 CÓDIGO DE BARRA DE DNA

Aliada aos estudos morfológicos e anatômicos, a abordagem molecular se apresenta como uma nova e coadjuvante tecnologia na correta identificação de plantas. Integra o sistema tradicional de identificação de espécies com novas possibilidades tecnológicas (AZEREDO, 2005).

O estabelecimento do código de barra de DNA (*DNA barcode*) foi proposto pela primeira vez por Hebert e colaboradores (2003). Consiste em um sistema único e universal que utiliza sequências de regiões específicas do DNA para a identificação de todos os organismos em nível específico através de um método rápido e preciso (HEBERT et al., 2003).

O *DNA barcode* apresenta diversas finalidades biológicas, como em inventários florísticos e delimitações na taxonomia de espécies, onde nem sempre é possível a coleta de indivíduos completos para a identificação taxonômica a partir de padrões morfológicos; espécies recentemente descritas; revisões taxonômicas; detecção de espécies invasoras no ecossistema; auxiliar na luta contra o comércio ilegal de espécies ameaçadas de extinção e madeira extraída ilegalmente. Pode também ser utilizado como um recurso forense podendo, assim, confirmar e auxiliar no reconhecimento de espécies de plantas sujeitas a biopirataria (COSTION et al., 2011; HEBERT et al., 2003).

Além dos diversos usos práticos desta tecnologia, o *DNA barcode* pode ser considerado o núcleo de um sistema taxonômico integrado, onde a bioinformática desempenha um papel fundamental (CASIRAGHI, 2010).

Alguns critérios devem ser atendidos para que uma região seja ideal na aplicação desta técnica: o fragmento deve ter sequência com comprimento curto, para facilitar a amplificação e o sequenciamento; apresentar sítios conservados para o desenvolvimento de *primers* universais e ser suficientemente variável para separar espécies irmãs (FORD et al., 2009).

Inicialmente o DNA *Barcode* foi proposto para identificação de espécies animais baseando-se na amplificação e sequenciamento de uma região do gene mitocondrial codificador da enzima Citocromo C Oxidase I (COI) (HEBERT; GREGORY, 2005). Para as espécies vegetais, após vários estudos e o estabelecimento de um grupo de Trabalho de Plantas do *Consortium for the Barcode of Life* (CBOL), chegou-se a um consenso na utilização de um marcador *multiloci* encontrados no DNA de cloroplastos que combina um marcador mais lento e conservado, o ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (*rbcL*), com outro mais variável e de melhor resolução, o gene que codifica a proteína maturase *K* (*matK*) (HOLLINGSWORTH; GRAHAM; LITTLE, 2011).

## 2.7 ÓLEO ESSENCIAL

Os óleos essenciais (OE) são compostos naturais, de baixo peso molecular, alguns altamente voláteis, caracterizado por um odor forte, capazes de gerar sabores e/ou aromas. São formados no metabolismo secundário de plantas aromáticas, podendo ser extraídos de parte das plantas como folhas, frutos, flores, cascas, ou de plantas inteiras, como especiarias e ervas medicinais (TROMBETTA *et. al*, 2005, EDRIS, 2007; BAKKALI *et al.*, 2008).

A presença de óleos essenciais é abundante em angiospermas, tais como nas famílias Asteraceae, Apiaceae, Lamiaceae, Lauraceae, Myrtaceae, Myristicaceae, Piperaceae e Rutaceae, entre outras (SIMÕES *et al.*, 2007). Os óleos essenciais podem ocorrer, dependendo da família, em estruturas secretoras especializadas, como em tricomas glandulares (Lamiaceae), células parenquimáticas diferenciadas (Lauraceae, Piperaceae, Poaceae), canais oleíferos (Apiaceae) ou em bolsas lisígenas ou esquizolisígena (Pinaceae, Rutaceae) (MARQUES *et al.*, 2008).

Diferentes métodos podem ser usados na extração do OE, como hidrodestilação, destilação a vapor, CO<sub>2</sub> supercrítico, ou com a utilização de solventes orgânicos ou gorduras. Os aspectos de caracterização química dos OE podem ser obtidos por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (TROMBETTA *et. al*, 2005, EDRIS, 2007; BAKKALI *et al.*, 2008).

Os OE são constituídos por misturas naturais complexas que podem conter 20-60 compostos em concentrações diferentes, porém, geralmente um, dois ou três

deles são encontrados em proporções maiores, sendo denominados de compostos majoritários (BAKKALI et al., 2008). Terpenoides e inúmeros hidrocarbonetos alifáticos de baixo peso molecular, ácidos, álcoois, aldeídos, ésteres acíclicos ou lactonas, destacando-se a presença de terpenos, isopropanoides, aromáticos e constituintes alifáticos que são os componentes químicos mais encontrados. Sendo os terpenos e aromáticos, os principais responsáveis pelas aplicações medicinais, culinárias e flavorizantes (DORMAN, 2000).

O grupo dos terpenoides é derivado do difosfato de isopentenila (IPP). Este pode ser originado por duas rotas biossintéticas diferentes, porém ambas oriundas da glicose: via do mevalonato (MVA) e rota da desoxi-xilulose fosfato (DXP). (DEWICK, 2002).

A união cabeça-cauda de unidades C<sub>5</sub>, 3-isopentenil pirofosfato (IPP) e 3,3'-dimetilalil pirofosfato (DMPP) é característica dos compostos do grupo dos terpenos. A adição sequencial de unidade IPP com DMPP formam o difosfato de geranila (GPP), difosfato de farnesila (FPP) e difosfato de geranylgeranila (GGPP), precursores dos monoterpenos, sesquiterpenos e diterpenos, respectivamente (SIMÕES *et al* 2007; DEWICK, 2002). Na maioria dos óleos essenciais de Lauraceae reportados na literatura observa-se a predominância de sesquiterpenos, principalmente de hidrocarbonetos sesquiterpênicos (CHAVERRI; CICCÍÓ, 2008).

Diversas aplicações farmacológicas podem ser atribuídas aos óleos essenciais. Apresentam atividade contra uma ampla variedade de microrganismos: vírus, fungos, protozoários e bactérias (SOLÓRZANO-SANTOS; MIRANDA-NOVALES, 2011). São utilizados a muito tempo na preservação de alimentos, como analgésico, sedativo, anti-inflamatório, espasmolítico e até como anestésicos locais (BAKKALI et al., 2008). A atividade antioxidante é conferida pela presença de compostos contendo um ou mais grupos hidroxila ( $^{\cdot}\text{OH}$ ), ou metoxila ( $\text{CH}_3\text{O}^{\cdot}$ ) ligados ao anel aromático, insaturações e elétrons disponíveis para serem doados (CARVALHO, 2004).

Na (TABELA 4) podem ser conferidas as atividades biológicas atribuídas a óleos essenciais extraídos de plantas da família Lauraceae, e seus respectivos compostos majoritários.

TABELA 4 – ÓLEO ESSENCIAL NA FAMÍLIA LAURACEAE, RESPECTIVOS COMPONENTES MAJORITÁRIOS E ATIVIDADES BIOLÓGICAS / FARMACOLÓGICAS

(continua)

Espécie vegetal	Constituintes majoritários	Método de extração do óleo essencial	Método de identificação dos componentes	Atividades biológicas e farmacológicas	Referência
<i>Aniba canelilla</i> (H.B.K.) Mez (Folhas e caules finos e tronco)	1-nitro-2feniletano (91.8% /74%)**	Hidrodestilação	GC-MS	Atividade antioxidante	DA SILVA et al., 2007
<i>Aniba canelilla</i> (H.B.K.) Mez (tronco)	1-nitro-2-feniletano (92.1%/70.2%)** Metileugenol (4.3%/25.8%)**	Hidrodestilação	GC-MS	Atividade antioxidante e letalidade sobre <i>Artemia salina</i>	DA SILVA et al., 2007
<i>Aniba canelilla</i> (H.B.K.) Mez (casca do tronco)	1-nitro-2-feniletano (90.3%)	Hidrodestilação	GC-MS	Atividade antioxidante	DA SILVA et al., 2007
<i>Cinnamomum cassia</i> Blume	Trans-cinamaldeido (85.06%) o-metoxi- cinamaldeido (8,79%)	Amostra comercial (Hidrodestilação)	GC/MS	Atividade antibacteriana e antifúngica	OOI et al., 2006
<i>Cinnamomum cássia</i> (casca)	2-hidroxicinamaldeido*	Arraste a vapor	GC	Citotoxicidade <i>in vitro</i> e função hepática <i>in vivo</i>	CHOI et al., 2001
<i>Cinnamomum cassia</i> Presl	<i>cis</i> -2- ácido metoxicinamico (43.06%) Cinamaldeido(42.37%)	Arraste a vapor	GC-MS	Atividade anti-tirosinase e anti-melanogênica	CHOU et al., 2013
<i>Cinnamomum cássia</i> <i>Cinnamomum aromaticum</i>	Cinamaldeido (87.23%)	Amostra comercial (hidrodestilação)	*** Não descrito	Atividade antifúngica	KOCEVSKI et al., 2013

TABELA 4 – ÓLEO ESSENCIAL NA FAMÍLIA LAURACEAE, RESPECTIVOS COMPONENTES MAJORITÁRIOS E ATIVIDADES BIOLÓGICAS / FARMACOLÓGICAS

(continuação)

Espécie vegetal	Constituintes majoritários	Método de extração do óleo essencial	Método de identificação dos componentes	Atividades biológicas e farmacológicas	Referência
<i>Cinnamomum osmophloeum</i> Kaneh.(folha)	1,8-cineole (17%) Santolina trieno (14.2%) Epatulenol (15.7%) Oxido de cariofileno (11.2%)	Hidrodestilação	GC-MS	Atividade antiinflamatória	CHAO et al., 2005
<i>Cinnamomum tamala</i> (folha)	Cinamaldeido (44.898%) Trans cinamil acetato (25.327%), Ascabin (15.249%)	Hidrodestilação	GC-MS	Atividade antioxidante, antidiabética e potencial hipolipemiante	KUMAR; VASUDEVA; SHARMA, 2012
<i>Cinnamomum verum</i> (caule) <i>Cinnamomum zeylanicum</i> ; <i>Laurus cinnamomum</i>	(E) -cinamaldeido (81,52%) Eugenol (16.68%)	Amostra comercial	GC-MS	Atividade inibitória de <i>Trypanosoma cruzi</i>	AZEREDO et al., 2014
<i>Cinnamomum verum</i> (bark) <i>Cinnamomum Zeylanicum</i> , <i>Laurus Cinnamomum</i>	t-cinamonaldeido (4.3%) Eucaliptol (0.32%)	Hidrodestilação	GC/MS	Atividade antibacteriana	NAVEED et al (2013)
<i>Cryptocarya alba</i> Looser (folha)	1-terpinen-4-ol (28,19%) $\beta$ -terpineno(23.08%) eucalyptol (18.9%)	Arraste a vapor	GC-MS	Atividade antibacteriana e antifúngica	LORCA et al 2012
<i>Laurus nobilis</i>	1,8-Cineol (16.3%/32.1%) $\alpha$ -Terpenil acetato (16.6%/15.6%) Linalol (10.9%/2.1%) Metil eugenol (11%/10.6%) **	Hidrodestilação	GC-MS	Atividade antibacteriana e antifúngica	MARZOUKI et al., 2009

TABELA 4 – ÓLEO ESSENCIAL NA FAMÍLIA LAURACEAE, RESPECTIVOS COMPONENTES MAJORITÁRIOS E ATIVIDADES BIOLÓGICAS / FARMACOLÓGICAS

(continuação)

Espécie vegetal	Constituintes majoritários	Método de extração do óleo essencial	Método de identificação dos componentes	Atividades biológicas e farmacológicas	Referência
<i>Laurus nobilis</i>	1,8-Cineol (17.6%/31%) α-Terpinil acetato(10.6%/15.3%) Linalol (13.4%/2.2%) Metil eugenol (10.6%/10.2%) **	Fluído supercrítico	GC-MS	Atividade antibacteriana e antifúngica	MARZOUKI et al., 2009
<i>Laurus nobilis</i>	1.8-Cineol (44.72%) α-Terpinil acetato (12.95%) Sabineno(12.82%)	Hidrodestilação	GC/MS	Atividade antioxidante e antibacteriana	OZCAN et al., 2010
<i>Laurus nobilis</i> Linnaeus	Eucaliptol (27.2%) α-terpinenil acetato (10.2%) Linalol (8.4%) metileugenol(5.4%)	Hidrodestilação	GC-MS	Atividade antioxidante e antibacteriana	RAMOS et al., 2012
<i>Laurus nobilis</i>	1,8-cineole (60.72%) α-terpineno (12.53%) Sabineno (12.12%) α-pineno (6.11%)	Arraste a vapor	GC-MS	Atividade antibacteriana	DADALIOGLU; EVRENDILEK, 2004
<i>Lindera neesiana</i> Kurz (frutos)	Z-citral (15.08%) E-citral (11.89%) Eucaliptol (8.75%) Citronelal (6.72%) α-pineno (6.63%) β-pineno (5.61%)	Hidrodestilação	GC-MS, <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C and bidimensional NMR techniques	Atividade antibacteriana e antifúngica	COMAI et al., 2010
<i>Litsea cubeba</i>	Citral (neral +geranial) (69.8%) Limoneno (12.7%)	Hidrodestilação	GC-MS and GC-FID	Atividade antibacteriana	LIU; YANG, 2012

TABELA 4 – ÓLEO ESSENCIAL NA FAMÍLIA LAURACEAE, RESPECTIVOS COMPONENTES MAJORITÁRIOS E ATIVIDADES BIOLÓGICAS / FARMACOLÓGICAS

(continuação)

Espécie vegetal	Constituintes majoritários	Método de extração do óleo essencial	Método de identificação dos componentes	Atividades biológicas e farmacológicas	Referência
<i>Ocotea comoriensis</i> Kostermans	Canfeno (18.1%) Bornilacetato (13.8%) $\alpha$ -pineno (13.7%)	Hidrodestilação	GC/MS	Atividade antimalárica	MENUT et al., 2002
<i>Ocotea duckey</i> (fruto)	dl-limoneno (30.12%) $\alpha$ -pineno (12.25%) $\beta$ -pineno (9.89%)	Hidrodestilação	GC-MS	Efeitos hipotensores e bradicárdicos	BARBOSA FILHO et al., 2008
<i>Ocotea duckey</i> (folha)	<i>trans</i> - cariofileno (60.54%)	Hidrodestilação	GC-MS	Efeitos hipotensores e bradicárdicos	BARBOSA FILHO et al., 2008
<i>Ocotea duckey</i> (casca)	$\beta$ -Eudesmol (27.51%)	Hidrodestilação	GC-MS	Efeitos hipotensores e bradicárdicos	BARBOSA FILHO et al., 2008
<i>Ocotea duckey</i> (raízes)	Elemol (24.31%) $\beta$ -elemeno (16.69%) $\beta$ -Eudesmol (13.44%)	Hidrodestilação	GC-MS	Efeitos hipotensores e bradicárdicos	BARBOSA FILHO et al., 2008
<i>Ocotea quixos</i> (cálices dos frutos)	<i>trans</i> -cinnamaldeido (27.9%) metilcinamato (21.7%) 1, 8-cineole (8.0%)	Arraste a vapor	GC e GC-MS	Atividade antioxidante, antibacteriana e antifúngica	BRUNI et al., 2004
<i>Persea lingue</i> (Ruiz & Pav.) Nees (folha)	Safrol (48.5%) Pentatriaconteno (20.42%) Eucaliptol (30.25%)	Arraste a vapor	GC-MS	Atividade antibacteriana e antifúngica	LORCA et al 2012
<i>Rhodostemonodaphne parvifolia</i> Madriñán (folha)	$\beta$ -cariofileno (41.30%) $\beta$ -selineno (13.60%) B germacreno (7.75%)	Hidrodestilação	GC-FID and GC-MS	Atividade antioxidante e inibição de acetilcolinesterase	ALCÂNTARA et al., 2010

TABELA 4 – ÓLEO ESSENCIAL NA FAMÍLIA LAURACEAE, RESPECTIVOS COMPONENTES MAJORITÁRIOS E ATIVIDADES BIOLÓGICAS / FARMACOLÓGICAS

(conclusão)

Espécie vegetal	Constituintes majoritários	Método de extração do óleo essencial	Método de identificação dos componentes	Atividades biológicas e farmacológicas	Referência
<i>Rhodostemonodaphne parvifolia</i> Madríñan (casca)	$\beta$ - cariofileno (16.20%) Epi-cedrol (13.3%) linalool(15.4%)	Hidrodestilação	GC-FID and GC-MS	Atividade antioxidante	ALCÂNTARA et al., 2010
<i>Persea lingue</i> (Ruiz & Pav.) Nees (folha)	Safrol (48.5%) Pentatriaconteno (20.42%) Eucaliptol (30.25%)	Arraste a vapor	GC-MS	Atividade antibacteriana e antifúngica	LORCA et al 2012
<i>Laurus nobilis</i>	1,8-Cineol (16.3%/32.1%) $\alpha$ -Terpenil acetato (16.6%/ 15.6%) Linalol (10.9%/2.1%) Metil eugenol (11%/10.6%) **	Hidrodestilação	GC-MS	Atividade antibacteriana e antifúngica	MARZOUKI et al., 2009
<i>Laurus nobilis</i>	1,8-Cineol (17.6%/31%) $\alpha$ -Terpinil acetato(10.6%/15.3%) Linalol (13.4%/2.2%) Metil eugenol (10.6%/10.2%) **	Fluído supercrítico	GC-MS	Atividade antibacteriana e antifúngica	MARZOUKI et al., 2009
<i>Ocotea comoriensis Kostermans</i>	Canfeno (18.1%) Bornilacetato (13.8%) $\alpha$ -pineno (13.7%)	Hidrodestilação	GC/MS	Atividade antimalárica	MENUT et al., 2002
<i>Cinnamomum verum</i> (bark) <i>Cinnamomum</i> <i>Zeylanicum, Laurus</i> <i>Cinnamomum</i>	t-cinamonaldeido (4.3%) Eucaliptol (0.32%)	Hidrodestilação	GC/MS	Atividade antibacteriana	NAVEED et al (2013)

FONTE: A autora (2016).

\*Não apresenta quantificação

\*\*Coletas em locais e/ou períodos diferentes

## 2.8 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Antioxidantes compreendem substâncias que presentes em baixas concentrações, quando comparadas ao substrato oxidável, retardam de forma significativa ou inibem a oxidação desse substrato (HALLIWELL et al., 2000).

Em condições fisiológicas normais, a produção de radicais livres é balanceada por um eficiente sistema antioxidante, formado por moléculas capazes de retirar esses radicais do organismo, prevenindo o dano celular (FERREIRA, MATSUBARA, 1997). Nesse contexto, os dois principais meios de defesa antioxidante no organismo podem ser divididos em dois grupos: enzimáticos e não-enzimáticos. Os sistemas enzimáticos envolvem as enzimas do ciclo redox da glutathione, particularmente a glutathione redutase e a glutathione peroxidase. Outros sistemas enzimáticos incluem a superóxido dismutase, que catalisa conversão do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio, bem como a catalase, que converte o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (JÚNIOR et al., 2001). Entre as defesas antioxidantes não enzimáticas destacam-se compostos como a glutathione, o  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), o ácido ascórbico (vitamina C), o ácido lipóico, os carotenóides, os flavonoides, entre outros (FERREIRA; ABREU, 2007; BARREIROS; DAVID, DAVID, 2006).

As plantas são capazes de produzir uma grande variedade de substâncias com ação antioxidante. Entre eles, os compostos fenólicos compreendem o principal grupo de compostos com ação antioxidante de origem vegetal, sobretudo por inibirem a peroxidação lipídica e a lipooxigenase *in vitro*, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Destes, os flavonoides constituem o grupo mais importante (BEHLING et al., 2004, SOARES, 2002).

## 2.9 ATIVIDADE TÓXICA

O conhecimento popular de que plantas medicinais podem ser utilizadas indiscriminadamente por ser de origem natural reforçam a importância de ensaios de toxicidade. Estes estudos objetivam averiguar a segurança do uso de plantas na medicina popular, assim como extratos e outros insumos obtidos através de produtos naturais (MERINO et al., 2015; BEDNARCZUK, et al., 2010).

Entre esses ensaios o de toxicidade em *Artemia salina*, um microcrustáceo de água salgada, é largamente utilizado em pesquisas preliminares de atividade biológica de extratos e frações obtidos a partir de produtos naturais. Tem sido estabelecido como um método sensível, simples, prático e econômico, cujas aplicações se ampliam para investigação de fontes de toxicidade de amostras ambientais e misturas químicas, detecção de toxinas naturais em alimentos e produtos farmacêuticos, além de parâmetros de citotoxicidade (MEYER *et al.*, 1982; PERSOONE; WELLS, 1987; SUBHAN *et al.*, 2008).

## 2.10 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

Uma alternativa terapêutica para o tratamento de micro-organismos resistentes a antibióticos é a utilização de extratos vegetais. Entre as vantagens no uso de compostos antibacterianos de plantas medicinais destaca-se: menos efeitos colaterais; melhor tolerância do paciente; menor custo; melhor aceitação devido à longa história de uso (GUERRINI *et al.*, 2006; PAREKH; CHANDA, 2007).

Além disso, a terapia da combinação entre extratos de plantas e antibióticos pode expandir o espectro antimicrobiano, evitando o aparecimento de resistência mutante e minimizando a toxicidade. Muitas vezes o efeito sinérgico exercido pela a combinação de drogas, ultrapassa o seu desempenho individual, tornando o agente antibacteriano mais eficaz na inibição de uma espécie particular de micro-organismo (CHANDA; RAKHOLYA, 2011).

Entre os mecanismos de ação de produtos naturais estão a desintegração da membrana citoplasmática, desestabilização da força próton motriz, fluxo de elétrons, transporte ativo e coagulação do conteúdo celular. No entanto, nem todos os mecanismos de ação agem em alvos específicos, podendo alguns sítios ser afetados em consequência de outros mecanismos (BURT, 2004).

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 MATERIAL BOTÂNICO

A coleta do material botânico foi realizada no capão do Cifloma no Campus Botânico da Universidade Federal do Paraná, município de Curitiba, estado do Paraná, Brasil, nas coordenadas aproximadas de 25°26'50.0"S 49°14'24.4"W, em 12 de agosto de 2015.

A identificação da espécie vegetal (FIGURA 5) foi realizada pelo Engenheiro Florestal Marcelo Leandro Brotto, especialista em *Ocotea*, do Museu Botânico Municipal (MBM) de Curitiba-PR. A excisata da espécie foi depositada no Herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Paraná (UPCB), sob número 88118.

O estudo com esta espécie possui autorização do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (IBAMA) para o acesso de amostras do patrimônio genético para fins de pesquisa científica sem potencial de uso econômico, constantes no Processo 02001.001165/2013-47 (ANEXO1).

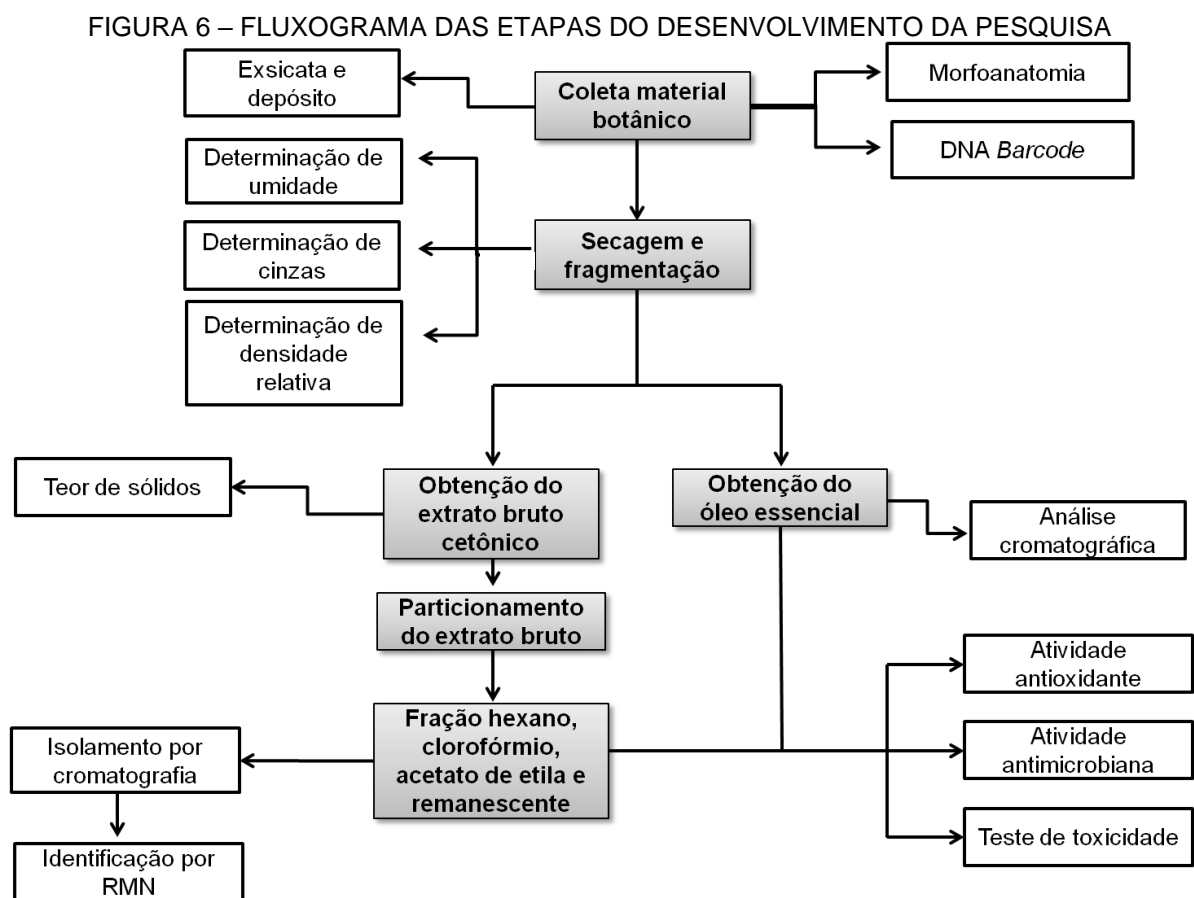
FIGURA 5 - FOTOGRAFIA DA ESPÉCIE *Ocotea bicolor* NO LOCAL DA COLETA



FONTE: A autora (2015).

O material coletado, após separação das folhas e secagem a sombra, em local fresco, arejado e protegido de umidade, foi moído em moinho de facas e martelos para obtenção do extrato e frações. Parte deste material foi acondicionado em refrigerador para a extração do óleo essencial. Folhas frescas foram utilizadas para a realização do DNA *Barcode* e parte destas devidamente preparadas para a realização do estudo morfoanatômico.

As etapas desta pesquisa estão relatadas através de um fluxograma esquemático apresentado na (FIGURA 6).



FONTE: A autora (2015).

### 3.2 ESTUDO MORFOANATÔMICO

As pesquisas referentes aos caracteres morfoanatômicos foram efetuadas com folhas de *Ocotea bicolor* Vattimo-Gil. O material vegetal foi fixado em FAA 70% que consiste em uma solução de formaldeído (5 mL), ácido acético glacial (5 mL) e

álcool a 70% (90 mL) (JOHANSEN, 1940) e estocado em etanol a 70% (v/v) após 7 dias em FAA a 70% (BERLYN; MIKSCHE, 1976).

### 3.2.1 Preparo das lâminas

#### 3.2.1.1 Técnica de diafanização ou clareamento

O material vegetal foi seccionado e deixado em água em vidro de relógio. Em seguida, foi clarificado em placa de Petri, utilizando como alvejante uma solução de hipoclorito de sódio por um período de 24 horas. Após o clareamento da amostra, a mesma foi lavada em água destilada por 6 vezes de 15 em 15 minutos. Para neutralizar o pH, o material foi lavado em uma solução de ácido acético a 5%, lavado novamente em água destilada e corado. Após este processo foi efetuado o processo de montagem da lâmina (FUCHS, 1963).

#### 3.2.1.2 Lâminas semipermanentes

As lâminas semipermanentes foram obtidas através de secções transversais e longitudinais, à mão livre (OLIVEIRA, AKISUE, 1997). Os cortes foram corados com azul de astra e fucsina básica e azul de toluidina (O'BRIEN, FEDER, McCULLY, 1964). Para a montagem das lâminas foi utilizada glicerina a 50% (BERLYN e MIKSCHE, 1976) e a lutagem com esmalte incolor (BEÇAK; PAULETTE, 1976).

### 3.2.2 Testes histoquímicos

Para os testes histoquímicos foram realizadas secções transversais à mão livre do material fixado e utilizados reativos específicos para cada classe de substâncias (TABELA 5).

Os resultados foram registrados através de fotomicrografias em microscópio óptico acoplado à câmera digital.

TABELA 5 – REATIVOS PARA O TESTE HISTOQUÍMICO

Reativos	Compostos	Referência
Cloreto férrico	Compostos fenólicos	JOHANSEN, 1940
Sudam III	Lipídeos	SASS, 1951
Floroglucina clorídrica	Liginina	FOSTER, 1949
Lugol	Amido	BERLYN; MIKSCHE, 1976
Ácido sulfúrico	Cristais de oxalato de cálcio	OLIVEIRA; AKISUE; AKISUE, 1991

FONTE: A autora (2016).

### 3.2.3 Microscopia eletrônica de varredura

A análise ultraestrutural de superfície foi realizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) (SOUZA,1998) em alto vácuo. Para tal procedimento, as amostras foram fixadas em FAA 70, desidratadas em série etanólica crescente e pelo ponto crítico, posteriormente foi realizada a metalização da amostra.

## 3.3 CÓDIGO DE BARRA DE DNA

### 3.3.1 Extração do DNA

A extração de DNA foi realizada conforme o protocolo proposto por Doyle e Doyle (1990), adaptado a microtubos utilizando 150 mg de material fresco macerado com nitrogênio líquido. O material transferido para microtubulos de 2 mL foi incubado em banho-termostatizado a 65°C durante 30 minutos em tampão de extração de 2X CTAB (CTAB 2%; NaCl 1,4M; Tris-HCl 100 mM, pH 8,0; EDTA 20 mM, pH 8,0; PVP 2%) e 4µl de mercaptoetanol, e após mantido em bancada até atingir a temperatura ambiente. O material foi purificado com clorofórmio: álcool isoamílico (24:1), precipitado em isopropanol gelado e ressuspendido no tampão TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM). O DNA foi purificado em coluna seguindo as especificações do fabricante. O DNA foi conferido em gel de agarose a 1% com tampão TBE 1x, utilizando-se tampão de carregamento 5x a 60 volts durante 15 minutos. Após a purificação o DNA foi quantificado em espectrofotômetro e armazenado no ultrafreezer -80°C.

### 3.3.2 Amplificação em Reação de Cadeia de Polimerase (PCR)

Duas regiões codificadoras do DNA plastidial foram amplificadas, as regiões *matK* e *rbcL* de acordo com as recomendações do CBOL *Working Plant Group* (2009). Para a região *matK* foram empregados os oligonucleotídeos iniciadores descritos por Dunning e Savolainen (2010), sendo o *forward* 3F\_KIM (5'-CGT ACA GTA CTT TTG TGT TTA CGA G-3') e o *reverse* 1R\_KIM (5'- ACC CAG TCC ATC TGG AAA TCT TGG TTC-3'). Para a região *rbcL* foram empregados o iniciador *forward* *rbcLa\_F* (5'-ATG TCA 27 CCA CAA ACA GAG ACT AAA GC-3') descrito por Kress e Erickson (2007) e o *reverse* 724R (5'TCG CAT GTA CCT GCA GTA GC-3') descrito por Fay et al. (1997), sentido 3' a 5'. Após a extração, purificação e quantificação do DNA, foram realizadas as amplificações em cadeia de polimerase (PCR) num volume de 40 µl. Ambas as regiões, *matK* e *rbcL*, foram amplificadas em 35 ciclos, com uso de termociclador. Os reagentes da reação de amplificação da região *matK* empregados foram: buffer 1x, DMSO 4%, dntp 0,2 mM, BSA 0,1mg/mL, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, 1µM de primer *forward* e *reverse*, taq 2U, 40 ng de DNA. As condições da reação de amplificação consistiram em desnaturação inicial a 94°C por um minuto e 35 ciclos com desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 46°C por 40 segundos, extensão a 72°C por 40 segundos e uma extensão final a 72°C por 5 minutos. Na amplificação da região *rbcL* foram empregados os reagentes: buffer 1x, dntp 0,2 mM, BSA 0,1mg/mL, MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM, 0,5mM de primer *forward* e *reverse*, taq 1U, 40 ng de DNA. Para essa região as condições da reação de amplificação foram: desnaturação inicial a 94°C por dois minutos e 35 ciclos com desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 58°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 30 segundos e uma extensão final a 72°C por 10 minutos. Os fragmentos amplificados foram purificados em coluna Qiagen® conforme as recomendações do fabricante. O DNA foi conferido em gel de agarose a 1% com tampão TBE 1x, utilizando-se tampão de carregamento 5x a 60 volts durante 30 minutos. A seguir o gel foi fotodocumentado e quantificado.

### 3.3.3 Reação de Sequenciamento

A reação de sequenciamento foi realizada para um volume final de 10 µl com fragmentos amplificados contendo 40 ng de DNA, 0,5 µM de iniciador, buffer 5x, 1 µl de Big Dye e água q.s.p. 10 µl. As seguintes condições foram empregadas: desnaturação inicial a 96°C por 1 minuto com 26 ciclos de desnaturação a 96°C 10 segundos, 28 anelamento a 50°C por 5 segundos, extensão a 60°C por 4 minutos. As amostras foram purificadas com acetato de amônio 7,5M, utilizando-se acetato de amônio (2 µl) e etanol absoluto (60 µl) em cada amostra de 20 µl, que foram mantidas durante 20 minutos no gelo e centrifugadas por 25 minutos a 13000 rpm a 10°C. Após a retirada do sobrenadante, foram centrifugadas com etanol a 70% por 10 minutos a 13000 rpm, o sobrenadante será retirado por inversão dos tubos. Essa etapa foi repetida mais uma vez, e os tubos foram mantidos abertos protegidos da luz por 12 horas. As amostras foram ressuspensas em 10 µl de formamida e levadas ao termociclador a 96°C por 5 minutos e 4°C por 1 minuto e em seguida mantidas no gelo durante 15 minutos. Em seguida foram sequenciadas em sequenciador automático com eletroforese capilar.

### 3.3.4 Análise das Sequências

Os cromatogramas e as sequências foram visualizados e editados no software *Staden Package* (STADEN, 1996). As sequências foram pré-processadas no Pregap4, onde foram configurados os parâmetros para o consenso: correspondência exata de no mínimo 15%, número máximo de blocos 70% e percentagem máxima de incompatibilidade 60%. No programa Gap4 as sequências foram editadas, baseando-se no índice mínimo de confiabilidade de 20 a 30 entre os cromatogramas para a escolha da base correta. As sequências obtidas foram comparadas com sequências depositadas no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) para verificar similaridades com espécies da família Lauraceae, utilizando-se a ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (ALTSCHUL, 1990; <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e no BOLD Systems ([http://boldsystems.org/index.php/IDS\\_OpenIdEngine](http://boldsystems.org/index.php/IDS_OpenIdEngine)). As sequências foram depositadas no *GenBank* ([www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/)).

### 3.4 EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

A extração do óleo essencial foi realizada por meio da técnica de hidrodestilação, utilizando-se o aparelho de Clevenger modificado por WASICKY (1963), baseando-se na técnica apontada pela Farmacopeia Brasileira V (2010).

Cem gramas de folhas trituradas foram colocados em um balão volumétrico, juntamente com pedaços de porcelana para evitar uma superebulição. Acrescentou-se água destilada até 20 vezes o volume das folhas secas. O balão foi acoplado ao aparelho de Clevenger (FIGURA 7) e mantido sobre uma manta térmica a 95°C, aproximadamente. A extração ocorreu durante um período de 6 horas intermitentes, segundo a Farmacopeia Brasileira V (2010).

Decorrido o tempo da extração, foi realizada a leitura do volume do óleo essencial diretamente na escala volumétrica do tubo separador do aparelho de Clevenger e, posteriormente calculado o resultado em mililitros (mL/%) de óleo essencial por 100 g da droga, conforme preconizado na Farmacopeia Brasileira V (2010).

O óleo resultante foi coletado e acondicionado em frasco de vidro âmbar sendo armazenado a -18 °C para uso posterior.

FIGURA 7 - ILUSTRAÇÃO ESQUEMÁTICA DO APARELHO DE CLEVINGER



FONTE: SINGER, 2005.

### 3.4.1 Análise cromatográfica

A caracterização dos constituintes químicos presentes no óleo essencial das folhas de *O. bicolor* Vattimo-Gil. foi realizada no laboratório do Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná, através de CG/MS sendo empregado um sistema cromatográfico composto de cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massa Shimadzu® CG-EM – QP 2010 Plus equipado com coluna capilar Rtx-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). Injetor em modo splitless a 250 °C, interface e fonte de íons a 300°C. A janela de massas analisada foi entre m/z 40 e m/z 350, utilizando He como gás de arraste. Rampa de injeção para análise com temperatura do injetor em 250° C, pressão da coluna de 20 psi, iniciando-se com temperatura de 50° C por 5 minutos elevando-se para 200°C a uma razão de 5° C/min. Os componentes químicos do óleo foram identificados comparando seus espectros de massa com espectros de referência e também comparando seus índices de Kovat com os descritos na literatura (ADAMS, 2001).

### 3.5 DETERMINAÇÃO DE UMIDADE E CINZAS TOTAIS

A metodologia escolhida para a determinação da umidade está descrita na Farmacopeia Brasileira V (2010). A planta pulverizada (5 g) foi acondicionada em 6 cadinhos previamente dessecados e levados à estufa a 100° C por 1 h. Posteriormente foram acondicionados em dessecador até atingir a temperatura ambiente e pesados até peso constante tendo os valores anotados para a realização dos cálculos. O ensaio foi realizado em sextuplicata.

A porcentagem de perda por dessecação é dada pela equação:

$$(P_u - P_s / P_a) \times 100$$

$P_u$  –Peso do cadinho contendo amostra antes da dessecação

$P_s$  –Peso do cadinho contendo amostra depois da dessecação

$P_a$  –Peso da amostra

O método utilizado para determinação das cinzas totais está presente na Farmacopeia Brasileira V (2010). Esse processo teve como objetivo estabelecer a quantidade de substâncias residuais não voláteis no processo de incineração.

A matéria prima vegetal (5g) foi acondicionada em cadinhos previamente calcinados, arrefecidos e pesados. As amostras foram incineradas em mufla (EDG 3000 10P-S) a 600°C por 30 min. O ensaio foi realizado em sextuplicata.

Após essa etapa foram calculadas as porcentagens de cinzas em relação ao material vegetal seco, utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\% \text{ de cinzas} = \frac{P_2 - P_1}{P_3} \times 100$$

P<sub>1</sub> = Peso do cadinho após a calcinação e esfriamento;

P<sub>2</sub> = Peso do cadinho com amostra após a calcinação e esfriamento em dessecador;

P<sub>3</sub> = Peso da amostra inicial.

### 3.6 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES

#### 3.6.1 Extração por Soxhlet

As amostras de planta seca, estabilizada e moída foram pesadas (1390g) e extraídas em aparelho de Soxhlet modificado por Carvalho (2001), patenteado sob número do registro: PI 0601703-7 A. A um aparelho de Soxhlet foi conectado um condensador, permitindo que o solvente seja continuamente reutilizado no processo, o que o torna econômico em relação a outros métodos de extração. Todo o sistema foi levado ao aquecimento em manta aquecedora e deixado em refluxo por 12 horas, de modo a obter o extrato cetônico que foi denominado extrato bruto, por extração em meio solvatado (CARVALHO, 2001).

Para a utilização deste equipamento foi introduzido no suporte de vidro do aparelho um volume adequado do material vegetal (este contém uma placa porosa e uma camada de algodão para conter o material vegetal), sobre este sistema foi adicionado cerca de 3000 mL de acetona para extração. Com o sistema sob aquecimento, a acetona presente no balão será evaporada e posteriormente condensada no condensador de bolas. Deste modo, o líquido extrator percorre novamente o material vegetal, permitindo a extração.

No momento em que o menisco do extrato no canal lateral do Soxhlet atingir o ponto de refluxo, o extrato será descarregado no balão por sifonamento e o processo repetido 10 vezes. Este procedimento previne a degradação térmica de substâncias no balão, uma vez que a quantidade de líquido extrator será constante no sistema sendo capaz de solvatar os compostos presentes. Terminada a extração, o material foi concentrado em evaporador rotatório até adquirir aspecto de extrato fluido.

### 3.6.2 Determinação do teor de sólidos do extrato bruto

A análise do teor de sólidos foi realizada segundo a Farmacopeia Brasileira V (2010). Foram pipetados volumetricamente em três placas de petri previamente dessecadas, 10 mL do extrato bruto. A placa foi levada a secar total da alíquota de 10 mL em estufa a 105°C até peso constante. Após foram resfriadas em dessecador. A diferença entre o peso da placa com o resíduo do extrato e a placa vazia forneceu o teor de sólidos em 10 mL do extrato. A partir da determinação dos sólidos totais foi calculado o rendimento do extrato bruto, utilizando-se a seguinte equação:

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{teor de sólidos totais} \times 100}{\text{Material seco e estabilizado}}$$

### 3.6.3 Obtenção das Frações

As frações das espécies vegetais foram obtidas através do sistema líquido-líquido, a partir do extrato bruto (EB). Foi utilizado solventes em ordem crescente de polaridade (hexano, clorofórmio, acetato de etila).

Para o sistema de partição líquido-líquido foi utilizado o aparelho Soxhlet modificado (PI 0601703-7) conectado ao condensador de bolas e a um balão de fundo chato com pérolas de vidro. Todo o sistema foi levado ao aquecimento em manta aquecedora e deixado sob refluxo por cerca de 6 horas.

Após reserva de uma alíquota de 5g do extrato bruto cetônico (EB) para a realização dos bioensaios, foi obtida a partir do EB, uma parcela que não foi solúvel em metanol e água, a qual foi denominado de parcela sólida. Deste modo o particionamento foi realizado a partir dessas duas parcelas obtendo-se ao todo oito

frações: fração hexano (FH e FHS), fração clorofórmio (FC e FCS), fração acetato de etila (FAE e FAES) e fração remanescente (FR e FRS), respectivamente da parcela solúvel e parcela sólida. O cálculo do rendimento das frações foi realizado em relação ao extrato bruto seco.

### 3.7 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)

A cromatografia em camada delgada (CCD) é um método considerado rápido, eficiente de baixo custo e fácil reprodutibilidade. Consiste na separação dos componentes de uma mistura através da migração diferencial sobre uma camada delgada de adsorvente retido sobre uma superfície plana. Esta análise tem como objetivo avaliar as características qualitativas dos principais grupos químicos presentes no EB e nas frações, utilizando reações de coloração e fluorescência.

Para a realização do ensaio de CCD foram utilizadas cromatoplasmas de sílica gel 60 UV254, da marca Whatman®, de dimensões 20 por 20 cm, onde foram aplicados de 5 a 10 µL de cada amostra utilizando-se microseringas. A (TABELA 6) apresenta os solventes da fase móvel e os reveladores utilizados neste experimento.

TABELA 6 – COMPOSIÇÃO DAS FASES MÓVEIS E REVELADORES DA CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA REALIZADA PARA EXTRATOS E FRAÇÕES.

<b>Componentes químicos</b>	<b>Fase móvel</b>	<b>Revelador</b>	<b>Metodologia</b>
Esteroides/Triterpenos	Tolueno: acetato de etila (93:7)	Vanilina 1%:ácido sulfúrico(1:1)	WAGNER (1996)
Flavonoides /Taninos	Acetato de etila, ácido fórmico, ácido acético glacial, água (100:11:11:26)	Reativo de NEU (flavonoide) Cloreto férrico (1%) (tanino)	WAGNER (1996)
Alcaloides/Cumarina	Clorofórmio, metanol (95:6) universo amônio	Dragendorff (alcaloides) Hidróxido de sódio 1N (cumarina)	VALENTE et al., (2006).

FONTE: A autora (2016)

NOTA: Reativo de NEU - Difenoilboriloxietilamino a 1% em metanol; Dragendorff - tetraiodeto bismuto de potássio.

As placas foram visualizadas sob luz ultravioleta antes e após a revelação com seus respectivos reveladores. A análise foi realizada em triplicata.

## 3.8 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS CONTITUENTES QUÍMICOS

### 3.8.1 Isolamento

Para isolamento dos constituintes da fração remanescente do sólido (FRS) foi utilizada uma coluna aberta (3,0 x 50 cm) empacotada com a fase estacionária Sephadex<sup>®</sup> LH-20 (Amersham Pharmacia, G&E), e metanol como eluente.

### 3.8.2 Identificação

As substâncias isoladas foram submetidas a análises espectrométricas para determinação da estrutura, para isso foi realizada RMN de <sup>13</sup>C e <sup>1</sup>H, utilizando o aparelho RMN Bruker<sup>®</sup> DPX 200, operando a 4,7 Tesla, observando os núcleos de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C à 200,13 e 50,62 MHz, respectivamente. Esse procedimento foi realizado no departamento de Química (UFPR).

## 3.9 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Para a avaliação das possíveis atividades antioxidantes apresentadas pelo extrato bruto de *O. bicolor* e por suas frações, foram utilizados dois diferentes métodos: a formação do complexo fosfomolibdênio, que permite avaliar a capacidade antioxidante tanto de componentes lipofílicos quanto hidrofílicos e a avaliação da atividade antioxidante pela redução do radical DPPH, que quantifica a capacidade destes reduzirem radicais livres.

### 3.9.1 Formação do Complexo Fosfomolibdênio

Este ensaio tem como princípio a avaliação da oxidação ocorrida no reativo, utilizando como padrões comparativos a rutina e o ácido ascórbico.

O reativo foi preparado através da mistura de uma solução de fosfato de sódio tribásico 0,1 M (28 mL), com uma solução de molibdato de amônio tetraidratado 0,03 M (12 mL), ácido sulfúrico 3 M (20 mL) e água para completar o volume para 100 mL, sendo este preparado no momento do uso. As amostras testadas (extrato/ frações e óleo essencial) e as soluções padrões de ácido

ascórbico e rutina, foram preparadas na concentração de 200 µg/mL em metanol e DMSO 0,5% (PRIETO, PINEDA AGUILAR, 1999).

Em triplicatas, foram adicionados 3 mL de reativo e 0,3 mL da amostra em tubo de ensaio, o mesmo procedimento foi realizado para os padrões e para o branco, que contém apenas metanol.

Os tubos foram fechados e levados ao banho termostatizado à 95°C por 90 min. Após o resfriamento, foram obtidas as absorvâncias em microplacas com fundo redondo de 96 poços em formato de 'U', através da leitura em espectrofotômetro Multiscan FC, Thermo Scientific® no comprimento de onda de 695 nm. A capacidade antioxidante das amostras foi expressa em atividade antioxidante relativa (AAR%), em relação à rutina e ácido ascórbico, usadas como padrão. Os resultados foram calculados da seguinte maneira:

$$\text{AAR\% EM RELAÇÃO À VITAMINA C} = \frac{\text{Abs (amostra)} - \text{Abs (branco)} \times 100}{\text{Abs (vitamina C)} - \text{Abs (branco)}}$$

$$\text{AAR\% EM RELAÇÃO À RUTINA} = \frac{\text{Abs (amostra)} - \text{Abs (branco)} \times 100}{\text{Abs (rutina)} - \text{Abs (branco)}}$$

A variância dos resultados obtidos foi avaliada pelo teste ANOVA e a diferença entre as médias verificada pelo teste (t) de Scott e Knott, sendo que valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

### 3.9.2 Avaliação da Atividade Antioxidante pela Redução do Radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila)

O DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) é um radical livre e estável com o qual compostos vegetais que apresentam potencial atividade antioxidante interagem, permutando os elétrons ou átomos de hidrogênio para o radical livre reduzindo-o. Deste modo sua coloração púrpura decai, e a mudança na absorvância pode ser lida espectrofotometricamente (ALVEZ et al., 2010; MOLYNEUX, 2004).

A técnica foi adaptada de Mensor e colaboradores (2001), Santos e colaboradores (2007) e Nascimento e colaboradores (2011). A solução de DPPH na concentração de 0,03 mM foi preparada minutos antes de sua utilização. A partir de uma solução estoque (1mg/mL) foram preparadas soluções metanólicas das

amostras em concentrações variando de 2 µg/mL a 500 µg/mL, a fim de fornecer faixa de melhor atividade. Os ensaios foram realizados em microplacas com fundo redondo de 96 poços em formato de 'U', onde foram adicionados 71 µL da amostra e 29µL da solução de DPPH· 0,3mM. Após trinta minutos de incubação no escuro procedeu-se as leituras em espectrofotômetro Multiscan FC, Thermo Scientific® a 518 nm, correspondente a absorção máxima do radical em estudo em espectrofotometria. Como padrões foram utilizados rutina e ácido ascórbico; o branco específico da amostra foi determinado usando 71µL da amostra e 29µL de metanol e o controle negativo 71µL de metanol e 29µL de DPPH·. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

A capacidade dos extratos em reduzir o radical foi calculada da seguinte forma, onde na fórmula, (Abs) corresponde ao valor da absorbância:

$$\% \text{ Inibição da oxidação do DPPH}\cdot = 100 - \frac{(\text{Abs}_{\text{amostra}} - \text{Abs}_{\text{branco}})}{\text{Abs}_{\text{controle}}} \times 100$$

A partir das porcentagens de inibição de DPPH·, por regressão linear foi calculado o IC<sub>50</sub>, ou seja, a concentração necessária para exercer 50% da atividade antioxidante. Os resultados de IC<sub>50</sub> foram comparados segundo método estatístico de Tukey (p<0,05).

### 3.10 AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS

#### 3.10.1 Avaliação da toxicidade aguda frente à *Artemia salina*

O ensaio de toxicidade frente à *Artemia salina* Leach (TAS) foi realizado segundo Meyer e colaboradores (1982) com adaptações.

A solução salina foi preparada com 30 g de sal marinho artificial e 1000 mL de água destilada. O pH foi ajustado para 9 com Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> para evitar o risco de morte das larvas por diminuição do pH durante a incubação, uma vez que o desenvolvimento de *Artemia salina* é viabilizado em um pH superior a 6, porém um pH superior a 10,5 deve ser evitado (LEWAN; ANDERSSON; MORALES,1992).

Os ovos de *Artemia salina* (200 mg/400 mL) foram colocados em solução salina para eclodir por 48 h sob aeração contínua e expostos à luz diurna. A

temperatura foi controlada entre 27 e 30°C e o pH entre 8-9. Na primeira hora do processo o recipiente foi mantido sob iluminação (20 W).

O estudo foi realizado com o óleo essencial, extrato bruto e as frações de *O. bicolor* nas concentrações de 10, 100 e 1000 µg/mL. A diluição dos extratos foi realizada com 1% de DMSO (dimetilsulfóxido) em salina para melhor solubilização e garantia da concentração efetiva das amostras. Para diluição do OE foi utilizado 0,5% de tween 80. Além do controle negativo (salina), os náuplios foram avaliados frente ao solvente (DMSO 1% e tween 80 0,5% em salina). Como controle positivo foi utilizado dodecilsulfato de sódio (SDS) nas concentrações de 10, 20, 30, 40 e 50 µg/mL de solução salina (VEIGA; VITAL, 2002). Todo o ensaio foi realizado em triplicata.

Após a eclosão dos ovos, foram transferidos 10 náuplios para cada tubo contendo cerca de 2,5 mL de amostras testes. Os tubos foram incubados em estufa (27-30° C) ao longo de 24 horas, após as quais foi realizada a contagem dos náuplios vivos e mortos, sendo considerados vivos todos aqueles que apresentassem qualquer tipo de movimento quando observados próximos a uma fonte luminosa. Os resultados foram submetidos a tratamento estatístico utilizando o método PROBIT, o qual forneceu os valores de CL<sub>50</sub> (concentração letal para 50% dos indivíduos) com 95% de confiabilidade. Considerou-se amostras ativas as que CL<sub>50</sub> foram menores que 1000 µg/mL, de acordo com Meyer et al. (1982).

### 3.10.2 Avaliação da atividade antibacteriana

A atividade antimicrobiana foi determinada *in vitro* utilizando-se o método da microdiluição em caldo para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM), utilizando-se a metodologia descrita pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* - CLSI (2012) com modificações. Os microrganismos utilizados nos testes foram: *Escherichia coli* (ATC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) e *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028). Os materiais utilizados (vidrarias, pinças) foram esterilizados em autoclave 120°C, por 30 min.

### 3.10.2.1 Método de Microdiluição (Determinação da Concentração Inibitória Mínima).

O método de microdiluição da amostra em meio de cultura líquido utilizou-se microplacas estéreis (com tampa) com fundo redondo de 96 poços em formato de 'U', sendo eficaz na determinação da concentração inibitória mínima (CIM) (ANVISA, 2003). Os extratos e frações foram preparados através de diluição seriada em 100 µL de caldo Mueller-Hinton (MHB – Merck, Darmstadt, Alemanha), em um intervalo de concentração de 1000 µg/mL a 7,81 µg/mL.

As suspensões bacterianas foram preparadas em solução salina fisiológica na concentração de  $1,0 \times 10^8$  UFC/mL, o que corresponde a escala 0,5 de Mac Farland. Foram inoculadas 10 µl da cepa bacteriana permanecendo uma concentração final de  $10^4$  UFC/mL. O controle negativo da atividade inibitória dos diluentes, etanol e DMSO, foram realizados adicionando-se 100 µL de solução de etanol 10% e DMSO 2% em 100 µL de MHB e 10 µL dos inóculos bacterianos. Para o controle de esterilidade, foram utilizados 100 µL de MHB e 100 µL do extrato e fração. O controle positivo ou de viabilidade bacteriana, foi preparado com 100 µL de MHB e 5 µL dos inóculos bacterianos. As microplacas foram fechadas e mantidas em estufa bacteriológica a 35°C por um período de 16 a 20 h.

Após incubação, foi acrescentado 20 µl de solução aquosa de Cloreto de 2,3,5 trifeniltetrazolico (TTC) a 0,5%, e as microplacas reincubadas por 3 h a 35°C. Em seguida foi realizada a leitura dos resultados. Os poços com crescimento bacteriano apresentam coloração vermelha. A concentração inibitória mínima foi considerada a partir do poço que não ficou corado.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO

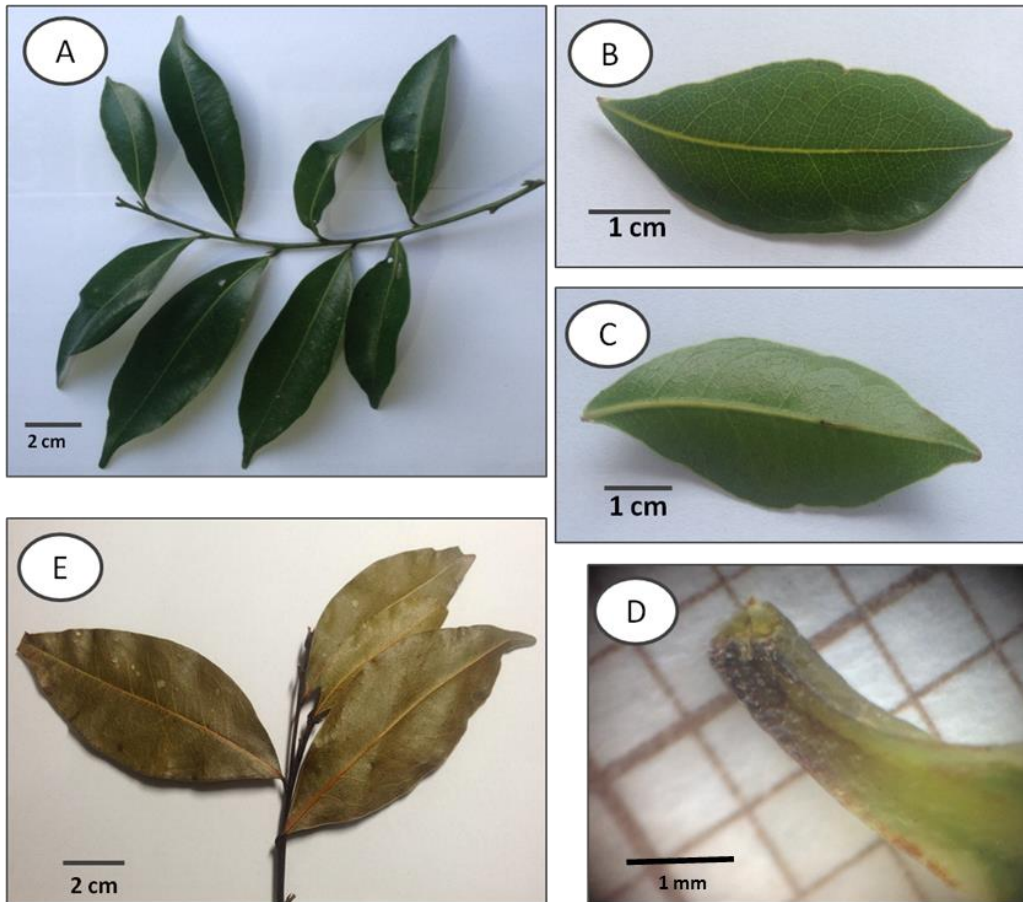
Foram coletadas folhas de *O. bicolor*, as quais, após processo de secagem foram trituradas mecanicamente obtendo-se 1720g de folhas secas.

### 4.2 ESTUDO MORFOANATÔMICO

O exemplar analisado de *O. bicolor* Vattimo-Gil mede aproximadamente 11 metros de comprimento. As folhas são simples, alternas e peninervadas, medindo de 5,5-9,5 cm de comprimento e 2-3 cm de largura; formato elíptico com ápice acuminado e base cuneada (FIGURA 8A). A face adaxial é glabra e lustrosa (FIGURA 8B); e face abaxial glabra com nervura central saliente, e ausência de domáceas (FIGURA 8C). O pecíolo é glabro e subcaniculado, medindo de 0,4-0,9 cm de comprimento (FIGURA 8D). Em material desidratado as folhas apresentam nervura central avermelhada (FIGURA 8E). Todos os caracteres morfológicos verificados são similares aos mencionados por Brotto, Santos e Baitello (2009); Brotto, Cervi e Santos (2013) e Vattimo-Gil (1956) para esta espécie.

Na análise da lâmina foliar, em vista frontal, a epiderme apresenta células com paredes anticlinais poligonais na face adaxial (FIGURA 9A) e levemente sinuosas na face abaxial (FIGURA 9B). Os estômatos são do tipo paracítico (ou rubiáceo), ou seja, apresentam duas células subsidiárias paralelas às células-guarda e estão localizados no mesmo nível das células epidérmicas. Esse tipo de estômato é comum em Lauraceae (METCALFE; CHALK,1972).

Pelo fato dos estômatos estarem restritos a face abaxial da folha, esta é classificada como hipoestomática (FIGURA 9B e FIGURA 9E). A característica hipoestomática das folhas e estômatos do tipo paracíticos também foi observada nas espécies *O. puberula* (FARAGO et al., 2005) e *O. gardneri* (COUTINHO et al., 2006b).

FIGURA 8 – *Ocotea bicolor* Vattimo-Gil – CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS EXTERNAS

FONTE: A autora (2016).

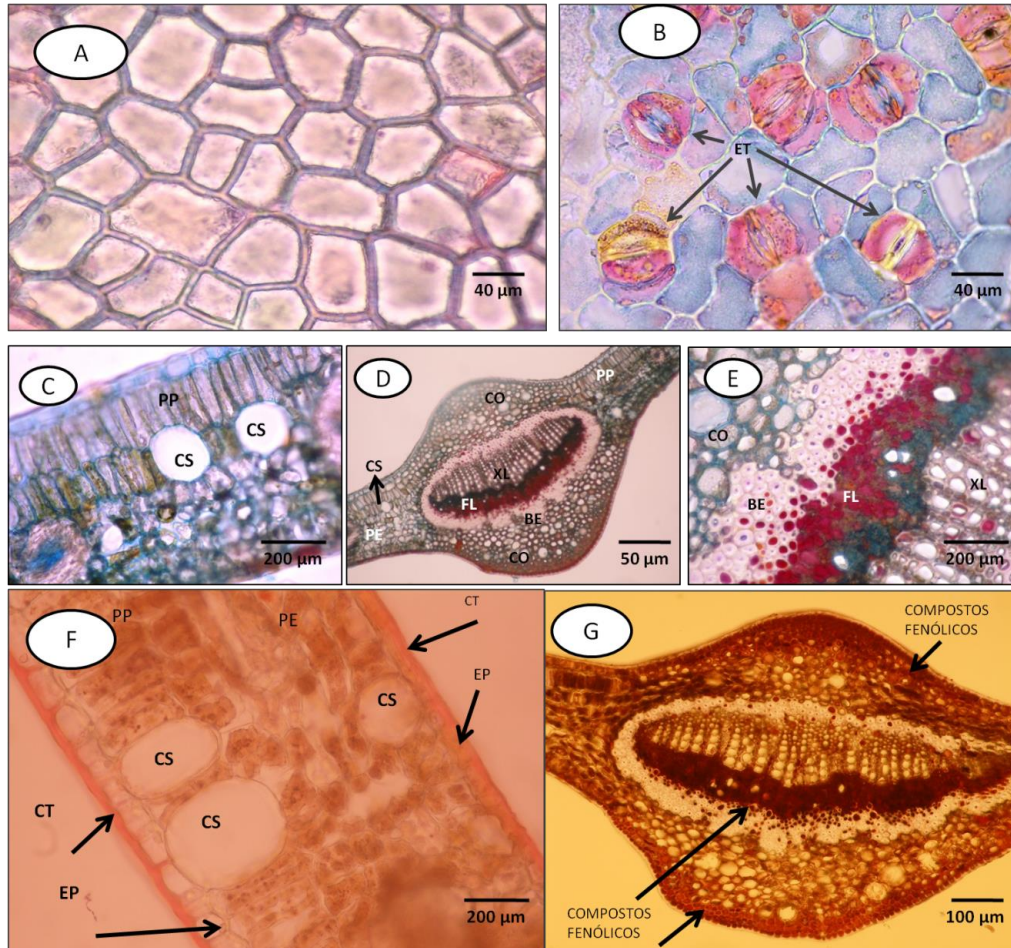
NOTA: **A:** ramo foliar; **B:** face adaxial; **C:** face abaxial; **D:** pecíolo; **E:** ramo foliar desidratado.

Em secção transversal a epiderme é uniestratificada com células isodiamétricas em ambas as faces (FIGURA 9D), revestida por cutícula espessa a qual reagiu positivamente com Sudam III (FIGURA 9F). O mesofilo apresenta organização dorsiventral constituído de aproximadamente duas camadas de células paliçádicas junto à face adaxial e, cerca de seis estratos de parênquima esponjoso na superfície oposta. Essas características vão ao encontro do relatado para as espécies *O. puberula* (FARAGO et al., 2005) e *O. duckei* (COUTINHO et al., 2006a). Segundo Metcalfe e Chalk (1972) o mesofilo do tipo dorsiventral é considerado padrão para Lauraceae. Entretanto, de acordo com Coutinho et al., (2006b) a espécie *O. gardneri* ao contrário do que descreve Metcalf e Chalk (1972) evidenciou mesofilo do tipo isobilateral, não usual a família Lauraceae. Esta característica pode auxiliar na identificação desta espécie vegetal.

Dispersas no mesofilo também são observadas células secretoras de substâncias de natureza mucilagínosa e lipofílica, com formato arredondado a elíptico e feixes vasculares de pequeno porte (FIGURA 9C e 9D). A presença destas

estruturas é amplamente descrita para esta família. Segundo Metcalfe (1987) em pelo menos vinte gêneros da família Lauraceae é relatado a presença de células secretoras de óleos ou de mucilagem.

FIGURA 9 – *Ocotea bicolor* Vattimo-Gil - FOLHA EM CORTE PARADÉRMICO E SECÇÃO TRANSVERSAL



FONTE: A autora (2016).

NOTA (1): **A:** vista frontal da face adaxial da lâmina foliar, destacando o contorno poligonal das células. **B:** corte paradermico face abaxial, presença de estômatos; **C:** secção transversal do mesofilo, evidenciando células secretoras; **D:** secção transversal da lâmina foliar e da nervura principal; **E:** sistema vascular; **F:** secção transversal do mesofilo, destacando cutícula lisa, coloração Sudam III; **G:** nervura principal evidenciando compostos fenólicos, coloração floroglucina clorídrica.

NOTA (2): epiderme (EP), cutícula (CT), parênquima paliçádico (PP), parênquima esponjoso (PE), célula secretora (CS), colênquima (CO), xilema (XI), floema (FL) e bainha esclerenquimática (BE); estômatos (ET).

Considerando a nervura central em secção transversal, observa-se formato biconvexo (FIGURA 9D), característica já encontrada para outras espécies de *Ocotea* como *O. gardneri*, *O. puberula*, *O. duckei* (FARAGO et al., 2005; COUTINHO et al., 2006a; COUTINHO et al., 2006b). O tecido de revestimento apresenta

mesmas características da lâmina foliar, relatadas anteriormente. Subjacente à epiderme observa-se colênquima do tipo angular, onde se encontram dispersas células secretoras. O sistema vascular constitui-se de feixe vascular único e do tipo colateral, ou seja, o xilema encontra-se voltado para a face adaxial, sendo constituído de elementos traqueais enfileirados, separados por raios parenquimáticos (FIGURA 9E). Todo o sistema vascular está circundado por bainha de fibras esclerenquimáticas completa e expressiva (FIGURA 9D), as quais reagiram positivamente com floroglucina clorídrica nos testes histoquímicos e na qual nota-se a presença de compostos fenólicos, sendo mais evidentes no floema (FIGURA 9G).

O pecíolo, seccionado transversalmente, apresenta formato plano-convexo (FIGURA 10A) conforme verificado em *O. gardneri*, *O. puberula*, *O. duckei* (FARAGO et al., 2005; COUTINHO et al., 2006a; COUTINHO et al., 2006b). A epiderme é uniestratificada e a cutícula mostra-se espessa e lisa (FIGURA 10B). Camadas de colênquima do tipo angular são observadas subjacentes à epiderme (FIGURA 10C). No parênquima fundamental formado por células irregulares, destaca-se a presença de células pétreas ou braquiesclereides (FIGURA 10D), em concordância com o descrito por Santos e Oliveira (1995) para outras espécies do mesmo gênero. Uma bainha esclerenquimática envolve o feixe vascular colateral, único e central, disposto em arco aberto (FIGURA 10A e 10D). Assim como na folha, o pecíolo também apresenta células secretoras (FIGURA 10B, 10C e 10D). Nota-se também a presença de compostos fenólicos evidenciados na epiderme, fibras e floema pelos testes histoquímicos utilizando coloração de floroglucina clorídrica (FIGURA 10A, 10B e 10F).

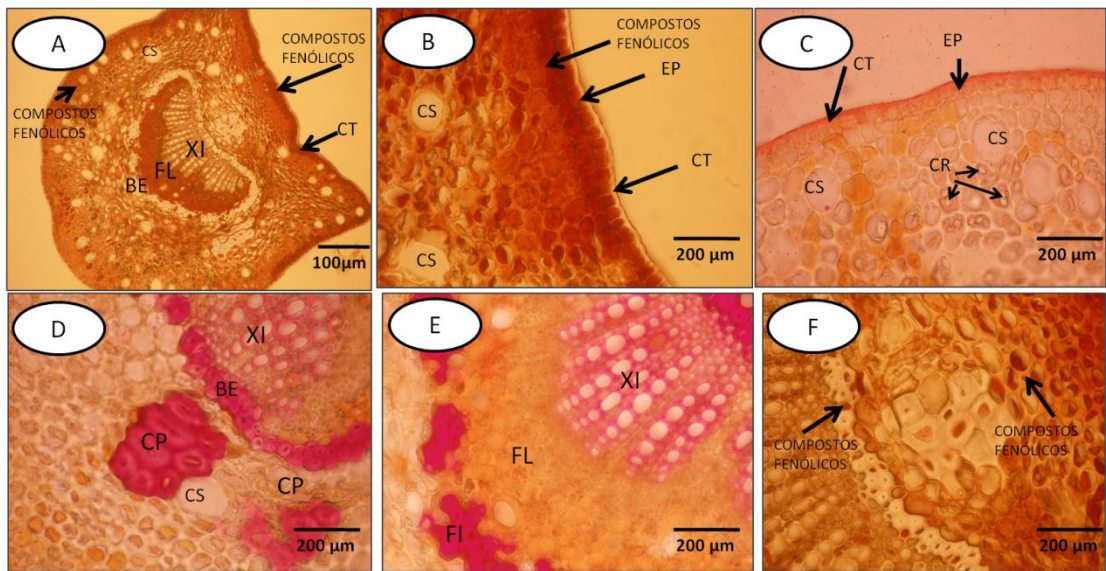
É comum a presença de depósitos cristalinos com diversas formas nas células de muitas espécies vegetais. A grande maioria consiste em sais de cálcio, sendo o oxalato de cálcio o mais comum (CUTTER, 1986). Neste sentido, são observados dispersos no parênquima fundamental, cristais de oxalato de cálcio de diversos formatos (FIGURA 10C).

Em secção transversal o caule apresenta contorno circular (FIGURA 11 A) com epiderme uniestratificada contendo compostos fenólicos os quais reagem com Cloreto férrico e Dicromato de potássio (FIGURA 11B) e revestido por cutícula espessa e lisa evidenciada por Sudam III (FIGURA 11C).

No córtex, as células colenquimáticas são do tipo angular e parênquima cortical multiestratificado com presença de células secretoras e células pétreas

(FIGURA 11F e 11E). Pode-se observar, em amarelo, a presença de célula secretora de óleo essencial (FIGURA 11D). Assim como na folha, nota-se bainha esclerenquimática envolvendo o sistema vascular que reage positivamente a floroglucina clorídrica (FIGURA 11E). Compostos fenólicos evidenciados por Cloreto férrico e Dicromato de potássio podem ser observados na bainha esclerenquimática (FIGURA 11B).

FIGURA 10 - *Ocotea bicolor* Vattimo-Gil – PECÍOLO EM SECÇÃO TRANSVERSAL

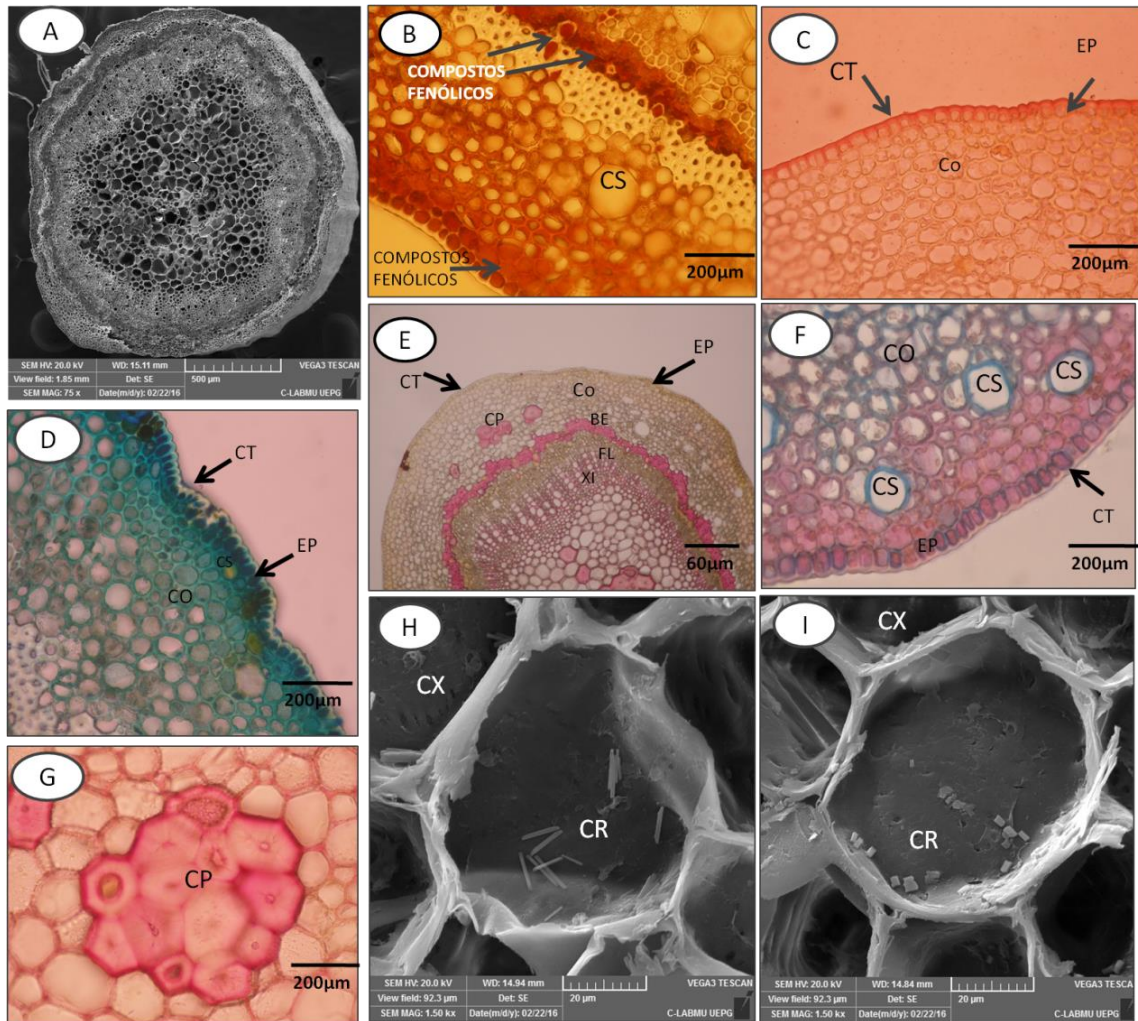


FONTE: A autora (2016).

NOTA (1): **A:** Visão geral da secção transversal do pecíolo destacando compostos fenólicos, coloração floroglucina clorídrica; **B:** Córtex aproximado evidenciando epiderme, cutícula e células secretoras; **C:** Córtex aproximado evidenciando epiderme; **D:** Detalhes para células pétreas e feixe vascular; **E:** detalhes do feixe vascular; **F:** compostos fenólicos evidenciados por coloração floroglucina clorídrica.

NOTA (2): epiderme (EP), cutícula (CT), célula secretora (CS), células pétreas (CP), cristais (CR), xilema (XI), floema (FL), bainha esclerenquimática (BE), fibras (FI).

Dispersas na região medular células pétreas ou braquiesclereides são observadas (FIGURA 11G) essa característica vai ao encontro com o descrito para outras espécies do gênero (SANTOS; OLIVEIRA, 1995). Na região perimedular são encontrados cristais de oxalato de cálcio do tipo ráfide e estilóide (FIGURA 11H e 11I). Essas substâncias desempenham importantes funções na espécie vegetal como proteção contra herbivoria, regulador de cálcio podendo atuar como agente desintoxicante (NAKATA, 2003).

FIGURA 11 - *Ocotea bicolor* Vattimo-Gil – CAULE EM SECÇÃO TRANSVERSAL

FONTE: A autora (2016).

NOTA (1) - **A:** Vista geral do caule em corte transversal em MEV; **B:** Córtex aproximado evidenciando compostos fenólicos - reação com cloreto férrico; **C:** Córtex aproximado evidenciando cutícula, epiderme e colênquima; **D:** detalhes para as células secretoras contendo material oleaginoso amarelo; **E:** Teste com floroglucina; **F:** detalhe do colênquima com células secretoras; **G:** Células pétreas (na medula do caule); **H,I:** corte transversal em MEV, evidenciando cristais de oxalato de cálcio.

NOTA (2) - epiderme (EP), cutícula (CT), célula secretora (CS), células pétreas (CP), córtex (CX), cristais (CR), xilema (XI), floema (FL), bainha esclerenquimática (BE).

Embora de acordo com Fahn (1990) a presença de tricomas simples, unicelulares e pluricelulares, seja comum em Lauraceae, não foi observada a presença de tricomas tectores ou glandulares em nenhuma das estruturas estudadas. Esta característica difere das demais espécies utilizadas como comparativo neste estudo. *O. gardneri*, *O. porosa*, *O. diospyrifolia*, *O. pulchella* e *O. tristis* apresentaram tricomas simples, unicelulares no pecíolo (COUTINHO et al., 2006b; SANTOS; OLIVEIRA, 1995) e tricomas tectores unicelulares foram observados na face abaxial de folhas de *O. puberula* (FARAGO et al., 2005).

### 4.3 CÓDIGO DE BARRA DE DNA

#### 4.3.1 Amplificação e Sequenciamento da Região *matK*

Após extração e purificação do DNA, foi realizada as reações de amplificação para a região *matK* resultando, após purificação em coluna e quantificação, em 75,1ng/μL do produto deste PCR. Após sequenciamento e obtenção de leitura com ótima resolução foi realizado o consenso entre o *forward* e o *reverse* obtendo-se 839 bases (FIGURA 12).

FIGURA 12 - SEQUÊNCIA DA REGIÃO PLASTIDIAL *matK* DE *Ocotea bicolor* Vattimo-Gil

```

AGTCATGTGTCAGATATACTAATACCCCACCCCATCCATCTGGAAATCTTGGTTCAA
CCCTTCACTCTTGGATACAAGATACTCCTTCGTTGCATTTATTGCGATTCTCTCTAC
GAGTATTGGAATTCAAATAGTCTCATTACTCCAAAAAATCCATTTCCCTTTTTTCAAAA
GAGAATCAAAGATTCTTCTTGTTCTCTCTAATTCTCATGTATATGAATGTGAATTCATA
TTCATTTTTCTCCGTAACAACCCTTTCATTTACGATCAAAATCTTTTGGATCCTTTCTT
GAGCGAACACATTTCTATGCAAAAATAGAATATCTTGTAGTAGTGCTTTGTAACGATTT
TCAGAAAACCCTATGGTTGTTCAAAGACCCTTTTATGCATTATGTCAGATATCAAGGAA
AATCGATTCTGGCTTCAAGGGGGGCTCGTCTTCTGATAAAGAAATGGAAATCTCACCT
TGTCAACTTTTGGCAATGTCATTTTTACTTGTGGTCTCAACCGGCCAGGATCCATATAA
AGCAATTATATAATCATCCCTTCTATTTTCTGGGCTATCTTTCAAGTGTACGACTAACT
CTTCGGTGATAAGGAGTCAAATGCTAGAGAATTCGTTTTCGAATAGATACTGCTATTAA
GAAATTCGAGACCGTAGTCCCAATTATCCTCTGATTGGATCATTGGCTAAAGCAAAA
TTTTGTAATGTATCAGGGCATCCATTAGTAAGCCGTTTCGGTCCGATTTGTCAGATTC
TGAGATTCTCAATCGATTTGGGCGGATATGCAGAAATCTTTCTCATTATCACAGTGGAT
CCTCAAAAAACA

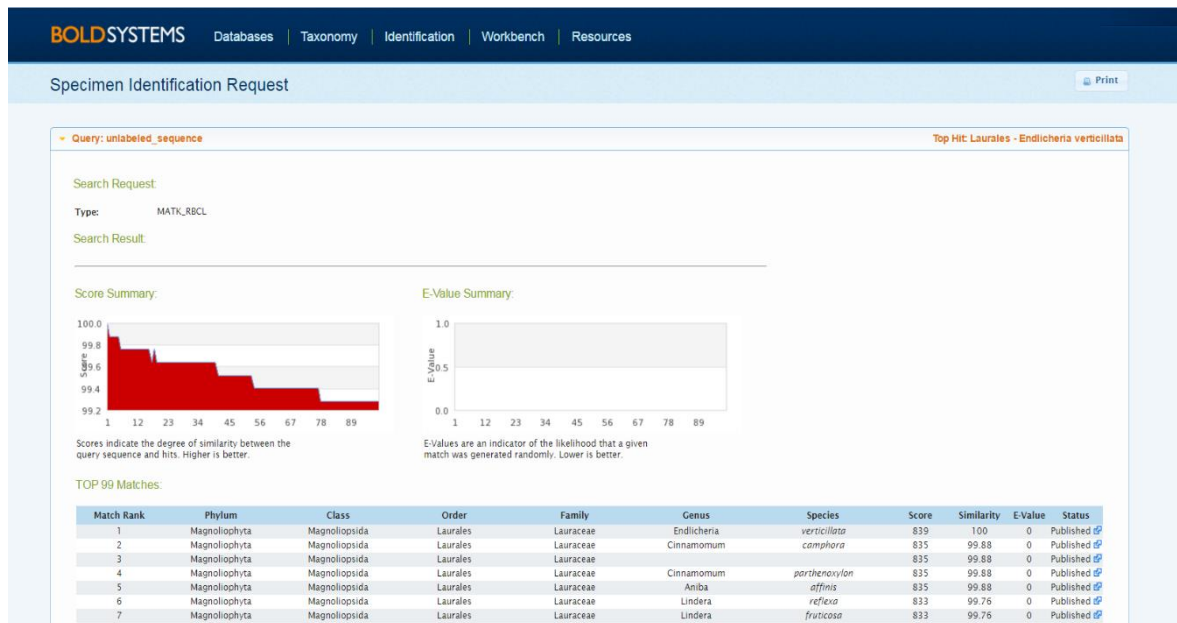
```

FONTE: A autora (2016).

Com essa sequência foram realizadas buscas com as ferramentas do BLAST e o BOLD (FIGURA 13). Em ambas houve similaridade em 100% com *Endlicheria verticillata*, (LAURACEAE) e de 99% para as demais espécies de *Ocotea* e espécies de outros gêneros da família Lauraceae, e um valor-e de 0% em todas as comparações. O fato das 839 bases da região *matK* de *O. bicolor* apresentarem semelhança em 100% às de *Endlicheria verticillata* não significa tratar-se da mesma espécie. Para tanto, conforme preconiza o CBOL *Working Plant Group* (2009) para estabelecer o DNA *barcode* é necessário também realizar a comparação com a região *rbcL*. Infelizmente não há registro disponível de sequenciamento da região *rbcL* para *Endlicheria verticillata*.

Após a confirmação das sequências, foi realizado o depósito no *GenBank*, sob o nº 1957240.

FIGURA 13 – RESULTADO NO BOLD SYSTEMS PARA A SEQUÊNCIA DA REGIÃO PLASTIDIAL *matK* DE *Ocotea bicolor*



FONTE: [http://boldsystems.org/index.php/IDS\\_OpenIdEngine#plantTab](http://boldsystems.org/index.php/IDS_OpenIdEngine#plantTab)

#### 4.3.2 Amplificação e Sequenciamento da Região *rbcl*

Os fragmentos amplificados da região *rbcl* foram purificados em coluna e quantificados, obtendo-se 80,4 ng/μL de produto de PCR, sendo então sequenciados. Uma boa leitura foi obtida a partir da qual foi realizado o consenso entre o *forward* e *reverse*, resultando num total de 696 bases (FIGURA 14). O sequenciamento foi submetido ao BLAST e ao BOLD (FIGURA 15) encontrando em ambos similaridade de 99% e com nenhum *gap* para várias espécies de *Ocotea*.

Após a confirmação das sequências, foi realizado o depósito no *GenBank*, sob o nº 1957240.

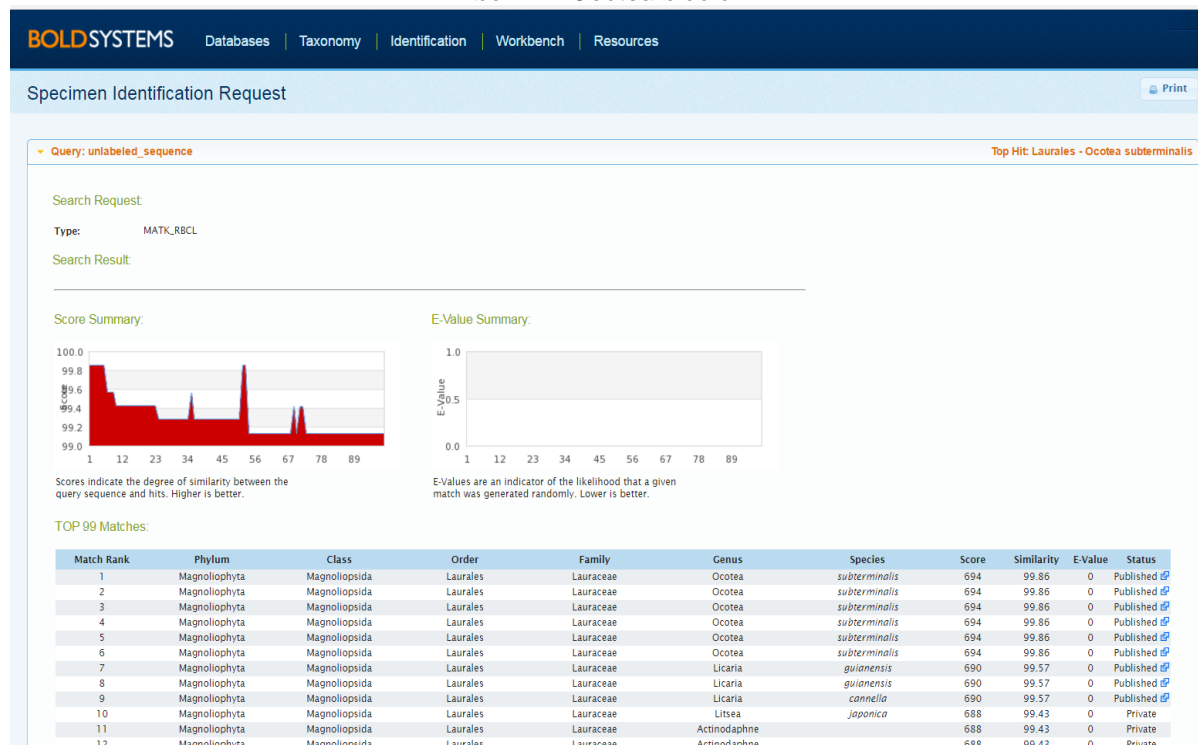
FIGURA 14 - SEQUÊNCIA DA REGIÃO PLASTIDIAL *rbcL* DE *Ocotea bicolor* Vattimo-Gil

```

AAGTGTGGATTCAAAGCTGGTGTAAAGATTACAAATTGACTTATTATACTCCTGACTA
TGAACCAAAGTACTGATATTTTGGCAGCATTTTCGAGTAACTCCTCAACCCGGAGTTC
CACCTGAGGAAGCAGGGGCTGCGGTAGCTGCCGAATCTTCTACTGGTACATGGACAA
CTGTGTGGACCGATGGACTTACCAGCCTTGATCGTTACAAAGGACGATGCTACCAT
CGAGCCCGTTCCTGGGGAGGAAAGTCAATTTATTGCCTATGTAGCTTACCCTTTAGACC
TTTTGAAGAAGTTCTGTTACGAACATGTTTACTTCTATTGTGGGTAATGTATTTGGGT
TCAAAGCTCTACGAGCTCTACGTCTGGAGGATCTGCGAATTCCTCCTGCTTATTCCAAA
ACTTTCTAGCCCCGCCCATGGCATCCAAGTTGAGAGAGATAAATTGAACAAGTATG
GTCGTCCCCTATTGGGATGTACTATTAACCAAATTGGGGTTATCCGCGAAGAAGTAC
GGTAGAGCGGTTTATGAATGTCTCCGTGGTGGACTTGATTTTACCAAGGATGATGAGA
ACGTGAACCTCCAACCATTTATGCGTTGGAGAGACCGTTTCGTATTTTGTGCCGAAGCA
CTTTATAAAGCGCAGGCCGAAACAGGTGAAATCAAAGGACATTACTTGAA

```

FONTE: A autora (2016).

FIGURA 15 – RESULTADO NO BOLD SYSTEMS PARA A SEQUÊNCIA DA REGIÃO PLASTIDIAL *rbcL* DE *Ocotea bicolor*FONTE: [http://boldsystems.org/index.php/IDS\\_OpenIdEngine#plantTab](http://boldsystems.org/index.php/IDS_OpenIdEngine#plantTab)

## 4.4 ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS

### 4.4.1 Rendimento do óleo essencial

Os resultados do rendimento obtidos a partir de 100g de folhas secas e folhas frescas de *O. bicolor* estão sumarizados na (TABELA 7). O rendimento obtido

das folhas secas foi melhor quando comparado as folhas frescas. Sugere-se que, além das folhas frescas possuírem um maior teor de umidade, apresentam a cera epicuticular, o que pode acarretar uma hidrodestilação incompleta do óleo essencial presente nas glândulas (BABU; SINGH, 2009).

TABELA 7 - RENDIMENTO DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS SECAS E FRESCAS DE *Ocotea bicolor* POR HIDRODESTILAÇÃO

Rendimento %	
Folhas secas	Folhas frescas
3,2%	1,9%

FONTE: A autora (2015).

Durante o processo de extração foi possível detectar que a maior quantidade de óleo foi extraída nas três primeiras horas do experimento, tanto para as folhas secas quanto para as folhas frescas, e manteve-se em proporções menores nas horas restantes. O óleo apresentou odor suave e coloração amarelada, conforme pode ser observado na (FIGURA 16).

FIGURA 16 – ÓLEO ESSENCIAL DE *Ocotea bicolor* OBTIDOS ATRAVÉS DE HIDRODESTILAÇÃO.



FONTE: A autora (2016).

O rendimento do OE de *O. bicolor* foi consideravelmente maior quando comparado a espécies do mesmo gênero: *O. odorifera* 1,2% (CANSIAN et al., 2010),

*O. ceanothifolia* 0,11%, *O. leucoxydon* 0,13%, *O. minor* 0,11% (YAMAGUCHI, 2011), *O. nigrescens*, 0,23% e *O. splendens*, 0,35% (ALCÂNTARA, 2009). Fatores ambientais aos quais a espécie vegetal é submetida, como luz, temperatura e umidade, tem demonstrado influenciar significativamente na emissão de compostos voláteis alterando o seu rendimento (DUDAREVA; PICHERSKY; GERSHENZON, 2004).

#### 4.4.2 Análise cromatográfica do óleo essencial

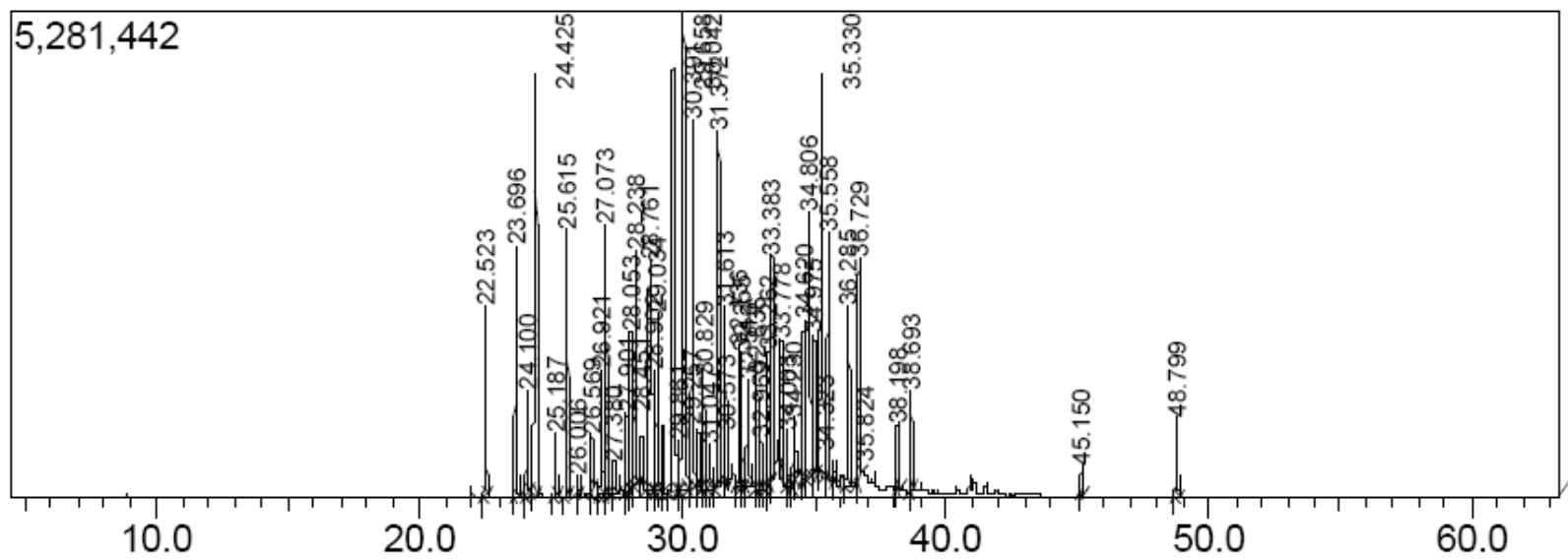
O gráfico do espectro, resultante da análise por cromatografia gasosa acoplada a espectômetro de massas da amostra do óleo essencial das folhas de *O. bicolor* está representado na (FIGURA 17). Os componentes químicos identificados incluindo seus respectivos tempos de retenção, índices de retenção e porcentagens, estão sumarizados na (TABELA 8), sendo que dos 51 componentes detectados 38 foram identificados perfazendo um percentual de 81,88%. O OE revelou-se ser constituído predominantemente por sesquiterpenos (48,21%), seguido de alcoóis, cetonas e aldeídos (31,97%) e em menor proporção os sesquiterpenos aromáticos (0,56%) e diterpenos (1,14%).

As substâncias majoritárias apresentadas foram: os sesquiterpenos  $\delta$ -cadineno (7,39%),  $\beta$ -sesquifelandreno (6,67%) e  $\beta$ -elemeno (5,41%) e o álcool  $\alpha$ -cadinol (5,23%) (FIGURA 18).

O  $\delta$ -cadineno está entre os componentes majoritários de óleos essenciais de outras espécies do gênero *Ocotea*, tais como *O. gomezii* (CHAVERRI; DÍAZ; CICCÍÓ, 2011), *O. morae* (CHAVERRI; DÍAZ; CICCÍÓ, 2011), *O. bracteosa* (COUTINHO et al., 2007), *O. brenesii* (CHAVERRI; CICCÍÓ, 2005), *O. valerianae* e uma nova espécie denominada *Ocotea "small leaf"* (TAKAKU; HABER; SETZER, 2007). Todas as espécies mencionadas apresentaram predominância de sesquiterpenos na composição de seus óleos essenciais.

Na literatura vários compostos identificados no OE da espécie em estudo também são descritos para outras espécies de *Ocotea*, são estes:  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno,  $\beta$ -elemeno,  $\beta$ -cariofileno,  $\alpha$ -humuleno, germacreno D,  $\gamma$ -cadineno, e  $\alpha$ -cadinol (TAKAKU; HABER; SETZER, 2007). Não foi encontrado na literatura nenhuma referência ao sesquiterpeno  $\beta$ -sesquifelandreno para *Ocotea*.

O sesquiterpeno  $\delta$ -cadineno apresenta esqueleto cadinano, proveniente da ciclização do pirofosfato de nerolidina, cujo precursor é o farnesil pirofosfato (FIGURA 19) (RUIZ-REYES; SUAREZ, 2015).

FIGURA 17 - CROMATOGRAFIA GASOSA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Ocotea bicolor*.

FONTE: A autora (2016)

TABELA 8 – COMPOSTOS QUÍMICOS PRESENTES NO ÓLEO ESSENCIAL DE *Ocotea bicolor* DETERMINADOS POR CROMATOGRAFIA GASOSA

Compostos	TR	IRc	IRt	(continua) (%)
<i>Sesquiterpenos</i>				
$\alpha$ -cubebeno	22.523	1354	1345	1.78
$\alpha$ -Ylangeno	23.696	1381	1373	2.48
$\beta$ -bourboneno	24.100	1390	1387	0.92
$\beta$ -elemeno	24.425	1397	1389	5.41
E-cariofileno	25.615	1426	1417	2.86
$\beta$ -copaeno	26.006	1435	1430	0.16
Trans-muurola-3,5-dieno	26.921	1457	1451	1.24
$\alpha$ -humuleno	27.073	1460	1454	2.90
Allo-aromadendreno	27.380	1468	1458	0.53
Dauca-5,8-dieno	27.901	1480	1471	0.78
D-germacreno	28.053	1484	1484	2.21
$\alpha$ -cubeneno	28.238	1488	1478	2.48
Biciclogermacreno	28.902	1504	1500	1.09
$\alpha$ -muroleno	29.034	1507	1500	1.92
E-E- $\alpha$ -farneseno	29.257	1513	1505	0.66
$\beta$ -sesquifelandreno	29.657	1523	1521	6.67
$\delta$ -cadineno	30.042	1532	1522	7.39
$\gamma$ -cupreneno	30.391	1541	1532	4.87
$\alpha$ -cadineno	30.573	1545	1537	0.51
$\alpha$ -calacoreno	30.829	1552	1544	1.35
<i>Álcoois, cetonas e aldeídos</i>				
Espatuleno	31.613	1571	1577	1.90

TABELA 8 – COMPOSTOS QUÍMICOS PRESENTES NO ÓLEO ESSENCIAL DE *Ocotea bicolor* DETERMINADOS POR CROMATOGRAFIA GASOSA

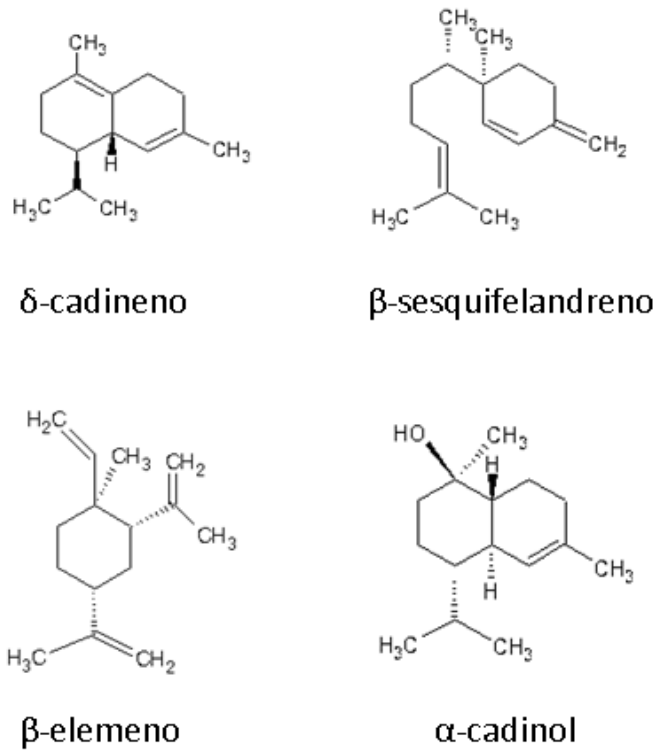
Compostos	TR	IRc	IRt	(continuação)
				(%)
Viridiflorol	32.136	1584	1592	1.53
Thujopsan-2- $\alpha$ -ol	32.513	1593	1586	1.28
Globulol	32.836	1602	1590	1.26
Epi-cedrol	33.383	1616	1618	2.48
Isolongifolan-7- $\alpha$ -ol	33.778	1626	1618	1.32
$\alpha$ -Corocaleno	34.003	1632	1622	0.56
Cis-cadin-4-en-7-ol	34.230	1638	1635	0.65
Z-Metil-jasmonato	34.620	1648	1648	2.66
Epi- $\alpha$ -muurolol	34.806	1653	1640	4.50
$\alpha$ -muurolol	34.975	1657	1644	1.81
$\alpha$ -cadinol	35.330	1667	1652	5.23
Epi- $\beta$ -Bisabolol	35.558	1673	1670	3.39
Trans-Calameneno-10-ol	35.824	1679	1668	0.18
Z- $\gamma$ -Atlantone	36.729	1703	1694	2.56
Eremofilone	38.198	1743	1734	0.66
<i>Sesquiterpeno aromático</i>				
$\alpha$ -Corocaleno	34.003	1632	1622	0.56
<i>Diterpenos</i>				
Ent-rosa-5,15-dieno	45.150	1939	1933	0.27
Kaureno	48.799	2043	2042	0.87
<i>Total (identificados)</i>				81.88
<i>Não identificados</i>				
	25.187	1415	--	0.56

TABELA 8 – COMPOSTOS QUÍMICOS PRESENTES NO ÓLEO ESSENCIAL DE *Ocotea bicolor* DETERMINADOS POR CROMATOGRAFIA GASOSA

Compostos	TR	IRc	IRt	(conclusão)
				(%)
	26.569	1448	--	0.50
	28.451	1493	--	0.36
	28.761	1500	--	4.73
	29.861	1528	--	0.56
	31.047	1557	--	0.49
	31.372	1565	--	4.23
	32.255	1587	--	1.44
	32.969	1605	--	0.53
	33.262	1613	--	1.79
	34.323	1640	--	0.22
	36.285	1692	--	2.20
	38.693	1757	--	1.09
<i>Total (não identificados)</i>				18,7

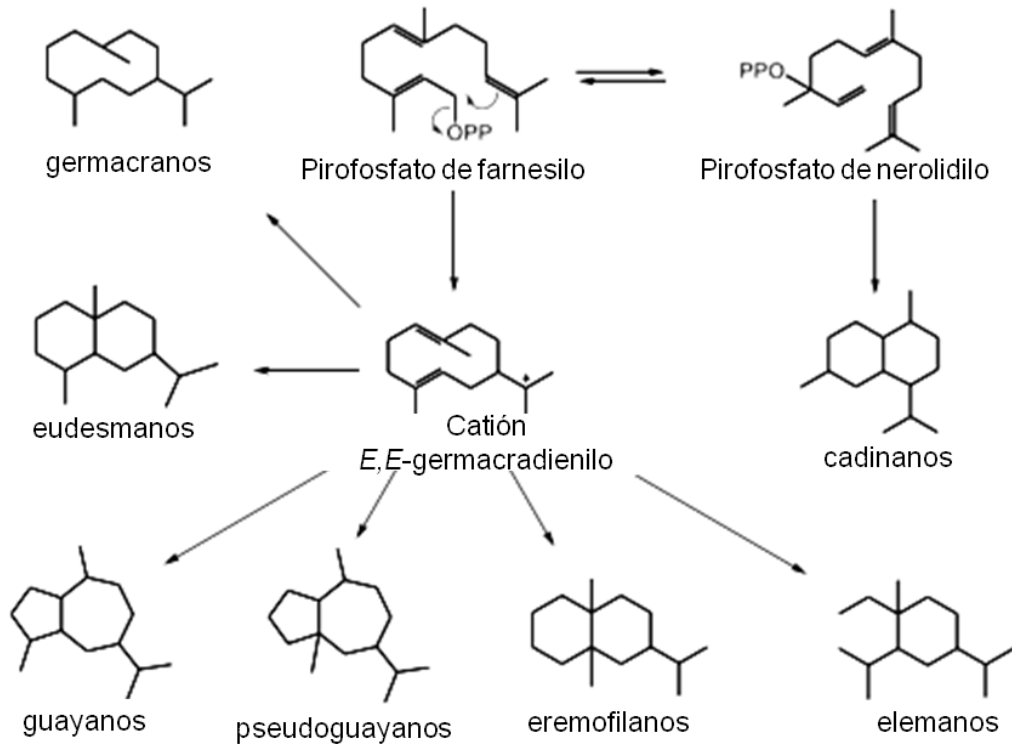
FONTE: A autora (2016).

NOTA: TR= tempo de retenção (minutos), IRt = índice de retenção (Adams, 2007), IRc = índice de retenção calculado, %= porcentagem do componente.

FIGURA 18 – COMPONENTES MAJORITÁRIOS DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Ocotea bicolor*

FONTE: A autora (2016).

FIGURA 19 – BIOSÍNTESE DE ESQUELETO CADINANO



FONTE: RUIZ-REYES; SUAREZ, 2015.

Dentre as atividades reportadas na literatura para o  $\delta$ -cadineno está a atividade antitumoral (WRIGHT et al., 2007), atividade antimicrobiana (SKALTSAA et al., 2003) e anti-cariogênica (MUROI; KUBO, 1993). Estudos têm demonstrado que o  $\beta$ -elemeno, uma das substâncias majoritárias possui atividades antitumorais, incluindo em glioblastoma (YAO et al., 2008) e câncer de pulmão (ZHAO et al., 2007). O  $\alpha$ -cadinol, composto com maior predominância no grupo dos alcoóis presente no OE, apresenta atividade bactericida frente a células vegetativas, agindo como agentes desnaturantes de proteínas, solventes ou agentes desidratantes (DORMAN; DEANS, 2000).

#### 4.5 UMIDADE E CINZAS TOTAIS

Os resultados obtidos nas determinações de umidade e cinzas totais do material vegetal de *O. bicolor* estão demonstrados na (TABELA 9), cujos resultados estão expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

TABELA 9 – UMIDADE E CINZAS TOTAIS DO MATERIAL VEGETAL

Análise	Material vegetal
Umidade (%)	10,62 $\pm$ 0,18
Cinzas (%)	3,68 $\pm$ 0,09

FONTE: A autora (2016).

Parâmetros físico-químicos como teor de umidade e cinzas exercem papel importante no controle de qualidade de drogas vegetais, permitindo a verificação de falsificações e adulterações (FARIAS, 2010). Cada espécie vegetal apresenta parâmetros exclusivos destas análises, que pela primeira vez foram determinados para a espécie em estudo. Para garantir reprodutibilidade e estabelecimento de padrões de intervalos aceitáveis para esta espécie, fazem-se necessárias diversas repetições destes ensaios.

O teor de umidade detectado para a espécie vegetal *O. bicolor*, encontra-se dentro dos limites (8 a 14%) estabelecidos pela Farmacopeia Brasileira V (2010). Portanto, com um resultado inferior ao limite máximo de 14% infere-se que houve eficiência durante o processo de secagem do material botânico e que o mesmo é estável, pois a presença de quantidade excessiva de água em drogas vegetais gera

deterioração dos constituintes da droga, tanto por contaminação microbiana, quanto por hidrólise e atividade enzimática (OLIVEIRA; AKISUE; AKISUE, 1991).

O teor de cinzas totais obtidas por incineração representa o material inorgânico integrante da espécie, somadas as substâncias aderentes de origem terrosa, que correspondem respectivamente às cinzas intrínsecas e cinzas extrínsecas (SIMÕES et al., 2007). É utilizado na determinação de substâncias inorgânicas não voláteis que podem estar presentes como constituintes ou contaminantes na droga vegetal (COUTO et al., 2009).

Na análise realizada com *O. bicolor* o teor de cinzas foi 3,68%. Embora não existam teores máximos para cinzas totais estabelecidos oficialmente para a espécie em estudo, a espécie em questão mostrou-se abaixo do estabelecido na Farmacopeia Brasileira I (1926) para *O. odorifera* (7%).

#### 4.6 RENDIMENTO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DE *Ocotea bicolor*

O rendimento do extrato bruto foi realizado a partir do valor obtido no teor de sólidos, cujo resultado em g/mL foi de  $0,405 \pm 0,008$ . Portanto, considerando-se que para a obtenção de 10mL (alíquota utilizada na determinação dos sólidos totais) foram necessários 2,53g de planta seca o rendimento do extrato bruto foi de 16%.

TABELA 10 – RENDIMENTO DAS FRAÇÕES OBTIDAS A PARTIR DO EXTRATO BRUTO

Amostra	Massa obtida (g)	Rendimento (%)
FH	1,6	0,71
FC	0,2	0,09
FAE	16	7,15
FR	15,5	6,93
FHS	100,9	45,12
FCS	127,0	56,80
FAES	10,9	4,87
FRS	86,9	38,86

FONTE: A autora (2016).

NOTA: fração hexano (FH), fração clorofórmio (FC), fração acetato de etila (FAE), fração remanescente (FR), fração hexano do sólido (FHS), fração clorofórmio do sólido (FCS), fração acetato de etila do sólido (FAES), fração remanescente do sólido (FRS).

Foi obtido 223,6g de extrato bruto cetônico das folhas de *O. bicolor*, do qual 5g foi retirada para a realização dos ensaios biológicos, e o restante utilizado para

obtenção das frações cujos rendimentos estão demonstrados na (TABELA 10). O cálculo do rendimento das frações foi realizado em relação ao extrato bruto total.

#### 4.7 ANÁLISE DOS COMPOSTOS POR CCD

Os resultados obtidos através da CCD evidenciam os grupos de metabólitos secundários presentes na espécie vegetal em estudo, os quais encontram-se sumarizados na (TABELA 11), norteando a posterior identificação e isolamento de compostos puros.

TABELA 11 – CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DAS FRAÇÕES DE *Ocotea bicolor*

Grupo de compostos	Esteroides	Triterpenos	Flavonoides	Taninos	Alcaloides	Cumarinas
<b>Amostras</b>						
FH	+	+	-	-	-	-
FC	+	+	-	-	-	-
FAE	-	-	+	-	-	+
FR	-	-	-	-	-	-
FHS	+	+	-	-	-	-
FCS	+	+	-	-	+	-
FAES	-	-	+	-	-	+
FRS	-	-	+	-	-	-

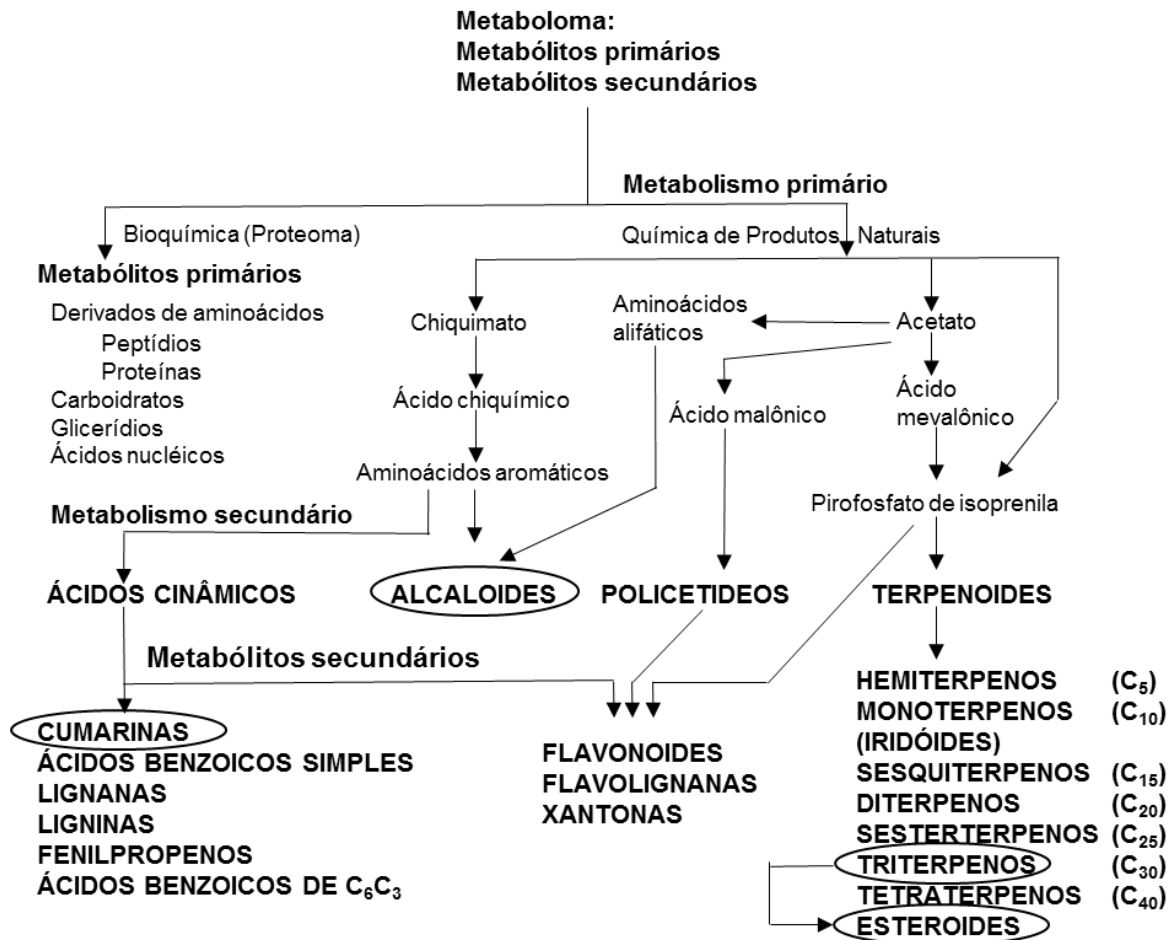
FONTE: A autora (2016).

NOTA: fração hexano (FH), fração clorofórmio (FC), fração acetato de etila (FAE), fração remanescente (FR), fração hexano do sólido (FHS), fração clorofórmio do sólido (FCS), fração acetato de etila do sólido (FAES), fração remanescente do sólido (FRS).

Como pode ser observado, os grupos de componentes químicos identificados, destacados na (FIGURA 20), estão inseridos em uma rota biossintética, sendo derivados dos intermediários: acetil coenzima A (acetil-CoA), ácido chiquímico e ácido mevalônico. Os terpenos são sintetizados a partir do ácido mevalônico (no citoplasma) ou do piruvato e 3-fosfoglicerato (no cloroplasto). Os compostos fenólicos (flavonoides, taninos e ligninas) são derivados do ácido

chiquímico ou ácido mevalônico. As cumarinas também têm como precursor o ácido chiquímico. Por fim, os alcaloides são derivados de aminoácidos aromáticos (triptofano, tirosina), os quais são derivados do ácido chiquímico, e também de aminoácidos alifáticos (ornitina, lisina) (PERES, 2004; LEITE, 2008).

FIGURA 20 – CICLO BISSINTÉTICO DE METABÓLITOS PRIMÁRIOS E SECUNDÁRIOS.



FONTE: Adaptado de BRAZ FILHO (2010).

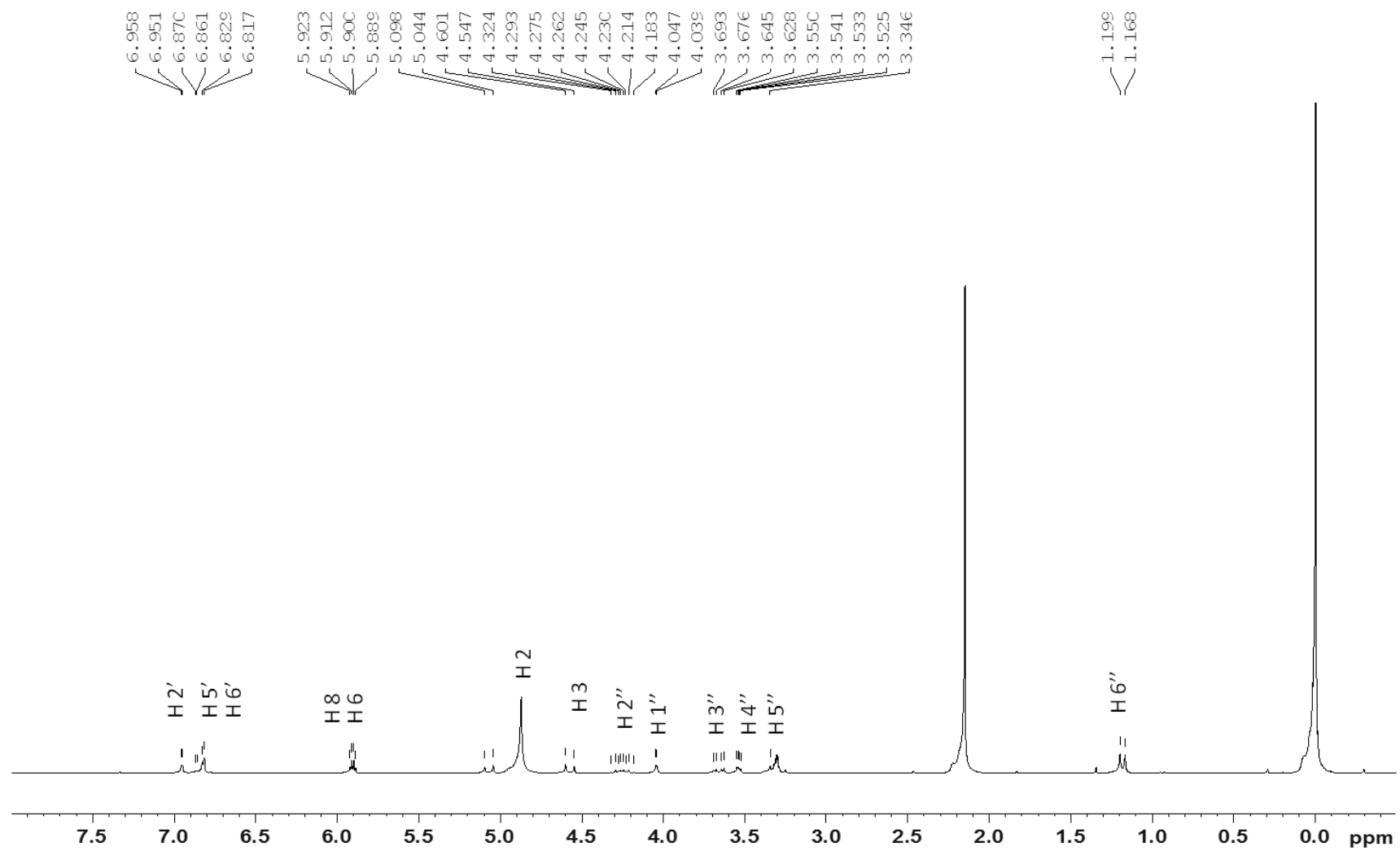
Os resultados obtidos coincidem com os relatos da literatura para a família e o gênero em estudo, pela presença de triterpenos, alcaloides e flavonoides. Triterpenos e flavonoides foram identificados em estudo conduzido por De Luca (2005) para algumas espécies de Lauraceae. Batista et al. (2010) relataram a presença flavonoides derivados de quercetina, diidroquercetina e agliconas para *O. elegans* e *O. corymbosa* (BATISTA et al., 2010). Os alcaloides aporfínicos constituem uma classe notável no gênero *Ocotea* (ZANIN; LORDELLO, 2007). Os alcaloides aporfínicos isodomeesticina, dicentrina, leucoxina e boldina foram

identificados em estudo biomonitorado de *O. puberula* (ZANIN et al., 2011). Em outro estudo conduzido por Dias et al. (2003) com *O. duckei*, três alcaloides benzilisoquinoleínicos, reticulina, coclaurina e N-acetilnorjuzifina foram isolados da casca do caule e um alcaloide do tipo aporfínico, a laureliptina foi isolado do cálice.

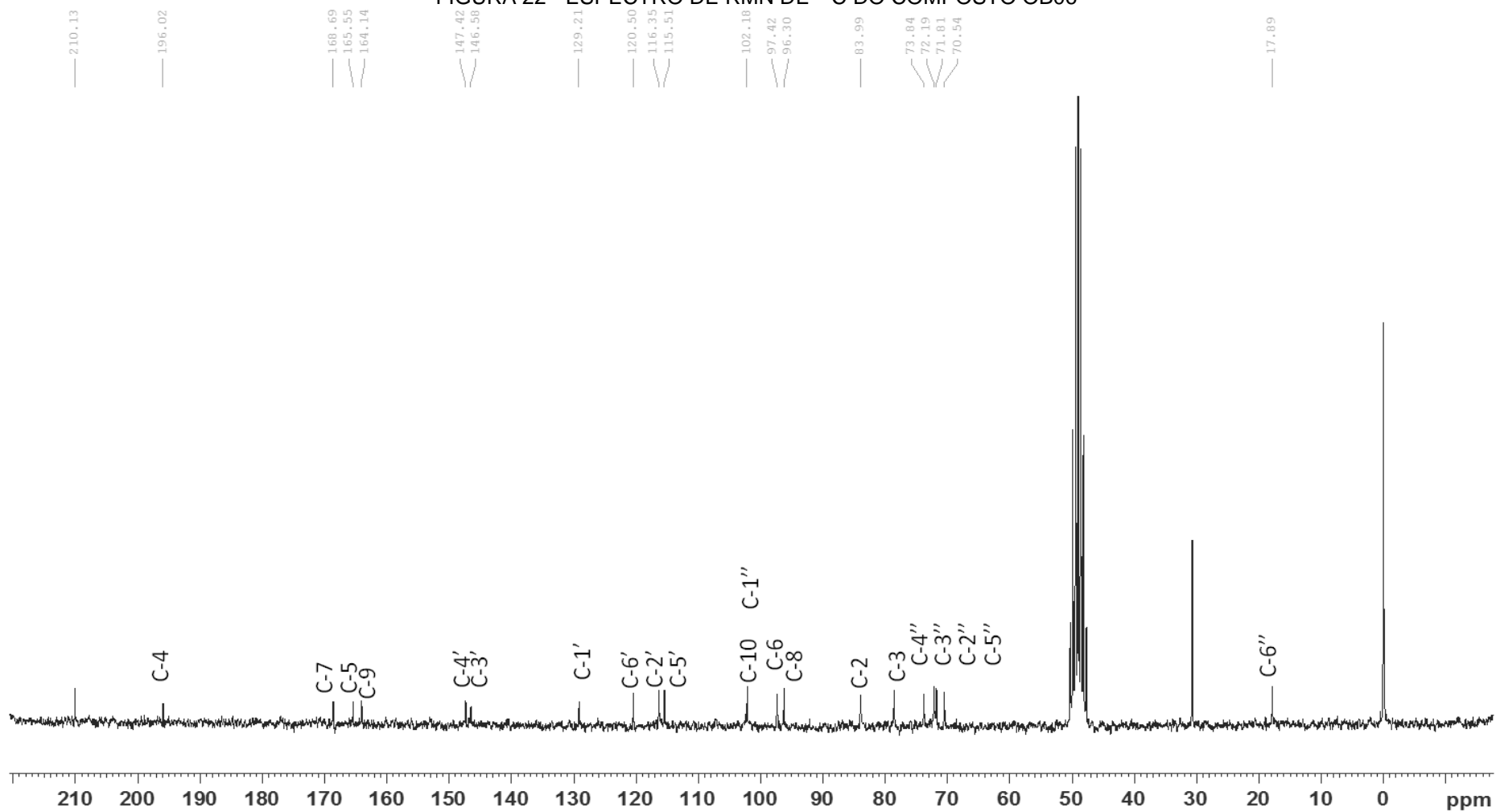
#### 4.8 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS CONTITUENTES QUÍMICOS

A partir do resultado obtido na atividade antioxidante e o alto rendimento da fração remanescente do sólido (FRS) procedeu-se a tentativa de isolamento para identificação de metabólitos secundários presentes na mesma. Foi realizada a solubilização de 5g da FRS em 100 mL de metanol, e ocorreu a precipitação de uma mistura de compostos em forma de cristais solúveis em metanol. A partir desse precipitado foi realizada a coluna de filtração em gel de Sephadex<sup>®</sup> LH20, utilizando metanol como eluente, resultando em 20 frascos de 10 mL de capacidade. Os frascos 05, 06 e 07 apresentaram precipitado de coloração amarelo ocre em formato de ráfides nas suas paredes. Uma alíquota de 5 mg da amostra do tubo 06 denominada OB06 foi encaminhada para análise por ressonância magnética nuclear, para identificação do composto, utilizando-se frequência de 200,13 para o espectro de RMN de <sup>1</sup>H (FIGURA 21) e para o espectro de RMN de <sup>13</sup>C a frequência de 50,62 MHz (FIGURA 22) e DEPT (FIGURA 23).

A amostra apresenta-se como uma mistura sendo a identificação do composto majoritário realizada por comparação com dados da literatura de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C (TABELA 12), do composto denominado astilbina (3-O- $\alpha$ -ramnosídeo de taxifolina ou diidroquercetina-3-O- $\alpha$ -ramnosídeo), um flavonoide glicosilado da classe das flavanonas. A (FIGURA 24) demonstra a estrutura da astilbina e a numeração dos átomos adotada na discussão dos espectros de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C.

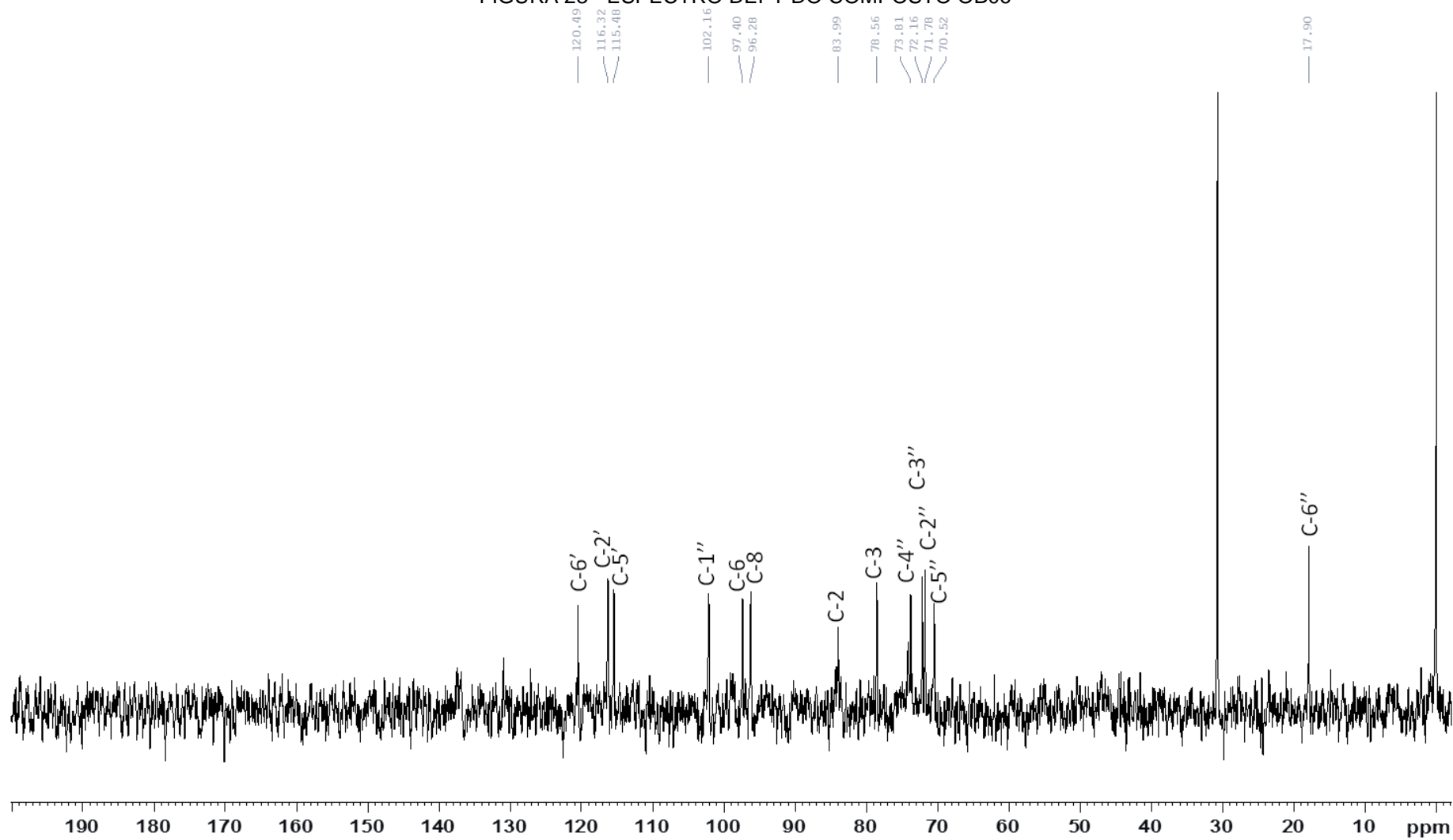
FIGURA 21 - ESPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$  DO COMPOSTO OB06

FONTES: A autora (2016).

FIGURA 22 - ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  DO COMPOSTO OB06

FONTE: A autora (2016).

FIGURA 23 - ESPECTRO DEPT DO COMPOSTO OB06



FONTE: A autora (2016).

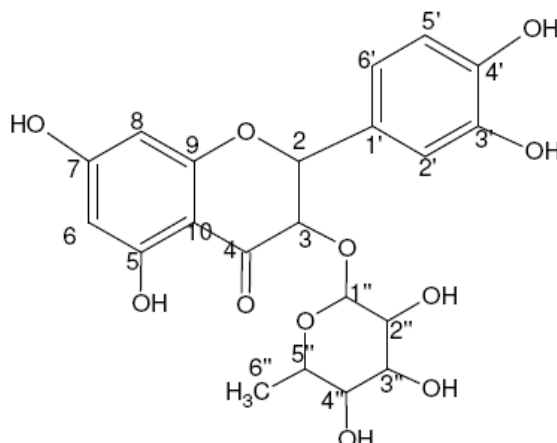
TABELA 12 - DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  E  $^1\text{H}$  DO COMPOSTO OB06 EM COMPARAÇÃO COM DADOS DA LITERATURA PARA ASTILBINA

Posição	RMN de $^{13}\text{C}$ experimental	RMN de $^{13}\text{C}$ da literatura*	RMN de $^1\text{H}$ experimental	RMN de $^1\text{H}$ da literatura*
2	83,9	83,9	5,07d (10,8)	5,08d (10,8)
3	78,6	78,5	4,57d (10,7)	4,58d (10,4)
4	196,0	196,0		
5	165,5	165,5		
6	97,4	97,3	5,89d (2,1)	5,89d (2,0)
7	168,7	168,6		
8	96,3	96,2	5,92d (2,1)	5,91d (2,0)
9	164,1	164,1		
10	102,5	102,4		
1'	129,2	129,1		
2'	116,3	116,3	6,95d (1,4)	6,95d (1,6)
3'	146,6	146,5		
4'	147,4	147,3		
5'	115,5	115,4	6,85m	6,85m
6'	120,5	120,4	6,85m	6,85m
1''	102,2	102,1	4,04d (1,5)	4,04d (1,6)
2''	71,8	71,7	4,25m	4,28m
3''	72,2	72,1	3,66dd (9,5; 3,3)	3,67dd (9,6; 3,2)
4''	73,8	73,7	3,54dd (3,2; 1,7)	3,53dd (3,2; 1,6)
5''	70,6	70,5	3,34sl	3,32sl
6''	17,9	17,8	1,18d (6,2)	1,18d (6,0)

FONTE: A autora (2016).

\* HUANG *et al.* (2011). CD3OD. Valores são dados em ppm relativos ao sinal doTMS como padrão interno. Números em parêntese demonstram constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz). Sinais: sl=simpleto, d=dubleto, dd=duplo dubleto, m=multiplato

FIGURA 24 – ESTRUTURA QUÍMICA DA ASTILBINA



FONTE: A autora (2017)

A presença do H-6'' (dubleto) na região de  $\delta$ H 1,18 ppm ( $J = 6,2$  Hz,  $d$ ) é atribuído ao sinal de hidrogênio pertencente a metila. Além disso os dubletos presentes em  $\delta$ H-2 5,07 ppm ( $J = 10,8$  Hz,  $d$ ) e  $\delta$ H-3 4,57 ppm ( $J = 10,7$  Hz,  $d$ ) são referentes a uma ligação trans que é comprovada pela constante de acoplamento. Além disso, a presença do anel B é caracterizada pelos hidrogênios  $\delta$ H-2' 6,95 ppm ( $J = 1,4$  Hz,  $d$ ),  $\delta$ H-5' 6,85 ppm ( $J = m$ ) e  $\delta$ H-6' 6,85 ppm ( $J = m$ ), comprovando assim a presença de OH nas posições 3' e 4' para formar o padrão de substituição 1,3,4 – tri-substituído para esse anel.

Ao analisar o espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (FIGURA 21) percebe-se a presença do sinal da carbonila em C-4 em  $\delta$ C 196,0 que juntamente com os sinais  $\delta$ C 83,9 e 78,6 atribuídos aos C-2 e C-3 respectivamente, indicam que a substância possui a estrutura de um diidroflavonol. Os sinais em  $\delta$ C 168,7; 165,5; 164,1; 147,4 e 146,6 provenientes de carbono  $\text{sp}^2$  oxigenados foram atribuídos respectivamente aos C-7, C-5; C-9; C-4'e C-3'. A presença do sinal em  $\delta$ C 17,9 atribuído ao carbono metílico C-6'', e o conjunto de sinais na região de  $\delta$ C 71,8 (C-2''), 72,2 (C-3''), 73,8 (C-4'') e 70,6 (C-5''), além de um sinal em  $\delta$ C 102,1 característico do carbono anomérico em C-1'', permite caracterizar que a unidade monosídica trata-se de uma ramnose (REGASINI *et al.*, 2008). A comprovação da posição do açúcar ramnose pode ser baseada na comparação com deslocamentos químicos no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da parte aglicônica de diidroflavonóis, que neste caso é a taxifolina. Os valores de C-2,

C-3 e C-4, para a taxifolina em CD<sub>3</sub>OD segundo Regasini e colaboradores (2008) é de  $\delta C$  73,6, 85,0 e 198,3 respectivamente, e quando comparados aos dados da OB06 para esses carbonos conforme expressos na (TABELA 12) percebe-se deslocamento superior a 5 ppm entre a taxifolina e a substância em estudo em relação ao C-3.

Pela análise dos espectros de RMN <sup>13</sup>C e DEPT pode-se observar sinais de carbonos ligados a hidrogênio  $\delta C$  17,9 (CH<sub>3</sub>), 70,6 (CH), 71,8 (CH), 72,2 (CH), 73,8 (CH), 78,6 (CH), 83,9 (CH), 96,3 (CH), 97,4 (CH), 102,5 (CH), 115,5 (CH), 116,3 (CH) e 120,5 (CH).

A detecção da astilbina em várias espécies vegetais já está bem documentada na literatura, sendo este o primeiro relato da presença desse diidroflavonol em *O. bicolor*. No gênero *Ocotea* foi identificado esse composto em *O. elegans* e *O. corymbosa* (BATISTA et al, 2010) e a aglicona desse flavonoide a taxifolina foi detectada em *O. minarum* (GARCEZ et al., 2005).

Um grande número de flavonoides de origem natural apresenta-se conjugado com açúcares, conhecido por glicosídeos. Essa conjugação pode ser formada pela ligação de um ou mais açúcares aos grupos hidroxilas por ligação hemiacetal facilmente destruída por hidrólise ácida, ou pela conjugação de açúcares ao núcleo flavônico por meio de ligação açúcar genina entre carbonos C-1 (anomérico) do açúcar e um ou dois carbonos do anel A do flavonoide (C-glicosídeo). Quando o metabólito encontra-se sem o açúcar, é chamado de aglicona ou genina (ZUANAZZI, 2001).

Os diidroflavonóis são biossintetizados a partir das via dos fenilpropanoides e possuem como característica comum uma ligação simples entre os carbonos 2 e 3 da estrutura fundamental dos flavonoides, e conseqüentemente, apresentam centro de assimetria em suas moléculas (ZUANAZZI, 2001).

Várias atividades atestam o potencial farmacológico da astilbina. A (TABELA 13) apresenta algumas dessas atividades e os principais mecanismos envolvidos.

TABELA 13 - ATIVIDADES BIOLÓGICAS / FARMACOLÓGICAS DA ASTILBINA

Atividades	Mecanismos	Referências
Anti-inflamatória	Proteção da função miocárdica de isquemia e reperfusão pela redução dos níveis séricos de fatores pró-inflamatórios e redução da proteína HMGB1 ( <i>High mobility group box 1</i> ) e NFkB (fator nuclear Kappa B) fosforilado no tecido do miocárdio de ratos diabéticos	DIAO et al., 2014
Anti-hipertensiva	Inibição da enzima conversora de angiotensina	LUCAS-FILHO et al., 2010
Imunossupressora	Inibição da proliferação e ativação de células T e da morfologia e maturação funcional de células dendríticas	ZOU et al., 2010
Antioxidante	Inibição das enzimas mieloperoxidase (MPO) e peroxidase <i>horseradish</i> (HRP)	PETACCI et al., 2010
Anti-inflamatória	Inibição da formação de produtos finais da glicação avançada (AGEs)	WIRASATHIEN et al., 2007
Antibacteriana	Atividade frente as bactérias Gram negativas ( <i>Acinetobacter</i> sp., <i>Moraxella</i> sp.) e as gram positivas ( <i>Micrococcus luteus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> )	MOULARI et al., 2006
Anti-inflamatória	Potente atividade inibitória sobre a liberação de prostaglandina E2	RUANGNOO et al., 2012
Hepatoprotetora	Diminuição dos níveis de lipoperóxidos da transaminase pirúvica e da fosfolipase A2.	MORENA; PÉREZ, 1999
Hipocolesterolêmica	Diminuição dos níveis de colesterol total e fosfolípideos.	IGARASHI et al., 1996
Tóxica	Redução da sobrevivência média de abelhas no período de floração da espécie <i>D. mellis</i>	CINTRA et al. 2002
Antioxidante	Efeito inibitório sobre a xantina oxidase <i>in vitro</i> , enzima que catalisa a oxidação da hipoxantina em xantina e desta em ácido úrico	XU et al., 2013
Biopesticida	Inibição sobre o desenvolvimento de larvas de <i>Anticarsia gemmatilis</i> Hubner e <i>Spodoptera frugiperda</i> Smith (Lepdoptera:Noctuidae)	PEREIRA et al., 2002
Anti-inflamatória	Supressão das atividades de mieloperoxidase e malondialdeído, bem como a expressão do fator de necrose tumoral- $\alpha$ e Interleucina-6 <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	KONG et al., 2016
Neuroprotetora	Potencial agente terapêutico contra doença de Alzheimer, através de múltiplos mecanismos de melhoria cognitiva	WANG et al., 2016

FONTE: A autora (2017)

## 4.9 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Devido à natureza complexa dos fitoquímicos e pela complexidade dos processos de oxidação e de sistemas antioxidantes, é aconselhável a utilização de mais de um método na avaliação da atividade antioxidante de extrato de plantas (CHOI et al., 2002; CAMPOS; FRASSON, 2012).

### 4.9.1 Formação do Complexo Fosfomolibdênio

Constitui-se em um método simples e barato na avaliação da capacidade antioxidante total de uma mistura complexa de compostos, como é o caso de extratos obtidos de plantas. A solução teste inicial possui coloração amarela, e a medida que ocorre a redução do molibdênio (VI) a molibdênio (V) em presença de determinadas substâncias com capacidade antioxidante, há formação de um complexo verde entre fosfato/molibdênio (V), em pH ácido, o qual é determinado espectrofotometricamente. Este método possui a vantagem de avaliar a capacidade antioxidante tanto de componentes lipofílicos quanto de hidrofílicos (PRIETO; PINEDA; AGUILAR, 1999).

Os resultados obtidos levando-se em consideração a vitamina C e a rutina como 100% estão expressos na (TABELA 14) e nos (GRÁFICOS 3 e 4).

De acordo com os resultados, todas as amostras testadas, demonstraram atividade antioxidante por redução do complexo fosfomolibdênio. As amostras demonstraram menor atividade antioxidante em relação ao ácido ascórbico, do que para a rutina. No entanto pelo fato da rutina ser um flavonoide e estruturalmente se aproximar mais das amostras testadas do que o ácido ascórbico traz um comparativo melhor nessa atividade.

Embora o resultado em relação à vitamina C tenha sido menor do que os resultados obtidos em comparação a rutina, as frações hexanos demonstraram resultado considerável com 45,01% e 52,33% para FH e FHS respectivamente. Estatisticamente foram as frações que mais se aproximaram do padrão ácido ascórbico.

TABELA 14 – FORMAÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO DO EXTRATO BRUTO, FRAÇÕES E ÓLEO ESSENCIAL DE *Ocotea bicolor*

Amostra	Atividade antioxidante em	Atividade antioxidante em
	relação a vitamina C (%)	relação a rutina (%)
	E ± DP	E ± DP
VITAMINA C	100 a10	–
RUTINA	-	100 a2
FH	45,01±0,84 a8	157,91±2,94 a4
FC	34,44 ± 1,00 a5	120,83 ± 3,53 a3
FAE	39,42 ± 0,33 a7	138,33 ± 1,17 a3
FR	19,08 ± 0,59 a1	66,94 ± 1,76 a1
FHS	52,33 ± 0,84 a9	180,41 ± 2,94 a4
FCS	36,34 ± 2,01 a6	127,5 ± 7,07 a3
FAES	21,37 ± 0,34 a2	75,00 ± 1,17 a1
FRS	27,90 ± 2,51 a3	97,91 ± 8,83 a2
EB	32,66 ± 0,50 a5	114,58 ± 1,76 a3
OE	29,21 ± 2,01 a4	102,5 ± 7,07 a2

FONTE: A autora (2016).

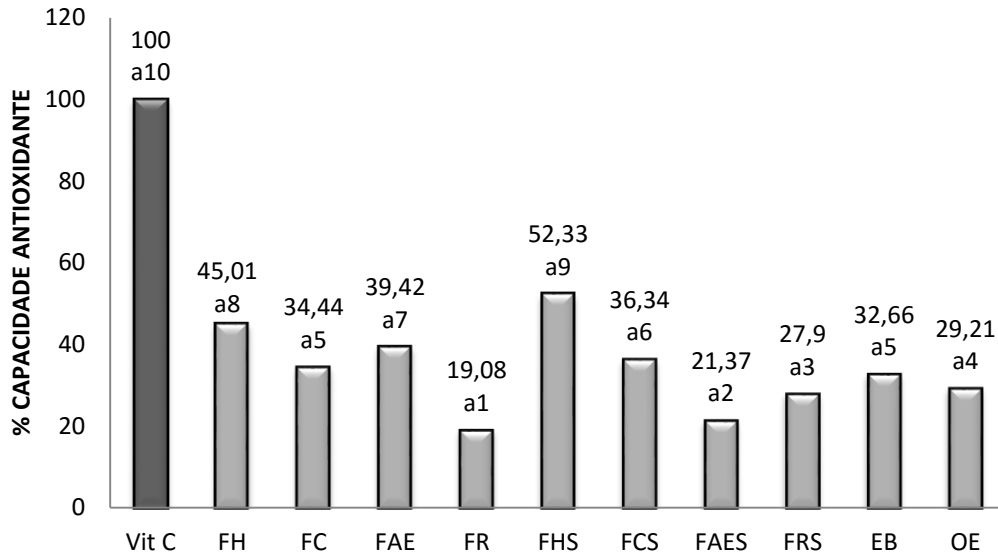
NOTA: fração hexano (FH), fração clorofórmio (FC), fração acetato de etila (FAE), fração remanescente (FR), fração hexano do sólido (FHS), fração clorofórmio do sólido (FCS), fração acetato de etila do sólido (FAES), fração remanescente do sólido (FRS).

\*amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ) entre si, pelo teste de Scott Knott.

Quando comparadas ao padrão rutina apenas duas amostras: fração remanescente e fração acetato de etila do sólido tiveram resultados estatisticamente menores que a rutina. As demais amostras apresentaram resultados similares e até maiores que o padrão testado.

Outro aspecto a ser considerado é o fato das frações com menor polaridade apresentarem melhores resultados. Este achado corrobora com a afirmação encontrada na literatura de que a técnica permite a avaliação da capacidade antioxidante de componentes lipofílicos (PRIETO; PINEDA; AGUILAR, 1999). Neste contexto vale lembrar que o óleo essencial obteve estatisticamente resultado semelhante ao padrão rutina.

GRÁFICO 3- CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO DAS AMOSTRAS COMPARADAS A VITAMINA C

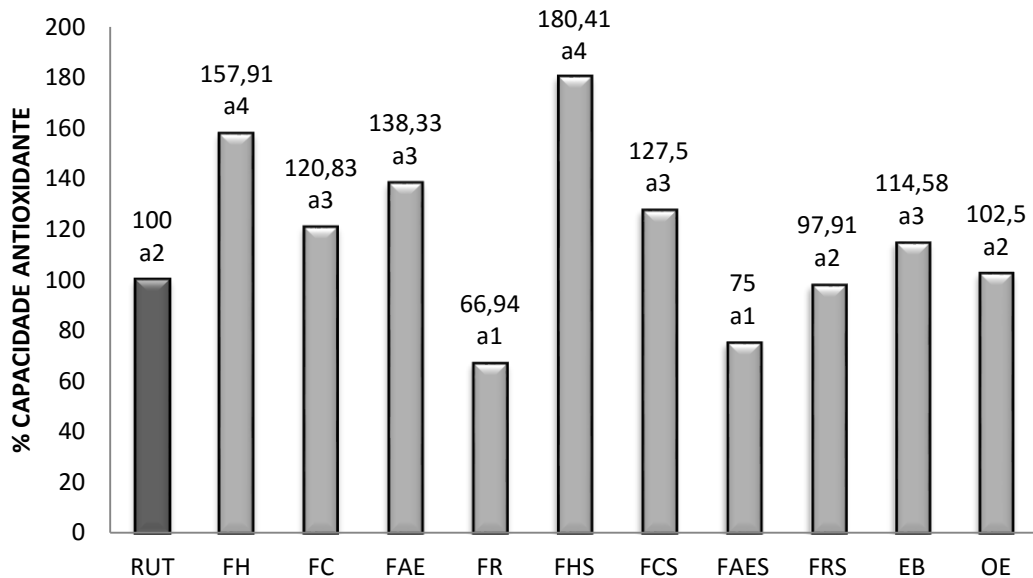


FONTE: A autora (2016).

NOTA: vitamina C (Vit C); fração hexano (FH), fração clorofórmio (FC), fração acetato de etila (FAE), fração remanescente (FR), fração hexano do sólido (FHS), fração clorofórmio do sólido (FCS), fração acetato de etila do sólido (FAES), fração remanescente do sólido (FRS).

\*amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ) entre si, pelo teste de Scott Knott.

GRÁFICO 4- CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO DAS AMOSTRAS COMPARADAS A RUTINA



FONTE: A autora (2016).

NOTA: rutina (RUT); fração hexano (FH), fração clorofórmio (FC), fração acetato de etila (FAE), fração remanescente (FR), fração hexano do sólido (FHS), fração clorofórmio do sólido (FCS), fração acetato de etila do sólido (FAES), fração remanescente do sólido (FRS).

\*amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ) entre si, pelo teste de Scott Knott

#### 4.9.2 Redução do Radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila)

A molécula de 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) é caracterizada como um radical livre estável em virtude da deslocalização do elétron desemparelhado por toda a molécula. Esta deslocalização confere a esta molécula uma coloração violeta, caracterizada por uma banda de absorção em etanol em cerca de 518nm (ALVEZ et al.,2010; MOLYNEUX, 2004).

Este ensaio se baseia na medida da capacidade antioxidante de uma determinada substância em sequestrar o DPPH<sup>•</sup> que é capaz de aceitar um radical hidrogênio para tornar-se uma molécula diamagnética estável o difenil-picril-hidrazina. Dessa forma ocorre a mudança simultânea na coloração de violeta a amarelo pálido com conseqüente desaparecimento da absorção, podendo a mesma ser monitorada pelo decréscimo da absorbância. A partir dos resultados obtidos determina-se a porcentagem de DPPH<sup>•</sup> remanescente no meio reacional (ALVEZ et al.,2010; MOLYNEUX, 2004).

A avaliação do potencial antioxidante por este método é determinada em amostras que demonstraram ter capacidade de reduzir 50% do DPPH<sup>•</sup> presente, determinando por regressão linear. Amostras que apresentaram concentração inibitória (IC<sub>50</sub>) maior de 500 µg/mL foram consideradas inativas, não demonstrando potencial sequestrador de radicais livres.

Os gráficos que apresentam a curva de calibração utilizada para a determinação da IC<sub>50</sub> das amostras testadas e dos padrões utilizados, encontram-se no (ANEXO 2). A partir das curvas de calibrações obtidas foi possível determinar o IC<sub>50</sub>, ou seja, as concentrações das amostras e controles capazes de reduzir 50% do DPPH<sup>•</sup> presente no meio reacional. Estes resultados estão representados na (TABELA 15).

Através da análise de variância – ANOVA e o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ), para localização das diferenças estatísticas chegou-se em 5 grupos que diferem entre si das 9 amostras testadas.

Quando comparadas aos padrões a fração remanescente do sólido apresenta atividade antioxidante similar a vitamina C e a rutina, pois não há diferença estatística significativa entre os resultados obtidos. Um fator que corrobora com esses resultados é a presença do flavonoide identificado nessa fração, a

astilbina, o qual é apontado na literatura com notável atividade antioxidante (PETACCI et al., 2010; XU et al., 2013).

TABELA 15 – RESULTADO DE IC<sub>50</sub> PARA REDUÇÃO DO DPPH· DO EXTRATO E FRAÇÕES

Amostra	IC <sub>50</sub> (µg/ml)	Classificação do teste de tukey*			
Vit C	4,92	a1			
Rut	6,15	a1			
FRS	8,05	a1			
FAE	9,93	a1	a2		
FAES	11,76	a1	a2		
FCS	25,62	a1	a2		
EB	28,24	a1	a2		
FR	54,19		a2	a3	
FC	73,66			a3	a4
FH	103,76				a4
FHS	184,33				a5

FONTE: A autora (2016).

NOTA: vitamina C (Vit C); rutina (Rut); fração hexano (FH), fração clorofórmio (FC), fração acetato de etila (FAE), fração remanescente (FR), fração hexano do sólido (FHS), fração clorofórmio do sólido (FCS), fração acetato de etila do sólido (FAES), fração remanescente do sólido (FRS).

\*amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ) entre si, pelo teste de Tukey.

As demais amostras também apresentaram atividade antioxidante, no entanto é necessária uma maior concentração das mesmas para reduzir 50% da concentração do radical DPPH no meio reacional. As frações hexanos foram as que mais se distanciaram estatisticamente dos padrões, apresentando IC<sub>50</sub> de 103,76(µg/mL) e 184,33(µg/mL) para FH e FHS, respectivamente.

Percebemos que, diferentemente dos resultados obtidos no teste de formação do complexo fosfomolibdênio, no teste de redução do DPPH· as frações com maior polaridade foram as que apresentaram melhores resultados.

Estudos com espécies do gênero *Ocotea* atestaram sua atividade antioxidante por meio da redução do DPPH, tais como: *O. odorífera* (CANSIAN et al., 2010); *O. minor* (YAMAGUCHI et al., 2012); *O. bofo* (GUERRINI et al., 2006) entre outros.

Bruni e colaboradores (2004) atestaram a redução de 52% do radical DPPH pelo OE do cálice dos frutos de *O. quixos* (Lam.) Kosterm. Por outro lado, os resultados da inibição da oxidação do ácido linoleico pelo teste de β-caroteno/ácido linoleico não foram expressivos. Este fato mostra os diferentes comportamentos do OE na redução de radicais livres e na inibição da oxidação, sugerindo que os

componentes polares do óleo essencial podem ser responsáveis pela atividade revelada no teste de DPPH.

#### 4.10 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

##### 4.10.1 TOXICIDADE EM *Artemia salina*

Os resultados de toxicidade em *Artemia salina* estão representados na (TABELA 16).

TABELA 16 – TOXICIDADE DOS EXTRATOS BRUTOS, FRAÇÕES E ÓLEO ESSENCIAL DE *Ocotea bicolor* EM *Artemia salina*

Amostra	Cl <sub>50</sub> (µg/ml <sup>-1</sup> )	Intervalo de confiança de 95% (µg/ml <sup>-1</sup> )
FH	270,37	235,40-310,54
FC	>1000	-
FCE	>1000	-
FR	>1000	-
FHS	108,61	93,80-125,76
FCS	242,86	209,75-281,21
FAES	>1000	-
FRS	>1000	-
OE	40,10	24,16-66,55
SDS	24,49	22,67-26,44

FONTE: A autora (2016).

NOTA: fração hexano (FH), fração clorofórmio (FC), fração acetato de etila (FAE), fração remanescente (FR), fração hexano do sólido (FHS), fração clorofórmio do sólido (FCS), fração acetato de etila do sólido (FAES), fração remanescente do sólido (FRS), óleo essencial (OE), dodecilsulfato de sódio (SDS).

Compostos bioativos em doses elevadas quase sempre são tóxicos. Desta maneira, a avaliação da letalidade em um organismo animal menos complexo constitui um monitoramento viável durante o fracionamento de extratos (LHULLIER, HORTA, FALKENBERG, 2006).

O ensaio de toxicidade em *Artemia salina*, um microcrustáceo de água salgada muito utilizado na alimentação para peixes, é uma ferramenta bastante útil em avaliação preliminar de toxicidade geral. Consiste em um método rápido, de baixo custo e não exige técnicas assépticas. Esses fatores favorecem sua utilização rotineira, podendo ser desenvolvido no próprio laboratório de fitoquímica (ALVES et al. 2000; MEYER et al., 1982; SIQUEIRA et al. 1998).

Segundo McLaughlin, Rogers e Anderson (1998), esse bioensaio têm sido utilizado sistematicamente na avaliação prévia de extratos de plantas conhecidas como antitumorais, levando à descoberta do *Annonaceous acetogenins* como nova classe de agentes antitumorais ativos. Também foi relatado na correlação com atividade contra o *Trypanosoma cruzi* (ALVES et al. 2000; ZANI et al. 1995), atividades antifúngica, antimicrobiana, viruscida (MACBAE, HUDSON, TOWERS, 1988) e parasiticida (SAHPAZ et al., 1994), e com testes de toxicidade aguda oral *in vivo* (PARRA et al., 2001).

Desta forma acredita-se que plantas com alta toxicidade contra *A. salina* também podem apresentar alto potencial para atividades biológicas. Contribuindo na busca de substâncias ativas em sistemas biológicos, e assim, direcionando estudos fitoquímicos mais detalhados (AMARANTE et al., 2011).

Segundo Meyer e colaboradores (1982), amostras que apresentam  $CL_{50} < 1000 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$  podem ser consideradas como tóxicas. Porém, uma relação entre o grau de toxicidade e  $CL_{50}$  mais detalhada foi descrita por Amarante e colaboradores (2011), como segue:

- baixa toxicidade:  $CL_{50} > 500 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$
- moderada toxicidade:  $CL_{50}$  entre  $100 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$  a  $500 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$
- alta toxicidade:  $CL_{50} < 100 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$

Como descrito em Petrobrás (1996), a concentração letal ( $CL_{50}$ ) do dodecilsulfato de sódio (SDS) em *Artemia salina* deve ser entre  $13 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$  e  $30 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$  o que foi confirmado nos resultados obtidos:  $CL_{50 \text{ SDS } 24\text{h}} = 24,49 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ . Esta constatação demonstra que a sensibilidade dos indivíduos está padronizada, o que reduz a possibilidade de gerar resultados falsamente exacerbados ou atenuados.

Desta forma, os resultados demonstram que as frações clorofórmio, acetato de etila e remanescente, e acetato de etila do sólido podem ser consideradas livres

de toxicidade aos organismos avaliados, segundo classificação de Meyer et al. (1982).

O óleo essencial, extrato bruto, as frações hexano, fração clorofórmio e fração hexano do sólido foram consideradas tóxicas segundo Meyer et al. (1982). Na classificação de Amarante et al. (2011), foram enquadradas como moderadamente tóxicas o extrato bruto, as frações hexano, fração clorofórmio e fração hexano do sólido, portanto as frações que apresentam menor polaridade. O óleo essencial apresentou a maior toxicidade enquadrando-se em altamente tóxico aos organismos em questão.

Em estudo realizado por Cuca, Leon e Coy (2009), o extrato bruto etanólico, frações benzênica, butanólica, acetato de etila e mistura de 2'-epímeros acetilados de uma neolignana dos frutos de *O. heterochroma* apresentou alta toxicidade em *A. salina*. Sendo que, o extrato bruto etanólico foi o mais expressivo com  $CL_{50} = 28,1 \mu\text{g/mL}^{-1}$ .

Garret e colaboradores (2007), avaliou o potencial tóxico do óleo essencial de *O. notata*, apresentando uma  $CL_{50}$  de  $2,37 \mu\text{g/mL}^{-1}$ , sendo considerado como de grande atividade frente a *A. Salina*, sendo muito tóxico para este organismo. Este resultado direcionou os estudos para o teste antibacteriano de difusão em disco, obtendo-se boa correlação devido à confirmação da atividade antibacteriana, corroborando com resultados já relatados por outros autores (MACBAE, HUDSON, TOWERS, 1988).

A alta toxicidade do óleo de *O. bicolor* frente à *Artemia salina* pode ser apontada pela presença do  $\delta$ -cadineno, que apresenta atividade antimicrobiana (MUROI; KUBO, 1993; SKAL TSA et al., 2003). O  $\beta$ -elemeno e  $\alpha$ -cadinol que também estão entre os componentes majoritários, tem pronunciada atividade antitumoral em variadas linhagens celulares (WU et al., 1999; ZOU et al., 2001; WANG et al., 2005; HE et al., 1997; SYLVESTRE, et al., 2006). A mistura de outros componentes presentes nesse óleo, como por exemplo, o  $\alpha$  humuleno e o cariofileno que possuem atividade antitumoral e o último como antiinflamatório, bactericida, insetífugo e antialergênico, podem aumentar por sinergismo o potencial tóxico do óleo essencial (SYLVESTRE, et al., 2006; VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002).

#### 4.10.2 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

A atividade antibacteriana realizada pela técnica de microdiluição em caldo para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM), consta com seus resultados expressos na (TABELA 17).

Sendo uma adaptação da técnica da macrodiluição, a microdiluição em caldo envolve o uso de pequenos volumes de caldo colocados em placas com poços de fundo redondo ou cônico estéreis, próprias para microdiluição (ALVES et al., 2008). A partir desse teste é possível determinar a CIM, ou seja, a menor concentração de agente capaz de inibir completamente o crescimento do organismo teste (MADIGAN et al., 2010).

Embora existam alguns inconvenientes, tais como precipitação de compostos presentes em alguns extratos, e a coloração do extrato em concentração alta que poderão interferir na análise e adesão de células de alguns microorganismos à base do poço essa técnica é a mais adequada. Isto se deve a maior sensibilidade que a técnica apresenta e o uso de quantidade mínima de reagentes, possibilitando um maior número de réplicas o que aumenta a confiabilidade dos resultados (OSTROSKY et al., 2008).

Vários estudos que avaliam atividade antibacteriana pelo método descrito classificam os resultados como: CIM menor que 100 µg/mL = boa atividade antibacteriana; CIM entre 100-500 µg/mL = atividade moderada; de 500-1000 µg/mL como fraca atividade e acima de 1000 µg/mL considerada inativa (HOLETZ et al. 2002; AYRES et al., 2008; SANTOS et al., 2008).

Com base na classificação acima descrita podemos observar que as frações mais efetivas foram a fração residual do sólido e fração clorofórmio do sólido e para *E. coli*, e fração acetato de etila do sólido com para *S. aureus* com CIM de 250 µg/mL.

Com relação as cepas bacterianas testadas a mais sensível ao extrato e frações de *O. bicolor* foi a *E. coli*. As frações clorofórmio, acetato de etila, remanescente e a fração acetato de etila do sólido inibiram o microrganismo em questão em 1000 µg/mL. Potencial inibitório de 500 µg/mL foi apresentado pelo extrato bruto e pelas frações hexanos, enquanto que fração clorofórmio e remanescente do sólido inibiram o crescimento desta cepa até 250 µg/mL, conforme citado anteriormente.

TABELA 17 - ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE *Ocotea bicolor* A PARTIR DO TESTE DECONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

	Microrganismo						
	Gram-positivo		Gram-negativo				
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603
<b>Amostra</b>							
FH	1000 µg/mL	-	1000 µg/mL	1000 µg/mL	500 µg/mL	-	-
FC	1000 µg/mL	-	-	-	1000 µg/mL	-	-
FAE	1000 µg/mL	-	-	-	1000 µg/mL	-	-
FR	-	1000 µg/mL	-	-	1000 µg/mL	-	-
FHS	1000 µg/mL	-	-	-	500 µg/mL	-	-
FCS	1000 µg/mL	-	-	-	250 µg/mL	-	-
FAES	250 µg/mL	500 µg/mL	-	-	1000 µg/mL	-	-
FRS	-	-	1000 µg/mL	-	250 µg/mL	-	1000 µg/mL
EB	-	-	-	-	500 µg/mL	-	-
OE	-	-	-	-	-	-	-

FONTE: A autora (2016).

NOTA: fração hexano (FH), fração clorofórmio (FC), fração acetato de etila (FAE), fração remanescente (FR), fração hexano do sólido (FHS), fração clorofórmio do sólido (FCS), fração acetato de etila do sólido (FAES), fração remanescente do sólido (FRS), extrato bruto (EB), óleo essencial (OE).

\* (-) CIM > 1000 µg/mL

*S. aureus* foi a segunda cepa mais inibida. As frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e frações hexano e clorofórmio do sólido ocasionaram inibição em 1000 µg/mL e a fração acetato de etila do sólido apresentou CIM de 250 µg/mL. *E. aerogenes* não apresentou inibição em concentrações iguais ou abaixo de 1000 µg/mL para nenhuma das amostras testadas, seguidas de *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* inibidas por CIM de 1000 µg/mL das frações hexano e remanescente do sólido respectivamente. O óleo essencial promoveu inibição aos microrganismos testados em concentrações acima de 1000 µg/mL.

O gênero *Ocotea* apresenta vários estudos que atestam a atividade antibacteriana. Das espécies deste gênero a mais estudada neste aspecto é a *O. odorifera*. Em estudo realizado por Cansian et al. (2010) utilizando técnica de difusão em placas demonstrou ser o óleo essencial desta espécie mais ativo sobre Gram-negativas do que para Gram-positivas, sendo a maior atividade sobre *Klebsiella pneumoniae* (23,6 mm) em 20 µL de óleo essencial. Com relação ao extrato os micro-organismos sensíveis foram *S. aureus*, *M. luteus*, *E. faecalis* e *E. coli*. Em outro estudo desenvolvido por Souza et al. (2004), os microorganismos *E. coli*, *B. subtilis*, *M. luteus*, *C. albicans* e *S. cerevisiae* mostraram-se sensíveis ao extrato de *O. odorifera*, enquanto que *S. aureus* se mostrou resistente, sendo contraditório ao resultado obtido por Gonçalves, Alves-Filho e Menezes (2005) onde houve atividade de *O. odorifera* contra *S. aureus*. Rogatto et al., 2014, obtiveram resultados positivos na inibição de *B.subtilis*, *M.luteus*, *S. aureus*, *S.cerevisiae*, *E. faecalis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* para *O. odorifera*, utilizando técnicas de difusão em placas e de CIM por diluição em caldo.

Outras espécies também foram testadas frente a ensaio antibacteriano, a *O. duckei*, cujo extrato etanólico bruto apresentou bioatividade para *S. aureus* (ANTUNES et al., 2006), e *O. notata* com poder de inibição para *E. faecalis*, *S. aureus*, *S. epidermidis* conferido pelo óleo essencial (GARRETT et al., 2007).

## 5 CONCLUSÃO

Com o trabalho realizado no âmbito desta dissertação incrementou-se o conhecimento sobre *Ocotea bicolor* Vattimo-Gil (LAURACEAE). Pode-se considerá-lo como inédito, uma vez que os trabalhos sobre a espécie, até então são incipientes, sendo focados somente em estudos taxonômicos e levantamentos florísticos.

A descrição morfoanatômica foi importante para a correta identificação e caracterização da espécie em estudo. Foram depositadas no GenBank, pela primeira vez, as sequências de DNA das regiões *matK* e *rbcL* e o perfil físico-químico delineado para *O. bicolor* pode ser utilizado posteriormente como parâmetro para controle de qualidade.

A partir da obtenção do óleo essencial por hidrodestilação e análise cromatográfica por CG/MS, foi possível detectar a predominância de sesquiterpenos e os constituintes majoritários:  $\delta$ -cadineno (7,39%),  $\beta$ -sesquifelandreno (6,67%),  $\beta$ -elemeno (5,41%) e o álcool  $\alpha$ -cadinol (5,23%) bem como o estabelecimento do rendimento do óleo essencial de folhas de *O. bicolor*.

Em pesquisa preliminar por CCD foi possível a detecção das seguintes classes de metabólitos secundários: alcaloides, flavonoides, esteroides, terpenos e cumarinas. Foram isolados cristais da fração remanescente do sólido e a substância identificada como astilbina (3-O- $\alpha$ -ramnosídeo de taxifolina ou diidroquercetina-3-O- $\alpha$ -ramnosídeo).

A atividade antioxidante apresentou resultados expressivos nas duas metodologias empregadas. Pelo método de formação do complexo fosfomolibdênio o melhor resultado foi obtido pela fração hexano do sólido, 52,33% e 180,41% comparada a vitamina C e rutina respectivamente. No teste de Redução do Radical DPPH a fração remanescente do sólido apresentou atividade antioxidante estatisticamente semelhante aos padrões utilizados.

A bioatividade sobre microcrustáceo *Artemia salina* evidenciou níveis significativos de toxicidade pelas frações que apresentam menor polaridade: extrato bruto, as frações hexano, fração clorofórmio e fração hexano do sólido, destacando-se o óleo essencial enquadrado como altamente tóxico aos organismos em questão.

Com relação a atividade antibacteriana sobre os microrganismos *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis* e *Salmonella typhimurium* a espécie *O. bicolor* apresentou-se com moderada atividade a inativa.

Considerando-se os resultados obtidos nos ensaios realizados, o prosseguimento dos estudos com *O. bicolor* investigando aplicações, propriedades e seus metabólitos secundários é de suma importância. A presença de atividade tóxica e excelentes resultados da ação antioxidante fazem do extrato bruto, frações e óleo essencial um excelente alvo de estudo *in vivo* para esta espécie, contribuindo com estudos inéditos adicionais.

## REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography / Mass Spectrometry. Carol Stream IL: **Allured Publishing**, 4 th, 2007.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA), **Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico: Norma Aprovada - Sexta Edição**. M7-A6, v.23 N°2, 2003.
- ALBUQUERQUE, U. P. The use of medicinal plants by the cultural descendants of African people in Brazil. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 20, n. 2, p. 139-144, 2001.
- ALCÂNTARA, J. M. **Bioprospecção de espécies amazônicas da família Lauraceae com potencial aromático e medicinal**. 139f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2009.
- ALCÂNTARA, J. M. et al. Composição química e atividade biológica dos óleos essenciais das folhas e caules de *Rhodostemonodaphne parvifolia* Madriñán (Lauraceae). **Acta Amazonica**, v. 40, p. 567-572, 2010.
- ALVES, C. Q. et al. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n.10, p. 2202-2210, 2010.
- ALVES, E.G. et al. Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade anti-bacteriana de extratos brutos de espécies vegetais de substâncias puras. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1224-1229, 2008.
- ALVES, T M.A. et al. Biological screening of Brazilian medicinal plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.95, p. 367-373, 2000.
- ALTSCHUL, S. F. Basic local alignment search toll. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p.403-410, 1990.
- AMARANTE, C.B. et al. Estudo fitoquímico biomonitorado pelos ensaios de toxicidade frente à *Artemia salina* e de atividade antiplasmódica do caule de aninga (*Montrichardialinifera*). **Acta Amazonica**, v. 41, n.3, p.431 – 434, 2011.
- AMOROZO, M. C. M. A. A abordagem etnobotânica na pesquisa de plantas medicinais. *In*: DI STASI, L. C. **Plantas medicinais: arte e ciência**. São Paulo: UNESP, 1996.
- ANTUNES, R. M. P. et al. Atividade antimicrobiana “in vitro” e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de fitoconstituintes e produtos sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 517-524, 2006.

AGP. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 181, p. 1-20, 2016.

AZEREDO, A. M. L. O código de barras da vida baseado no DNA “Barcoding of Life”: Considerações e perspectivas. **Centro de Gestão e Estudos Estratégicos**, 2005.

AZEREDO, C. M. O. et al. In vitro biological evaluation of eight different essential oils against *Trypanosoma cruzi*, with emphasis on *Cinnamomum verum* essential oil. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 14, n. 1, p. 309, 2014.

AYRES, M. C. C., et al. Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos da raiz de *Copernicia prunifera*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 1, p. 90-97, 2008.

BABU, G. D. K.; SINGH, B. Simulation of *Eucalyptus cinerea* oil distillation: A study on optimization on 1,8-cineole production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, p. 226-231, 2009.

BADKE, M. R. et al. Saberes e práticas populares de cuidado em saúde com o uso de plantas medicinais. **Texto Contexto Enfermagem**, v. 21, n. 2, p. 363-370, 2012.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils - A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446–475, 2008.

BARBOSA-FILHO, J. M. et al. GC-MS Analysis and cardiovascular activity of the essential oil of *Ocotea duckei*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 1, p. 37-41, 2008.

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BARNECHE, S. et al. Prospección química y microbiológica del bosque de galería del río Uruguay. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 6, p. 878-885, 2010.

BATISTA, A. N. de L. et al. Aromatic compounds from three Brazilian Lauraceae species. **Química Nova**, v. 33, n. 2, p. 321-323, 2010.

BEÇAK, W.; PAULETE, J. **Técnicas de citologia e histologia**. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, v.1, 1976.

BEDNARCZUK, V. O. et al. Testes in vitro e in vivo utilizados na triagem toxicológica de produtos naturais. **Visão Acadêmica**, v. 11, n. 2, 2010.

BEHLING, E. B. et al. Flavonoide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. **Alimentos Nutrição**, v. 15, n. 03, p. 285-292, 2004.

BERLYN, G. P.; MIKSCHE, J. P. **Botanical microtechnique and cytochemistry**. Ames: Iowa State University, 1976.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE POLÍTICAS DE SAÚDE. **Proposta de política nacional de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos**. Ministério da Saúde, 2001. 38 p.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Política Nacional de Medicina Natural e Práticas Complementares PMNPC**. Ministério da Saúde, 2005. 14 p.

BROTTO, M. L.; CERVI, A. C.; SANTOS, E. P. O gênero *Ocotea* (Lauraceae) no estado do Paraná, Brasil. **Rodriguésia**, v. 64, n.3, p. 495-525, 2013.

BROTTO, M. L.; SANTOS, E. P.; BAITELLO, J. B. Lauraceae no Morro dos Perdidos (Floresta Atlântica), Paraná, Brasil. **Rodriguésia**, v. 60, n.2, p. 445-459, 2009.

BRUNI, R. et al. Chemical composition and biological activities of Ishpingo essential oil, a traditional Ecuadorian spice from *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. (Lauraceae) flower calices. **Food Chemistry**, v. 85, n. 3, p. 415–421, 2004.

BURT, S. Essential Oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **International Journal of Food Microbiology**, v.94, n.3, p. 223-253, 2004.

CABRAL, G.A.L; MACIEL, J. R. Levantamento etnobotânico da coleção de plantas medicinais do jardim botânico do Recife, PE. **Natureza on line**, v.3, n.9, p.146-151, 2011.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal and Biological Research**, v.33, n.2, p. 179-189, 2000.

CAMPOS, J.S.; FRASSON, A. P. Z. Avaliação da atividade antioxidante do extrato aquoso de *Lafoensia pacari* A. ST-HIL. em emulsão não-iônica. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 32, n. 3, p. 363-368, 2012.

CANDIDO, L. P. et al. Evaluation of the Allelopathic Potential of Leaf, Stem, and Root Extracts of *Ocotea pulchella* Nees et Mart. **Chemistry & Biodiversity**, v. 13, n. 8, p. 1058-1067, 2016.

CANSIAN, R. L. et al. Atividade antioxidante e antimicrobiana de extratos de canela-sassafrás (*Ocotea odorífera* (Vell.) Rowher). **PERSPECTIVA**, v.34, n.127, p. 123-133, 2010.

CARVALHO, J. L. 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. 2001.

CARVALHO, J. C. T. **Fitoterápicos anti-inflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas.** Ribeirão Preto: Tecmedd, 2004.

CASIRAGHI, M. et al. DNA barcoding: a six-question tour to improve users' awareness about the method. **Briefings in bioinformatics**, v.2, n.4, p. 440-453, 2010.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química nova**, v.21, n.1, p.99-105, 1998.

CHANDA, S.; RAKHOLIYA, K. Combination therapy: Synergism between natural plant extracts and antibiotics against infectious diseases. **Science against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances**. v. 1, n. 13, p. 520-529, 2011.

CHAO, L. K. et al. Study on the antiinflammatory activity of essential oil from leaves of *Cinnamomum osmophloeum*. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, n. 18, p. 7274–7278, 2005.

CHAVERRI, C.; CICCIO, J. F. Essential oil of trees of the genus *Ocotea* (Lauraceae) in Costa Rica. I. *Ocotea brenesii*. **Revista de biología tropical**, v. 53, n. 3-4, p. 431-436, 2005.

CHAVERRI, C.; CICCIO, J.F.; Volatile constituents of the oils from *Povedadaphne quadriporata* (Lauraceae) from "Alberto M. Brenes" biological preserve, Costa Rica. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 605-609, 2008.

CHAVERRI, C.; DÍAZ, C.; CICCIO, J. F. Chemical Analysis of Essential Oils from *Ocotea gomezii* WC Burger and *Ocotea morae* Gómez-Laur.(Lauraceae) Collected at "Reserva Biológica Alberto M. Brenes" in Costa Rica and their Cytotoxic Activity on Tumor Cell Lines. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 4, p. 741-745, 2011.

CHOI, J. et al. Constituents of the essential oil of the *Cinnamomum cassia* stem bark and the biological properties. **Archives of pharmacal research**, v. 24, n. 5, p. 418–423, out. 2001.

CHOI, C. W. et al. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. **Plant science**, v. 163, n. 6, p. 1161-1168, 2002.

CHOU, S. T. et al. *Cinnamomum cassia* essential oil inhibits  $\alpha$ -MSH-induced melanin production and oxidative stress in murine B16 melanoma cells. **International journal of molecular sciences**, v. 14, n. 9, p. 19186-19201, 2013.

CINTRA, P. et al. Toxicity of *Dimorphandra mollis* to workers of *Apis mellifera*. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v.13, n.1, p.115-118, 2002.

CLSI. CLINICAL AND LABORATORY STANDARD INSTITUTE. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**; approved standard—ninth edition. M07-A9, v. 32, n. 2., 2012.

COE-TEIXEIRA, B. Lauraceae do gênero *Ocotea*, do Estado de São Paulo. **Rodriguésia**, n. 52, p. 55-190, 1980.

COMAI, S. et al. Essential oil of *Lindera neesiana* fruit: Chemical analysis and its potential use in topical applications. **Fitoterapia**, v. 81, n. 1, p. 11-16, 2010.

COSTA, I. F. B. et al. Antimycobacterial and Nitric Oxide Production Inhibitory Activities of *Ocotea notata* from Brazilian Restinga. **The Scientific World Journal**, v. 2015, 2015.

COSTION, C. et al. Plant DNA Barcodes Can Accurately Estimate Species Richness in Poorly Known Floras. **Plos One**. v. 6, n.11, p.01-09, 2011.

COUTINHO, D. F. et al. Composition and molluscicidal activity of the essential oil from the stem bark of *Ocotea bracteosa* (Meisn.) Mez. **Journal of Essential Oil Research**, v. 19, n. 5, p. 482-484, 2007.

COUTINHO, D. F. et al. Morphoanatomical study of the leaves of *Ocotea duckei* Vattimo (Lauraceae-Lauroidae). *Revista Brasileira Farmacognosia*, v.16, n. 4, p. 537-544, 2006a.

COUTINHO, D. F. et al. Morfo-anatomia foliar de *Ocotea gardneri* (Meisn.) Mez (Lauraceae-Lauroidae). *Revista Brasileira Farmacognosia*, v.16, n. 4, p. 178-184, 2006b.

COUTO, R.O., et al. Caracterização físico-química do pó das folhas de *Eugenia dysenterica* dc. (Myrtaceae). **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 6, n.3, p.59-69. 2009.

CRONQUIST, A. **The evolution and classification of flowering plants**. 2 ed. New York Botanical Garden, 1988.

CUCA, L. E.; LEON, P.; COY, E. D. A bicyclo [3.2. 1] octanoid neolignan and toxicity of the ethanol extract from the fruit of *Ocotea heterochroma*. **Chemistry of natural compounds**, v. 45, n. 2, p. 179-181, 2009.

DA SILVA, J. K. R. et al. Antioxidant capacity and cytotoxicity of essential oil and methanol extract of *Aniba canelilla* (HBK) Mez. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 55, n. 23, p. 9422-9426, 2007.

DADALIOGLU, I.; EVRENDILEK, G. A. Chemical compositions and antibacterial effects of essential oils of Turkish oregano (*Origanum minutiflorum*), bay laurel (*Laurus nobilis*), Spanish lavender (*Lavandula stoechas* L.), and fennel (*Foeniculum vulgare*) on common foodborne pathogens. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 52, n. 26, p. 8255-8260, 2004.

DE LUCA, A. N. **Estudo fitoquímico de espécies de Lauraceae**. 281 f. Tese de Doutorado - Universidade Estadual Paulista (UNESP). Campus de Araraquara. Instituto de Química Araraquara, 2005.

DE SMET, P. A. G. M.; BROUWERS, J. R. B. J. Pharmacokinetic evaluation of herbal remedies. **Clinical pharmacokinetics**, v. 32, n. 6, p. 427-436, 1997.

DELETRE, E. et al. Electrophysiological and behavioral characterization of bioactive compounds of the *Thymus vulgaris*, *Cymbopogon winterianus*, *Cuminum cyminum* and *Cinnamomum zeylanicum* essential oils against *Anopheles gambiae* and prospects for their use as bednet treatments. **Parasites & vectors**, v. 8, n. 1, p. 316, 2015.

DEVIENNE, K. F.; RADDI, M. S. G.; POZETTI, G. L. Das plantas medicinais aos fitofármacos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Brasil, v.6, p.11-14, 2004.

DEWICK, P. M. The biosynthesis of C5-C25 terpenoid compounds. **Natural Product Reports**, v.19, p.181-222, 2002.

DIAO, H. et al. Astilbin protects diabetic rat heart against ischemia–reperfusion injury via blockade of HMGB1-dependent NF- $\kappa$ B signaling pathway. **Food and Chemical Toxicology**, v. 63, p.104–110, 2014.

DIAS, C. S. et al. Isolamento e identificação de novos alcaloides de *Ocotea duckei* Vattimo (Lauraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, p. 62-63, 2003.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, p.13-15, 1990.

DORMAN, H. J. D., DEANS, S.G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p. 308-316, 2000.

DUARTE, M. C. T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **Revista Multiciência**, Campinas, v. 7, n. 1, 2006.

DUNNING, L. T.; SAVOLAINEN, V. Broad-scale amplification of matK for DNA barcoding plants, a technical note. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 164, n. 1, p. 1-9, 2010.

DUDAREVA, N.; PICHERSKY, E.; GERSHENZON, J. Biochemistry of plant volatiles. **Plant Physio**, v. 135, p.1893-1902, 2004.

EDRIS, A.E. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. **Phytotherapy Reserch**, v.21, p.308-323, 2007.

ELISABETSKY, E. Etnofarmacologia. **Ciência e Cultura**, Campinas, v.55, n.3, p.35-36. 2003.

FAHN, A. **Plant anatomy**. Oxford: Pergamon Press. 1990.

FARAGO, P. V. et al. Análise morfoanatômica de folhas de *Ocotea puberula* (Rich.) Nees, Lauraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 3, p. 250–255, 2005.

FARIAS, M. R. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In: **Farmacognosia: da planta ao medicamento. Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6 ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. UFRGS/ Ed. UFSC; 2010. Capítulo 12.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 1 ed. Companhia Editora Nacional: São Paulo, 1926.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 5 ed. Atheneu: São Paulo, 2010.

FAY, M. F. et al. Taxonomic affinities of *Medusagyne oppositifolia* (Medusagynaceae). **Kew Bulletin**, v. 52, p.111-120, 1997.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FERREIRA, I. C.F.R.; ABREU, R. M. V. Stress oxidativo, antioxidantes e fitoquímicos. **Bioanálise**, ano IV, v.2, p. 32-39, jul. /dez. 2007.

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

FORD, C. S. et al. Selection of candidate coding DNA Barcoding regions for use on land plants. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.159, p.1-11, 2009.

FOSTER, A. S. **Practical plant anatomy**. 2. ed. Princeton: D. Van Nostrand, 1949.

FOWLER, M. W. Plants, medicines and man. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 86, p.1797-1804, 2006.

FUCHS, C.H. Fuchsin staining with NaOH clearing for lignified elements elements of whole plants or plants organs. **Stain Technology**, v. 38, p. 141-144, 1963.

FUNARI, C.S.; FERRO, V. O. Uso ético da biodiversidade Brasileira: necessidade e oportunidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Brasil, v. 15, n.2, p.178-182, 2005.

GARCEZ, W. S. et al. Indole alkaloid and other constituents from *ocotea minarum*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 17, n. 2, p. 426-427, 2006.

GARRETT, R. et al. Antiherpetic activity of a flavonoid fraction from *Ocotea notata* leaves. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 2, p. 306-313, 2012.

GARRETT, R. et al. Atividade antibacteriana do óleo essencial de *Ocotea notata* guiada pelo ensaio de toxicidade sobre *Artemia salina* Leach. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v.6, n.6, p.344-345, 2007.

GONÇALVES, A. L.; ALVES FILHO, A.; MENEZES, H. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, n. 3, p. 353-358, 2005.

GREGORY, M.; BAAS, P. a survey of mucilage cells in vegetative organs of dicotyledons. *Isr. J. Bot.* 38: 125 – 174.

GUERRINI, A. et al. Composition of the volatile fraction of *Ocotea bofo* Kunth (Lauraceae) calyces by GC-MS and NMR fingerprinting and its antimicrobial and antioxidant activity. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 54, n. 20, p. 7778-7788, 2006.

HALLIWELL, B.; The antioxidant paradox, **The Lancet**, v.355, n. 01, p. 1179 - 1180, 2000.

HE, K., et al. Bioactive compounds from *Taiwania cryptomerioides*. **Journal of Natural Products**, v. 60, p.38–40, 1997.

HEBERT, P.D.N. et al. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**. v. 270, p.313-321, 2003.

HEBERT, P. D. N.; GREGORY, T. R. The promise of DNA Barcoding for taxonomy. **Systematic Botany**, v.54, p.852-859, 2005.

HOLETZ, F. B., et al. Screening of Some Plants Used in the Brazilian Folk Medicine for the Treatment of Infectious Diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.97, n.7, p.1027-1031, 2002.

HOLLINGSWORTH, P. M.; GRAHAM, S. W.; LITTLE, D. P. Choosing and using a plant DNA barcode. **PLoS One**, v. 6, n. 5, p. e19254. 2011.

HUANG, H. et al. Isolation and characterization of two flavonoids, engeletin and astilbin, from the leaves of *Engelhardia roxburghiana* and their potential anti-inflammatory properties. **Journal of agricultural and food chemistry**, n. 59, v. 09, p. 4562-9, 2011.

IGARASHI, K. et al. Effect of astilbin in tea processed from leaves of *Engelhardtia chrysolepis* on the serum and liver lipid concentrations and on the erythrocyte and liver antioxidative enzyme activities of rats. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 60, n. 3, p. 513-515, 1996.

INDRA, B. et al. Structure-activity relationship studies with (±)-nantenine derivatives for  $\alpha$  1-adrenoceptor antagonist activity. **European Journal of Pharmacology**. n. 43, v.3, p.173-178, 2002.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw Hill Book, 1940.

JÚNIOR, L.R. et al. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 112-119, 2001.

KOCEVSKI, D. et al. Antifungal effect of *Allium tuberosum*, *Cinnamomum cassia*, and *Pogostemon cablin* essential oils and their components against population of *Aspergillus* species. **Journal of food science**, v. 78, n. 5, p. 731-737, 2013.

KONG, G. et al. Astilbin alleviates LPS-induced ARDS by suppressing MAPK signaling pathway and protecting pulmonary endothelial glycocalyx. **International immunopharmacology**, v. 36, p. 51-58, 2016.

KRESS, W. J.; ERICKSON, D. L. A two locus global DNA barcode for land plants: the coding *rbcL* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region. **PLoS One** v. 2, n. 6, e508, 2007.

KUMAR, S.; VASUDEVA, N.; SHARMA, S. GC-MS analysis and screening of antidiabetic, antioxidant and hypolipidemic potential of *Cinnamomum tamala* oil in streptozotocin induced diabetes mellitus in rats. **Cardiovascular diabetology**, v. 11, n. 1, p. 1, 2012.

LEITE, J. P. V. **Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas**. 1 ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

LEWAN, L.; ANDERSSON, M.; MORALES, P.G. The use of *Artemia salina* in toxicity test. **Alternatives to laboratory animals ATLA**, v. 20, p. 297-301, 1992.

LHULLIER, C.; HORTA, P. A.; FALKENBERG, M. Avaliação de extratos de macroalgas bêmicas do litoral catarinense utilizando o teste de letalidade para *Artemia salina*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 158-163, 2006.

LIU, T.T.; YANG, T.S. Antimicrobial impact of the components of essential oil of *Litsea cubeba* from Taiwan and antimicrobial activity of the oil in food systems. **International journal of food microbiology**, v. 156, n. 1, p. 68-75, 2012.

LORCA, M. A. et al. Efectos antimicrobianos de extractos de plantas chilenas de las familias Lauraceae y Atherospermataceae. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 17, n. 1, p. 73-83, 2012.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e cultivos de plantas arbóreas do Brasil**. 2 ed. São Paulo: Nova Odessa, 2002.

LUCAS-FILHO, M. D. et al. ACE inhibition by astilbin isolated from *Erythroxylum gonocladum* (Mart.) O.E. Schulz. **Phytomedicine**, v. 17, p. 383-387, 2010.

MACBAE, W. D.; HUDSON, J. B.; TOWERS, G. H. N. Studies on the pharmacological activity of Amazonian Euphorbiaceae. **Journal of ethnopharmacology**, v. 22, n. 2, p. 143-172, 1988.

MACIEL, M.A.M., et al. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p.429-438, 2002.

MADIGAN, M.T. et al. **Microbiologia de Brock**, 12 ed. São Paulo: Artmed, 2010.

MADRIÑÁN S. **Rhodostemonodaphne (Lauraceae)**, New York: New York Botanical Garden, 2004. (Flora Neotropica. Monograph, n. 92).

MARQUES, A. C. Importância econômica da família Lauraceae Lindl. **Floresta e Ambiente**, v.1, p.195-206, 2001.

MARQUES, C. A. et al. Considerações anatômicas e análise de óleo essencial do hipanto e do fruto de *Hennecartia omphalandra* J. Poisson (Monimiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 3, p. 415-429, 2008.

MARZOUKI, H. et al. Biological activity evaluation of the oils from *Laurus nobilis* of Tunisia and Algeria extracted by supercritical carbon dioxide. **Natural product research**, v. 23, n. 3, p. 230-237, 2009.

MCLAUGHLIN, J.L.; ROGERS, L.L.; ANDERSON, J.E. The Use of Biological Assays to Evaluate Botanicals. **Drug Information Journal**, v.32, p.513-524, 1998.

MENUT, C. et al. Chemical and biological studies of *Ocotea comoriensis* bark essential oil. **Flavour and Fragrance journal**, v. 17, n. 6, p. 459-461, 2002.

MENSOR, L. L., et al. Screening of brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytoterapy Research**, v.15, p.127-130, 2001.

MERINO, F.J.Z. et al. Análise fitoquímica, potencial antioxidante e toxicidade do extrato bruto etanólico e das frações da espécie *Senecio westermanii* Dusén frente à *Artemia salina*. **Revista brasileira de plantas medicinais**, v. 17, n. 4, supl. 3, p. 1031-1040, 2015.

METCALFE, C. R. **Anatomy of the dicotyledons Magnoliales, Illiciales, and Laurales**. 2: ed. Clarendon Press, Oxford. v. 3, 1987.

METCALFE, C. R; CHALK, L. **Anatomy of the Dicotyledones: leaves, stem and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses**. Oxford: Clarendon Press, v.2, 1972.

MEYER, B. N., et al. Brine Shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Médica**, v.45, p.31-34, 1982.

MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. **Desenvolvimento de fitoterápicos**. São Paulo: Editorial Robe, 1999.

MIGUEL, O. G. “**Processo de obtenção de extratos hidroalcoólicos, extratos secos e derivados do agrião (*Nasturtium officinale*) e espécies medicinais afins, com modificações introduzidas em equipamento soxhlet para aplicações na indústria, área farmacêutica, cosmética, alimentícias e afins**”. PI 06017063-7 A2, 05 Apr. 2006, 11 Dec. 2007.

MIGUEL, O. G. et al. “**Identificação da propriedade antinociceptiva (analgésica) do alcaloide aporfínico S - (+) – dicentrina e usos do mesmo**”. BR 102014016339-5 A2, 24 Jun. 2014, 01 Jul. 2014.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarin Journal of Science Technology**, v.26, n.3, p.211-219, 2004.

MONTE NETO, R. L. et al. Crude ethanolic extract, lignoid fraction and yangambin from *Ocotea duckei* (Lauraceae) show antileishmanial activity. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 62, n. 5-6, p. 348-352, 2007.

MONTRUCCHIO, D. P. et al. Antinociceptive effects of a chloroform extract and the alkaloid dicentrine isolated from fruits of *Ocotea puberula*. **Planta medica**, v. 78, n. 14, p. 1543-1548, 2012.

MORAIS, L. C. S. L.; BARBOSA-FILHO, J. M.; ALMEIDA, R. N. Central depressant effects of reticuline extracted from *Ocotea duckei* in rats and mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.62, p. 57-61, 1998.

MORENA, G. S.; PÉREZ, J. M. Efecto hepatoprotector inducido por el flavonoide astilbina frente a un modelo animal tratado con tetracloruro de carbono. **Revista Cubana de Plantas Medicinai**s, v. 1, n. 4, p. 36-39, 1999.

MOULARI, B. et al. In vitro antimicrobial activity of the leaf extract of *Harungana madagascariensis* Lam. Ex Poir. (Hypericaceae) against strains causing otitis externa in dogs and cats. **Acta veterinaria Hungarica**, v. 55, n. 1, p. 97–105, 2007.

MUROI, H.; KUBO, I. Combination effects of antibacterial compounds in green tea flavor against *Streptococcus mutans*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 41, n. 7, p. 1102-1105, 1993.

NAVEED, R. et al. Antimicrobial activity of the bioactive components of essential oils from Pakistani spices against *Salmonella* and other multi-drug resistant bacteria. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 13, n. 1, p. 1, 2013.

NAKATA, P. A. Advances in our understanding of calcium oxalate Crystal formation and function in plants. *Plant Science*, v. 164, p. 901-909, 2003.

NASCIMENTO, J. C., et al. Determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH e doseamento de flavonoides totais em extratos de folhas da *Bauhinia variegata* L. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 92, n. 4, p. 327-332, 2011.

O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; McCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**, Vienna, v. 59, n. 2, p.368-73, 1964.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M. K. **Farmacognosia**. São Paulo: Atheneu, 1991.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G. **Fundamentos de farmacobotânica**. São Paulo: Atheneu, 1997.

OLIVEIRA, W., C.; CALLADO, C., H.; MARQUETE, O.; Anatomia do lenho de espécies do gênero *Nectandra* Rol. ex Rottb. (Lauraceae). **Rodriguésia**, v. 52, n. 81, p. 125-134, 2001.

OOI, L. S. M. et al. Antimicrobial activities of cinnamon oil and cinnamaldehyde from the Chinese medicinal herb *Cinnamomum cassia* Blume. **The American journal of Chinese medicine**, v. 34, n. 03, p. 511-522, 2006.

OSTROSKY, E. A., et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.

OZCAN, Birgul et al. Effective antibacterial and antioxidant properties of methanolic extract of *Laurus nobilis* seed oil. **Journal of Environmental Biology**, v. 31, n.5, p. 637-641, 2010.

PAREKH, J.; CHANDA, S. Antibacterial and phytochemical studies on twelve species of Indian medicinal plants. **African Journal of Biomedical Research**, v. 10, p. 175 – 181, 2007.

PARRA, A.L. et al. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice to determine oral acute toxicity of plant extracts. **Phytomedicine**, v. 8, p. 395-400, 2001.

PEREIRA, L. G. B. et al. Biological activity of astilbin from *Dimorphandra mollis* against *Anticarsia gemmatalis* and *Spodoptera frugiperda*. **Pest management science**, v. 58, n. 5, p. 503-507, 2002.

PERES, L. E. P. **Metabolismo Secundário**. Piracicaba – São Paulo: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. ESALQ/Universidade de São Paulo, 2004.

PERSOONE, G.; WELLS, P. G. **Artemia in aquatic toxicology: a review**. Universa Press, Volume 1. Belgium, 1987.

PETACCI, F. et al. Inhibition of peroxidase activity and scavenging of reactive oxygen species by astilbin isolated from *Dimorphandra mollis* (Fabaceae, Caesalpinioideae). **Biological research**, v. 43, p. 63- 74, 2010.

PETRY, K.; ROMAN JÚNIOR, W. A. Viabilidade de implantação de fitoterápicos e plantas medicinais no Sistema Único de Saúde (SUS) do município de Três Passos/RS. **Rev Bras Farm**, v. 93, n. 1, p. 60-7, 2012.

PETROBRAS. **Normas técnicas. Norma técnica N-2588.** Determinação da toxicidade aguda de agentes tóxicos em relação à *Artemia* sp. 1996.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical Biochemistry**, v. 269, p. 337-341, 1999.

QUINET, A. et al. *Lauraceae* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB143>>. Acesso em: 13 Ago. 2015.

RAKOTONDRAIBE, L. H. et al. Neolignans and Other Metabolites from *Ocotea cymosa* from the Madagascar Rain Forest and Their Biological Activities. **Journal of natural products**, v. 78, n. 3, p. 431-440, 2015.

RAMOS, C. et al. Antioxidant and antibacterial activity of essential oil and extracts of bay laurel *Laurus nobilis* Linnaeus (Lauraceae) from Portugal. **Natural product research**, v. 26, n. 6, p. 518-529, 2012.

RIBEIRO, R.A. et al. Nantenine block muscle contraction and Ca<sup>2+</sup> transient induced by noradrenaline and K<sup>+</sup> in rat vas deferens. **European Journal of Pharmacology**. n.470, p. 37-43, 2003.

ROGATTO, J. M. et al. Caracterização do potencial antimicrobiano de *ocotea odorifera* (vellozo) rohwer. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 12, n. 1, p. 886-894, 2014.

ROHWER, J. G. Lauraceae. In: Kubitzki, K.; Rohwer, J. G.; Bittrich, V. (Eds). **The families and genera of vascular plants**. Berlim: Springer-Verlag, v. 2, 1993. p. 366-391.

ROHWER, J. G. **Prodromus einer Monographie der Gattung *Ocotea* Aubl. (Lauraceae)**, sensu lato. 278p. Mitteilungen aus dem Institut für Allgemeine botanik Hamburg, 1986.

RUANGNOO, S. et al. An in vitro inhibitory effect on RAW 264.7 cells by anti-inflammatory compounds from *Smilax corbularia* Kunth. **Asian Pacific journal of allergy and immunology**, v. 30, p. 268-74, 2012.

RUIZ-REYES, E.; SUAREZ, M. Lactonas sesquiterpénicas. Diversidad estructural y sus actividades biológicas. Revista CENIC. **Ciencias Biológicas**, v. 46, n. 1, p. 9-24, 2015.

SAHPAZ, S. et al. Cytotoxic and antiparasitic activity from *Annona senegalensis* seeds. **Planta Medica**, v. 60, n. 06, p. 538-540, 1994.

SANTOS, M. H. et al. Influência do processamento e da torrefação sobre a atividade antioxidante do café (*Coffea arabica*). **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 604-610, 2007.

SANTOS, A. O. et al. Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 103, n. 3, p. 277-281, 2008.

SANTOS, M.; OLIVEIRA, P. L. Aspectos anatômicos do pecíolo de quatro espécies do gênero *Ocotea* Aubl. (Lauraceae) ocorrentes no Rio Grande do Sul. **INSULA Revista de Botânica**, v. 24, p. 03, 1995.

SASS, J. E. **Botanical microtechnique**. 2 ed. Ames: Iowa State College, 1951.

SILVA, M.I.G. et al. Utilização de fitoterápicos nas unidades básicas de atenção à saúde da família no município de Maracanaú (CE). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n.1, p.455-62, 2006.

SILVA, W.D.; BRAZ-FILHO, R.; GOTTLIEB, O. R. Bicyclooctanoid neolignans from *Ocotea costulatum*. **Phytochemistry**, v. 28, n. 2, p. 661-662, 1989.

SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Santa Catarina: Editora UFSC, 2000.

SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6 ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. UFRGS/ Ed. UFSC; 2007.

SINGER, O. **Camomila**. Monografia. Curso de Especialização em Ciências Farmacêuticas. UFPR, 50p, 2005.

SIQUEIRA, J. M. D. et al. Estudo fitoquímico de *Unonopsis lindmanni* - Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade frente a *Artemia salina* Leach. **Química Nova**, v. 21, n. 5, p. 557-559, 1998.

SKALTSA, H. D. et al. Essential oil analysis and antimicrobial activity of eight *Stachys* species from Greece. **Phytochemistry**, v. 64, n. 3, p. 743-752, 2003.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.

SOLÓRZANO-SANTOS, F.; MIRANDA-NOVALES, M. G. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. **Current Opinion in Biotechnology**, v.23, p.1 - 6, 2011.

SOUZA, G. C. et al. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 90, n. 1, p. 135-143, 2004.

STADEN, R. The Staden sequence analysis package. **Molecular Biotechnology**, v. 5, p.233-241, 1996.

STUESSY, E. **Plant taxonomy. The evolution of comparative data**. New York: Columbia University Press, 1991.

SUBHAN, N. et al. Bioactivity of *Excoecaria agallocha*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.4, p.521- 526, 2008.

SYLVESTRE, M. et al. Essential oil analysis and anticancer activity of leaf essential oil of *Croton flavens* L. from Guadeloupe. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, n. 1, p. 99-102, 2006.

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

TAO, L. et al. Elemene displays anti-cancer ability of laryngeal cancer cells in vitro and in vivo. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v.58, p. 24-34, 2006.

TROMBETTA, D. et al. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.49, n.6, p.2474-2478, jun. 2005.

TROPICOS.ORG. Missouri Botanical Garden. Disponível em:  
<http://www.tropicos.org/Name/17803051> Acesso: 07/01/2016.

VALENTE, L. M. M et al. Desenvolvimento e aplicação de metodologia por cromatografia em camada delgada para determinação do perfil de alcaloides oxindólicos pentacíclicos nas espécies sul-americanas do gênero *Uncaria*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 16, n. 2, p. 216-223, 2006.

VAN DER WERFF, H. A key to the genera of Lauraceae in the new world. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 78, p. 377-387, 1991.

VAN DER WERFF, H.; RITCHER, H. G. Toward and improved classification of Lauraceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 83, p. 409-418, 1996.

VATTIMO-GIL, I. de. O gênero *Ocotea* Aubl. no sul do Brasil I. Espécies de Santa Catarina e do Paraná. **Rodriguésia**, v. 18, n. 19, p. 30-31, 1956.

VATTIMO-GIL, I. de. O gênero *Ocotea* Aubl. nos Estados de São Paulo e Rio Grande do Sul. Apêndice: notas sobre o gênero *Cinnamomum* Boehm, no Brasil. **Arquivos do Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, v. 17, p. 199-226, 1962.

VEIGA JUNIOR, V.F.; PINTO, A.C. O gênero *Copaifera* L. **Química Nova**. v.25, n.2, p.273-86, mar./abr. 2002.

VEIGA JUNIOR, V.F.; PINTO, A.C.; MACIEL, M.A.M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, n.3, p.519-528, 2005.

VEIGA, L. F.; VITAL, N. Teste de toxicidade aguda com o microcrustáceo *Artemia* sp. In: I. A. Nascimento, E. C. P. M., Sousa & M. Nipper (ed.), Métodos em ecotoxicologia marinha. Aplicações no Brasil. Artes Gráficas e Indústria, São Paulo, p.111-122, 2002.

- VILLAMIZAR, V. E. M. Metabolitos secundarios con actividad biológica (farmacológica), aplicación etnobotánica; y fotoquímica de algunas especies de los géneros: *cryptocarya*, *litsea*, *caryodaphnopsis*, *machilus* y *actinodaphne* (Lauraceae). **Duazary**, v. 7, n. 1, p. 152-170, 2010.
- WAGNER, H.; **Plant Drugs analysis**. 2 ed. Berlin: Springer, p. 298-299 e 319-319, 1996.
- WANG, D. et al. The Effects of Astilbin on Cognitive Impairments in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease. **Cellular and Molecular Neurobiology**, p. 1-12, 2016.
- WANG, G. et al. Antitumor effect of  $\beta$ -elemene in non-small-cell lung cancer cells is mediated via induction of cell cycle arrest and apoptotic cell death. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.62, p.881-893, 2005.
- WASICKY, R. Uma modificação do aparelho de clevenger para extração de óleos essenciais. **Revista da Faculdade de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo**, v.1, n.1, p. 1-112, 1963.
- WIRASATHIEN, L. et al. Inhibitors of aldose reductase and advanced glycation end-products formation from the leaves of *Stelechocarpus cauliflorus* R.E. Fr. **Phytomedicine**, v.14, 546–550, 2007.
- WRIGHT, B. S. et al. Cytotoxic leaf essential oils from neotropical lauraceae: synergistic effects of essential oil components. **Natural Product Communications**, v. 2, n. 12, p. 1241-1244, 2007.
- XU, W. A. et al. Study on the correlation between constituents detected in serum from *Rhizoma Smilacis Glabrae* and the reduction of uric acid levels in hyperuricemia. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 150, p. 747–754, 2013.
- YAMAGUCHI, K. K. L. **Estudos biológicos dos extratos e composição química dos óleos essenciais de espécies da família Lauraceae**. 161 f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2011.
- YAMAGUCHI, K. K. L. et al. Antioxidant and anticholinesterasic effects of 20 species of the family Lauraceae. **Acta Amazonica**, v. 42, n. 4, p. 541-546, 2012.
- YAO, Y., et al. Anti-tumor effect of  $\beta$ -elemene in glioblastoma cells depends on p38 MAPK activation. **Cancer Letters**, v. 264, n. 1, p. 127-134, 2008.
- ZANI, C.L., et al. Brine shrimp lethality assay as a prescreening system for anti-*Trypanosoma cruzi* activity. **Phytomedicine**, v.2, p.47-50, 1995.
- ZANIN, S. M. W.; LORDELLO, A. L. L. Alcaloides aporfinoídeos do gênero *Ocotea* (Lauraceae). **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 92, 2007.

ZANIN, S. M. W., et al. Mudras de *Ocotea puberula* (LAURACEAE): identificação e monitoramento de alcaloides aporfínicos. **Química Nova**, v. 34, n. 5, p. 743-747, 2011.

ZHAO, J., et al. *In vitro* combination characterization of the new anticancer plant drug beta-elemene with taxanes against human lung carcinoma. **International Journal of Oncology**, v. 31, n. 2, p. 241-252, 2007.

ZOU, S. et al. Astilbin Suppresses Acute Heart Allograft Rejection by Inhibiting Maturation and Function of Dendritic Cells in Mice. **Transplantation Proceedings**, v. 42, p. 3798–3802, 2010.

ZSCHOCKE, S. et al. Stereostructure and anti-inflammatory activity of three diastereomers of ocobullenone from *Ocotea bullata*. **Phytochemistry**, v. 54, p. 591-595, 2000.

ZUANAZZI, J. A. S. Flavonoides. In: SIMÕES, C. M. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 4 ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2001. CAP. 23, P. 489-516.

## ANEXO 1 - AUTORIZAÇÃO DAS ATIVIDADES DE ACESSO AO PATRIMÔNIO GENÉTICO



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE  
INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS

### AUTORIZAÇÃO DAS ATIVIDADES DE ACESSO AO PATRIMÔNIO GENÉTICO REALIZADA DE ACORDO COM A RESOLUÇÃO CGEN Nº35, DE 27 DE ABRIL DE 2011 Nº 03/2014

O INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS, credenciado pelo Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN/MMA), por meio da Deliberação CGEN nº 40, de 24 de setembro de 2003, para autorizar instituição nacional, pública ou privada, que exerça atividade de pesquisa e desenvolvimento nas áreas biológicas e afins, a acessar amostras de componente do patrimônio genético para fins de pesquisa científica sem potencial de uso econômico, **autoriza** com amparo na Resolução CGEN nº 35, de 27 de abril de 2011, que dispõe sobre regularização de atividades de acesso ao patrimônio genético e/ou ao conhecimento tradicional associado e sua exploração econômica realizadas em desacordo com a Medida Provisória no 2.186-16, de 23 de agosto de 2001 e demais normas, **as atividades de acesso ao patrimônio genético desenvolvidas pela:**

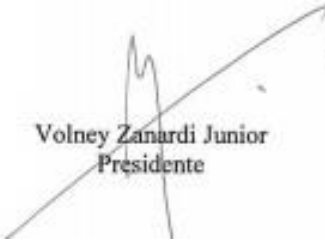
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**, CNPJ/MF nº. 75.095.679/0001-49, situada na Rua XV de Novembro, 1299, Curitiba-PR, CEP: 80060-000, e representada na pessoa do Reitor Zaki Akel Sobrinho, RG nº. 1.439.536-9 SSP/PR, CPF nº. 359.063.759-53, no âmbito das atividades do projeto de pesquisa "*Estudo Químico e Biológico das Espécies Vegetais*".

**Objetivo da Autorização:** Avaliar sob aspecto morfoanatômico, químico e biológico das espécies acessadas constantes do projeto de pesquisa.

**Período das atividades: 2000 a 2019.**

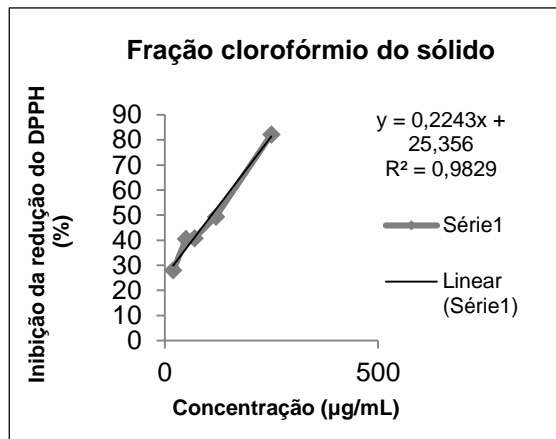
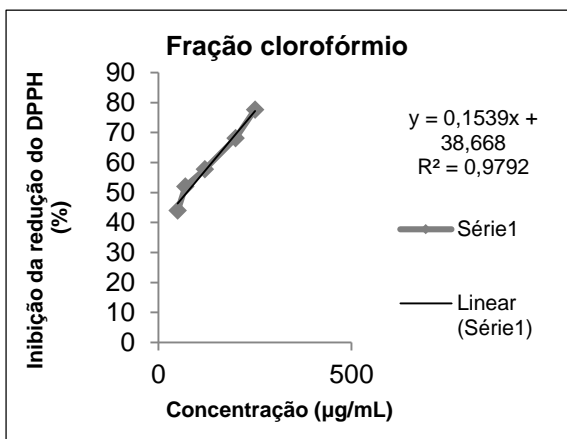
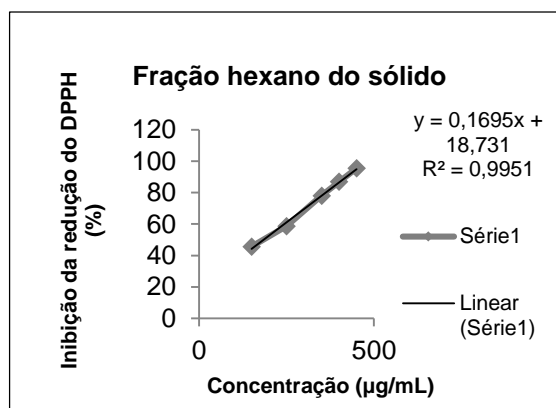
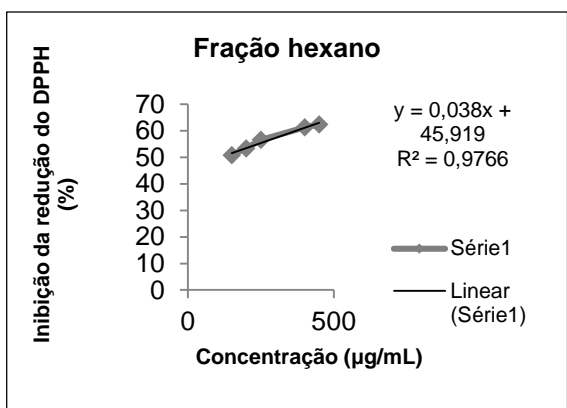
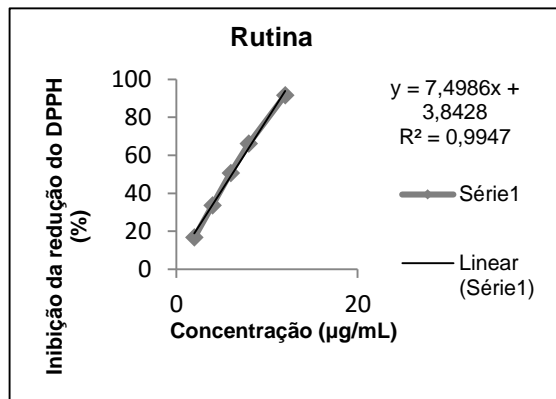
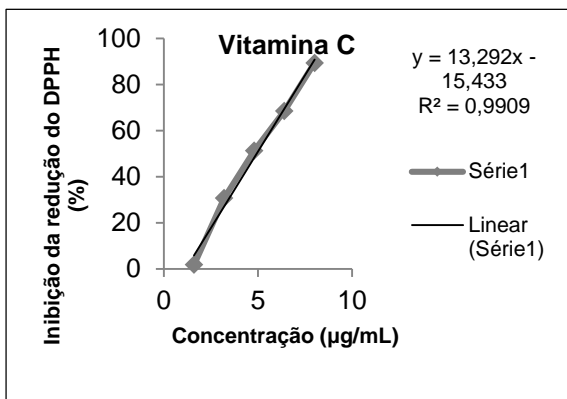
**Validade da Autorização:** Cinco anos, contados da assinatura. Em razão da continuidade do projeto de pesquisa, a instituição detentora desta autorização deverá enviar ao Ibama, a partir da emissão da licença, **relatório anual** sobre a execução das atividades de pesquisa, nos termos do Decreto nº 4.946/2003 e Resolução CGEN nº 41/2013. Endereço para envio do relatório: IBAMA/DBFLO, SCEN L4 Norte, Bloco B, Brasília-DF, CEP: 70818-900.

Esta autorização das atividades de acesso está vinculada às informações e termos assinados pelo requerente, constantes do processo nº **02001.001165/2013-47**.

  
Volney Zanardi Junior  
Presidente

Brasília, 17 de março de 2014.

**ANEXO 2 - CURVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS PADRÕES, EXTRATO, FRAÇÕES E ÓLEO ESSENCIAL DE *Ocotea bicolor* PELA REDUÇÃO DO DPPH**



## ANEXO 2 - CURVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS PADRÕES, EXTRATO, FRAÇÕES E ÓLEO ESSENCIAL DE *Ocotea bicolor* PELA REDUÇÃO DO DPPH

