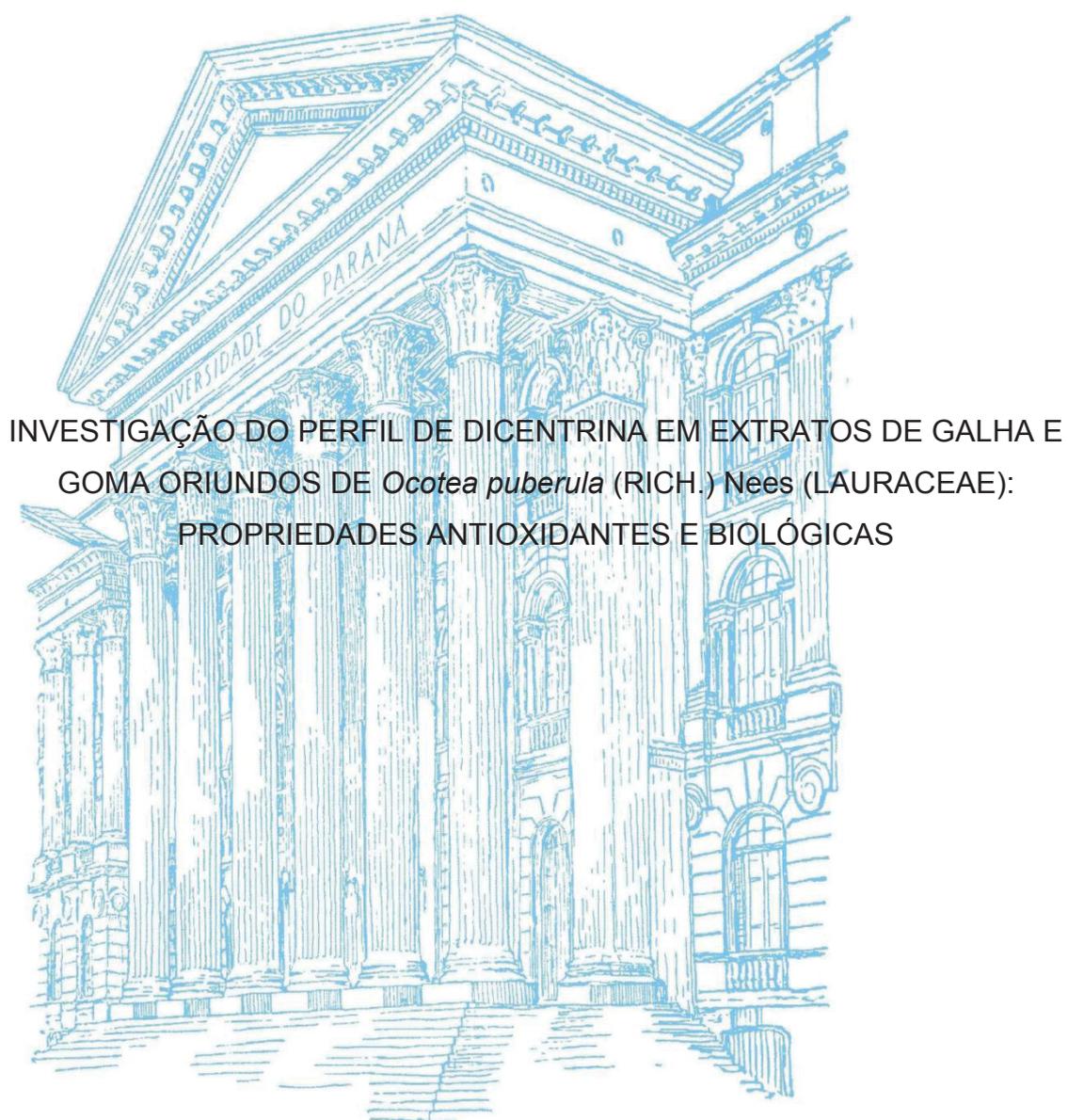


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANA ANGÉLICA RUSCHEWEYH RIGONI



CURITIBA

2019

ANA ANGÉLICA RUSCHEWEYH RIGONI

INVESTIGAÇÃO DO PERFIL DE DICENTRINA EM EXTRATOS DE GALHA E
GOMA ORIUNDOS DE *Ocotea puberula* (RICH.) Nees (LAURACEAE):
PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES E BIOLÓGICAS

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

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Sandra Maria Warumby Zanin
Coorientadoras: Prof.^a Dr.^a Josiane de Fátima Gaspari Dias
Prof.^a Dr.^a Deise Prehs Montrucchio

CURITIBA

2019

Rigoni, Ana Angélica Ruscheweyh

Investigação do perfil de dicentrina em extratos de galha e goma oriundos de *Ocotea puberula* (RICH.) Nees (Lauraceae) [recurso eletrônico] : propriedades antioxidantes e biológicas / Ana Angélica Ruscheweyh Rigoni – Curitiba, 2019.

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacéuticas. Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2019.

Orientadora: Professora Dra. Sandra Maria Warumby Zanin

Coorientadora: Professora Dra. Josiane de Fátima Gaspari Dias

Coorientadora: Professora Dra. Deise Prehs Montrucchio

1. Alcaloide. 2. Dicentrina. 3. Toxicidade. 4. Alelopatia. 5. Hemólise. I. Zanin, Sandra Maria Warumby. II. Dias, Josiane de Fátima Gaspari. III. Montrucchio, Deise Prehs. IV. Universidade Federal do Paraná. V. Título.

CDD 583.931

Maria da Conceição Kury da Silva CRB 9/1275



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
FARMACÉUTICAS - 40001016042P8

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÉUTICAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **ANA ANGÉLICA RUSCHEWEYH RIGONI** intitulada: **INVESTIGAÇÃO DO PERFIL DE DICENTRINA EM EXTRATOS DE GALHA E GOMA ORIUNDOS DE *Ocotea puberula* (RICH.) Nees (LAURACEAE): PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES E BIOLÓGICAS**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 08 de Março de 2019.


SANDRA MARIA WARUMBY ZANIN
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)


MARILYS DALARMI MIGUEL
Avaliador Interno (UFPR)


BEATRIZ CRISTINA KONOPATZKI HIROTA
Avaliador Externo (UFPR)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo amor que me sustenta.

Ao meu amor Harlen por todo o suporte, incentivo, força e carinho. Por sempre se preocupar com meu conforto e saúde física e mental.

Aos meus pais Hilton e Valquíria por lutarem por uma educação digna para mim e meus irmãos, por abdicarem de seus sonhos para eu realizar os meus e por toda a oração. À minha vó Candida que me ensinou a ser forte e sempre continuar independente do que aconteça.

Aos melhores irmãos que alguém poderia ter Érica, Atilio, Amanda, Aurélio e Ayme. Vocês são fundamentais em todas as minhas conquistas. Ao meu cunhado Márcio pelo apoio e socorro em momentos difíceis.

Aos meus sogros Wilson e Lizete pelo apoio e incentivo.

Aos melhores presentes que ganhei no mestrado Caroline e Paula, obrigada por me acolherem, ensinarem e por todas as conversas felizes. À minha amiga e companheira de mestrado Rosi por caminhar ao meu lado e me incentivar em todos os momentos.

Às amigas Mirna e Larissa por todos os conselhos, ajuda e apoio em momentos difíceis.

Aos amigos de estudos Maika, Cíntia e Neto pelo apoio e incentivo.

Aos meus amigos de trabalho Tamires, Rose, Ira, Francielle, Raquel, Akemi e Zé pelo apoio e por todas as trocas de plantões para eu comparecer nas aulas e práticas do mestrado. Em especial ao meu amigo Andreus pelo carinho e companheirismo.

Ao grupo Fleury e ao coordenador Eduardo, que me permitiram todas as trocas de plantões para a realização deste trabalho, incentivando meu crescimento profissional.

À querida Gracinha, pela ajuda com os equipamentos da Central Analítica e apoio nos momentos difíceis.

Ao auxílio da doutoranda Camila Freitas de Oliveira com as análises de RMN.

Ao departamento de química da UFPR, pela realização da análise de Difratoimetria de raio X de monocristal (Francielli Santana).

Ao Grupo de Pesquisa de Produtos Naturais, professores Obdulio e Marilis, ao técnico Paulo e alunos de mestrado e doutorado, pela amizade, compartilhamento de conhecimentos, contribuições científicas.

Ao Engenheiro Florestal do Museu Botânico Municipal, Marcelo Leandro Brotto, pela identificação do material botânico.

À Profa. Dra. Josiane de Fátima Gaspari Dias pela coorientação, pelas conversas e trocas de experiências, pelo tempo dedicado as correções, por acreditar e confiar em mim. À Profa. Dra. Deise Montrucchio pela coorientação e apoio com material de pesquisa.

À Profa. Dra. Sandra Zanin pela oportunidade de orientação, pelos ensinamentos, apoio e intermináveis correções.

Ao Sr. Pedro Zanin por todo o suporte e apoio em todo o processo deste trabalho.

À CAPES, pelo auxílio financeiro.

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

“ Se não puder voar, corra. Se não puder correr, ande. Se não puder andar, rasteje,
mas continue em frente de qualquer jeito. ”

Martin Luther King Junior

RESUMO

A família Lauraceae e o gênero *Ocotea* são conhecidos por suas propriedades biológicas e farmacológicas. O estudo de galhas de *Ocotea puberula* (RICH.) Nees, contribui com a pesquisa de metabólitos secundários para atividades aplicadas às ciências farmacêuticas, agrônômicas e química. A espécie é uma planta heliófita. O objetivo deste trabalho foi realizar o estudo do perfil alcaloídico e avaliar as propriedades antioxidantes e atividades biológicas, nas galhas dos frutos da espécie. A partir da maceração em álcool deu-se origem a fração extrato bruto que foi submetido a precipitação à frio com propósito de separar a goma, gerando posteriormente o extrato sem goma e extrato goma. Os extratos foram submetidos à análise do perfil metabólico por CCD e se obteve resultados positivos para esteroides e triterpenos, compostos fenólicos e alcaloides. Para dosagem da dicentrina foram realizadas extrações alcaloídicas no extrato bruto, extrato sem goma, extrato goma, galhas, frutos e folhas normais. A fração com a maior quantificação de dicentrina foi a goma seguida de extrato bruto e extrato sem goma. A partir da fração goma obteve-se um precipitado que foi isolado e identificado como dicentrina. O extrato bruto, extrato sem goma, extrato goma foram submetidos aos testes antioxidantes por redução do complexo fosfomolibdenio e redução do radical DPPH•. No teste de DPPH• a fração goma apresentou IC₅₀ (10,39 µg/mL) e o extrato bruto IC₅₀ (11,39 µg/mL) estatisticamente iguais aos padrões BHT e rutina. O extrato bruto, extrato sem goma e goma apresentaram alto teor de compostos fenólicos. No ensaio de toxicidade *in vitro* frente à *Artemia salina* o isolado dicentrina foi considerado moderadamente tóxico. Na alelopatia, houve inibição do crescimento do hipocótilo no extrato bruto que inibiu nas concentrações 500, 750, e 1000 µg/mL. No extrato sem goma, extrato goma e dicentrina inibiram o crescimento do hipocótilo nas concentrações de 250 até 1000 µg/mL. Na radícula houve inibição na fração goma nas concentrações 500 e 750 µg/mL, no extrato bruto 500, 750 e 1000 µg/mL, dicentrina 750 e 1000 µg/mL e extrato sem goma 250 até 1000 µg/mL. Obteve-se atividade hemolítica na faixa de 30% a 50% na concentração de 100 µg/mL da fração goma. Considerando a presença do constituinte dicentrina, as propriedades tóxicas e alelopática demonstradas pelos extratos, estudos de aplicações diversas podem ser aprofundados e direcionando novos estudos científicos.

Palavras-chaves: Alcaloide. Dicentrina. Toxicidade. Alelopatia. Hemólise.

ABSTRACT

The Lauraceae family and the genus *Ocotea* are known for their biological and pharmacological properties. The Gallblot Study of *Ocotea puberula* (RICH.) Nees, contributes to the research of secondary metabolites for activities applied to the pharmaceutical, agronomic and chemical sciences. The species is a heliophyta plant. The objective of this work was to study the alkaloid profile and to evaluate the antioxidant properties and biological activities in the gall of fruits of the species. From the maceration in alcohol gave rise to the fraction crude extract that was subjected to cold precipitation with the purpose of separating the gum, later generating the extract without gum and extract gum. The extracts were submitted to the analysis of the metabolic profile by CCD and positive results were obtained for steroids and triterpenes, phenolic compounds and alkaloids. For the dosage of dicentrin, alkaloid extractions were performed in the crude extract, extract without gum, extract gum, galls, fruits and normal leaves. The fraction with the highest quantification of dicentrin was to the gum followed by crude extract and extract without gum. From the gum fraction a precipitate was obtained which was isolated and identified as dicentrin. The crude extract, gumless extract, gum extract were submitted to the antioxidant tests by reduction of the phosphomolibdenum complex and reduction of the radical DPPH. In the DPPH test, the gum fraction had IC₅₀ (10.39 µg / mL) and crude extract IC₅₀ (11.39 µg / mL) statistically equal to the BHT and routine standards. The crude extract, extract without gum and gum presented high content of phenolic compounds. In the in vitro toxicity test against *Artemia salina* the isolated dicentrin was considered moderately toxic. In allelopathy, hypocotyl growth inhibition was inhibited in the crude extract which inhibited the concentrations at 500, 750, and 1000 µg / mL. In the extract without gum, extract gum and dicentrin inhibited the growth of hypocotyl in the concentrations of 250 to 1000 µg / mL. In the radicle there was inhibition in the 500 and 750 µg / mL concentrations in the crude extract 500, 750 and 1000 µg / mL, dicentrin 750 and 1000 µg / mL and the extract without gum 250 to 1000 µg / mL. Hemolytic activity was obtained in the range of 30% to 50% in the concentration of 100 µg / mL of the gum fraction. Considering the presence of the constituent dicentrin, the toxic and allelopathic properties demonstrated by the extracts, studies of several applications can without in depth and directing new scientific studies.

Key-words: Alkaloid. Dicentrin. Toxicity. Allelopathy. Hemolysis.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	–	ESQUELETO DE ALCALOIDES APORFINICOS <i>STRICTO SENSU</i>	29
FIGURA 2	–	ESQUEMA RESUMIDO DA BIOSÍNTESE DE ALCALOIDES APORFÍNICOS.....	34
FIGURA 3	–	ESTADOS BRASILEIROS COM OCORRÊNCIA DA ESPÉCIE <i>Ocotea puberula</i> (RICH) Ness.....	35
FIGURA 4	–	<i>Ocotea puberula</i>	37
FIGURA 5	–	PORÇÃO DO HYMENIUM COM BASIDIA EM DIFERENTES ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO DO FUNGO <i>Botryconis pallida</i>	41
FIGURA 6	–	FOTO DO FRUTO COM CRESCIMENTO NORMAL E FRUTO COM CRESCIMENTO DIFERENCIADO (GALHA).....	43
FIGURA 7	–	FLUXOGRAMA DE ATIVIDADES DESENVOLVIDAS NO TRABALHO.....	49
FIGURA 8	–	DISPOSIÇÃO DAS SEMENTES DE <i>Lactuca sativa</i> variedade <i>Grand rapids</i> NAS CAIXAS GERBOX.....	64
FIGURA 9	–	SOBREPOSIÇÃO ESPECTRAL DAS GALHAS, EXTRATO GOMA, EXTRATO BRUTO, FOLHAS E FRUTOS NORMAIS.....	72
FIGURA 10	–	CROMATOGRAMA PADRÃO DICENTRINA, GALHAS, EXTRATO GOMA, EXTRATO BRUTO, EXTRATO BRUTO SEM GOMA, FOLHAS E FRUTOS NORMAIS.....	74
FIGURA 11	–	ESTRUTURA DA DICENTRINA OBTIDA POR RMN (A) E POR DIFRATOMETRIA DE RAIO X (B).....	78
FIGURA 12	–	EXTRUTURA MOLECULAR DA DICENTRINA	80
FIGURA 13	–	EXPECTRO DE RMN ¹ H DA DICENTRINA. ANÁLISE REALIZADA EM (DMSO DE TMS 400 MHz, 30°C).....	80
FIGURA 14	–	EXPECTRO DE RMN ¹³ C DA DICENTRINA. ANÁLISE REALIZADA EM (DMSO DE TMS 400 MHz, 30°C).....	81

FIGURA 15	– ESPECTRO DE HSQC DICENTRINA (DMSO DE TMS 400 MHz, 30°C).....	81
FIGURA 16	– ESPECTRO DE HMQC DICENTRINA (DMSO DE TMS 400 MHz, 30°C).....	82
FIGURA 17	– CAPACIDADE DE REDUÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO DAS AMOSTRAS COMPARADAS A RUTINA, BHT E VITAMINA C.....	83

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	–	RELAÇÃO DOS ALCALOIDES APORFONÓIDES IDENTIFICADOS EM ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Ocotea</i>	30
TABELA 2	–	RESULTADOS DAS EXTRAÇÕES ALCALOÍDICAS POR SOLVENTE EM MEIO ÁCIDO.....	67
TABELA 3	–	RESULTADOS DAS EXTRAÇÕES ALCALOÍDICAS POR SOLVENTE EM MEIO ALCALINO	69
TABELA 4	–	RESULTADO PARA EXTRATO ALCALOÍDICO BRUTO DAS AMOSTRAS.....	69
TABELA 5	–	DOSEAMENTO DA DICENTRINA NOS EXTRATOS ALCALOÍDICOS BRUTOS.....	71
TABELA 6	–	CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA PARA A PESQUISA DE METABOLITOS NOS EXTRATO BRUTO, EXTRATO SEM GOMA, EXTRATO GOMA E PRECIPITADO DO EXTRATO ALCALOÍDICO.....	76
TABELA 7	–	PARÂMETROS DE CÉLULA UNITÁRIA UTILIZADOS NA IDENTIFICAÇÃO DA ESTRUTURA CRISTALINA	77
TABELA 8	–	COMPARAÇÃO DOS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE RMN DE ¹ H E DE ¹³ C DA DICENTRINA.....	79
TABELA 9	–	RESULTADOS OBTIDOS NA AVALIAÇÃO DA REDUÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO DAS AMOSTRAS FRENTE À RUTINA, BHT E ÁCIDO ASCÓRBICO.....	82
TABELA 10	–	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELA REDUÇÃO DO RADICAL DPPH• DO EXTRATO BRUTO, EXTRATO SEM GOMA, EXTRATO GOMA, PRECIPITADO DO EXTRATO ALCALOÍDICO E PADRÕES.....	85
TABELA 11	–	TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS (EQUIVALENTE EM ÁCIDO GÁLICO – EAG) DO EXTRATO BRUTO, EXTRATO SEM GOMA, EXTRATO GOMA, PRECIPITADO DO EXTRATO ALCALOÍDICO.....	87
TABELA 12	–	RESULTADOS OBTIDOS NA AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE FRENTE AO EXTRATO BRUTO, EXTRATO SEM GOMA,	

	EXTRATO GOMA E PRECIPITADO DO EXTRATO ALCALOÍDICO.....	88
TABELA 13	– AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA DO EXTRATO BRUTO, EXTRATO SEM GOMA, EXTRATO GOMA E PRECIPITADO DO EXTRATO ALCALOÍDICO FRENTE AO TRITON 1 %.....	90
TABELA 14	– AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA DO EXTRATO BRUTO, EXTRATO SEM GOMA, EXTRATO GOMA E PRECIPITADO DO EXTRATO ALCALOÍDICO FRENTE À ÁGUA.....	91
TABELA 15	– RESULTADOS DE GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE <i>Lactuca sativa</i> cv. Grand Rapids TRATADAS COM CONTROLES E AMOSTRAS PROVENIENTE DE <i>Ocotea puberula</i> (RICH.) Nees.....	94

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1	–	RELAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS/FARMACOLÓGICAS REALIZADAS COM PLANTAS DO GÊNERO <i>Ocotea</i>	25
QUADRO 2	–	ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO DA ESPÉCIE <i>Ocotea Puberula</i> (RICH.) Nees.....	35
QUADRO 3	–	COMPOSIÇÃO DE FASES MÓVEIS E REVELADORES DA CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA.....	53
QUADRO 4	–	MÉTODO POR GRADIENTE EMPREGADO NAS ANÁLISES DE CLAE/DAD TEMPO (minutos) FASE A: FASE ÁCIDA FASE B: METANOL FLUXO DE INJEÇÃO.....	54
QUADRO 5	–	CONCENTRAÇÕES DOS CONTROLES POSITIVOS E AMOSTRAS TESTADAS NO ENSAIO DE REDUÇÃO DO RADICAL DPPH•.....	57
QUADRO 6	–	REAGENTES UTILIZADOS NO ENSAIO DE DETERMINAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS.....	59
QUADRO 7	–	REAÇÃO REALIZADA NA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA.....	62

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1	– CURVA DE LINEARIDADE DA DICENTRINA.....	70
GRÁFICO 2	– CURVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS PADRÕES PELA REDUÇÃO DO DPPH•.....	84
GRÁFICO 3	– CURVA DA PORCENTAGEM DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATO BRUTO, EXTRATO SEM GOMA, EXTRATO GOMA E PRECIPITADO DO EXTRATO ALCALOÍDICO PELA REDUCAO DO DPPH•.....	85
GRÁFICO 4	– CAPACIDADE HEMOLÍTICA DAS AMOSTRAS COMPARADAS AO TRITON 1%.....	92
GRÁFICO 5	– CAPACIDADE HEMOLÍTICA DAS AMOSTRAS COMPARADAS À ÁGUA.....	93
GRÁFICO 6	– INFLUÊNCIA DE AMOSTRAS PROVINIENTES DE <i>Ocotea puberula</i> (RICH.) Nees.QUE APRESENTARAM ATIVIDADE NO CRESCIMENTO DO HIPOCÓTILO DE <i>Lactuca sativa</i> cv. Grand Rapids.....	95
GRÁFICO 7	– INFLUÊNCIA DE AMOSTRAS PROVINIENTES DE <i>Ocotea puberula</i> (RICH.) Nees.QUE APRESENTARAM ATIVIDADE NO CRESCIMENTO DA RADÍCULA DE <i>Lactuca sativa</i> cv. Grand Rapids.....	95

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AA	-	Atividade antioxidante
AAR	-	Atividade antioxidante relativa
Abs	-	Absorbância
AG	-	Ácido gálico
AH	-	Atividade hemolítica
BHT	-	Hidroxitolueno butilado
CCD	-	Cromatografia em Camada Delgada
CGEN	-	Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
CL ₅₀	-	Concentração letal 50%
CLAE	-	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DPPH•	-	2,2-difenil-1-picrilhidrazila
EB	-	Extrato bruto
EBSG	-	Extrato bruto sem goma
PEA	-	precipitado do extrato alcaloídico
g	-	Gramas
HC ₅₀	-	Concentração hemolítica 50%
IC ₅₀	-	Concentração inibitória 50%
IBAMA	-	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
INPI	-	Instituto Nacional da Propriedade Industrial
IVG	-	Índice de Velocidade de Germinação
mg	-	Miligramas
mL	-	Mililitros
m/m	-	Massa/ Massa
m/v	-	Massa/ Volume
n°	-	Número
N	-	Normal
ORTEP	-	Oak Ridge Thermal Ellipsoid Plot
PBS	-	Phosphate-buffered saline
pH	-	Potencial hidrogeniônico
RMN	-	Ressonância Magnética Nuclear

- UV - Ultravioleta
- v/v - Volume/ Volume
- % - Porcentagem

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 OBJETIVO GERAL	22
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
2 REVISÃO DE LITERATURA	24
2.1 FAMÍLIA LAURACEAE	24
2.2 GÊNERO <i>Ocotea</i>	24
3.0 METABOLISMO SECUNDÁRIO	26
3.1 COMPOSTOS NITROGENADOS NAS PLANTAS	27
3.1.1 Alcaloides	28
3.1.2 Alcaloides aporfínicos	28
3.1.3 Alcaloides aporfínicos identificados em espécies do gênero <i>ocotea</i>	29
3.1.4 Rota biossintética dos alcaloides aporfinóides	33
4.0 ESPÉCIE <i>Ocotea puberula</i> (RICH.) Nees	34
4.1 ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO	34
4.1.1 Ocorrência natural	35
4.1.2 Nomes populares	36
4.1.3 Características morfológicas e utilidades	36
4.1.4 Usos na medicina popular	38
4.1.5 Usos comprovados por testes clínicos	38
4.1.6 Constituintes alcaloídicos presentes em <i>ocotea puberula</i>	38
4.1.7 Principais pragas, doenças e espécies afins	39
4.2 DOENÇAS DE PLANTAS	39
4.2.1 Caracterização do fungo <i>Botryconis pallida</i>	40
4.2.2 Doenças de plantas causada por fungos	41
4.2.3 Galhas	42
4.3 POLISSACARÍDEOS (GOMAS)	44
4.4 MACERAÇÃO	45
4.4.1 Métodos de extração alcaloídica	46
4.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	46
4.6 ATIVIDADES BIOLÓGICAS	47
5 MATERIAL E MÉTODOS	48
5.1 MATERIAL UTILIZADO	48

5.2 MATERIAL BOTÂNICO.....	50
5.2.1 Material vegetal	50
5.2.2 Maceração.....	50
5.3 FRAÇÕES DA MACERAÇÃO DE GALHAS.....	50
5.3.1 Extrato bruto.....	50
5.3.2 Goma e extrato bruto sem goma.....	50
5.4 EXTRAÇÕES ALCALOIDICAS	51
5.4.1 Extração alcaloídica dos extratos bruto, sem goma, goma, folhas, galhas do fruto e frutos normais em meio ácido	51
5.4.2 Extração alcaloídica dos extratos bruto, sem goma, goma, folhas, galhas do fruto e frutos normais em meio alcalino.....	51
5.4.3 Pesquisa de alcaloides para monitoramento das extrações.....	51
5.5 Cromatografia em Camada Delgada.....	52
5.6 CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA	53
5.7 IDENTIFICAÇÕES DE ALCALOIDES.....	54
5.7.1 Difractometria de raios X de monocristal.....	54
5.7.2 Ressonância Magnética Nuclear.....	55
6.0 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	55
6.1.1 Redução do complexo fosfomolibdênio.....	56
6.1.2 Redução do radical do DPPH•	57
6.2 QUANTIFICAÇÃO DO CONTEÚDO TOTAL DE COMPOSTOS FENÓLICOS...58	
6.3 ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	59
6.3.1 Avaliação da toxicidade frente a <i>Artemia salina</i>	59
6.3.1.1 Atividade hemolítica <i>in vitro</i>	60
6.3.1.2 Preparo da solução tampão	60
6.3.1.3 Preparo do sangue.....	61
6.3.1.4 Preparo das amostras, padrão e controles positivos.....	61
6.3.1.5 Preparo das amostras, padrão e controles positivos.....	61
6.4 ATIVIDADE ALELOPÁTICA.....	63
7 RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
7.1 MATERIAL VEGETAL.....	65
7.1.1 Maceração.....	65
7.2 FRAÇÕES DA MACERAÇÃO DE GALHAS E FOLHAS E FRUTOS NORMAIS 65	
7.2.1 Extrato bruto.....	65
7.2.2 Goma e extrato bruto sem goma.....	66
7.3 EXTRAÇÕES ALCALÓIDICAS	66

7.3.1 Extração alcaloídica dos extratos bruto, sem goma, goma, folhas, galhas do fruto e frutos normais em meio ácido	66
7.3.2 Extração alcaloídica dos extratos bruto, sem goma, goma, folhas, galhas do fruto e frutos normais em meio alcalino.....	68
7.4 CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA	70
7.5 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA	76
7.6 IDENTIFICAÇÕES DE ALCALOIDES	76
7.6.1 Difractometria de raios X de monocristal.....	77
7.6.2 Ressonância Magnética Nuclear	78
7.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	82
7.7.1 Redução do complexo fosfomolibdênio.....	82
7.7.2 Redução do radical do DPPH•	84
7.8 QUANTIFICAÇÃO DO CONTEÚDO TOTAL DE COMPOSTOS FENÓLICOS...	87
7.9 ATIVIDADES BIOLÓGICAS	88
7.9.1 Avaliação da toxicidade frente a <i>Artemia salina</i>	88
7.9.2 Atividade hemolítica <i>in vitro</i>	89
7.9.3 Atividade alelopática	93
CONCLUSÃO	97
CONSIDERAÇÕES FINAIS	98
REFERÊNCIAS	99
ANEXO 1 – AUTORIZAÇÃO DE ACESSO AO PATRIMÔNIO GENÉTICO.....	113
ANEXO 2 – FOTOGRAFIA DA EXSICATA DE <i>Ocotea puberula</i> (RICH.) Nees, NÚMERO 309643	114
ANEXO 3 – FOTOGRAFIA DA EXSICATA DE <i>Ocotea puberula</i> (RICH.) Nees, NÚMERO 414487	115
ANEXO 4 – FOTOGRAFIA DA EXSICATA DE <i>Ocotea puberula</i> (RICH.) Nees, NÚMERO 414488	116
ANEXO 5 – FOTOGRAFIA DA EXSICATA DE <i>Ocotea puberula</i> (RICH.) Nees, NÚMERO 414489	117
ANEXO 6 – FOTOGRAFIA DA EXSICATA DE <i>Ocotea puberula</i> (RICH.) Nees, NÚMERO 414490	118

1 INTRODUÇÃO

Os organismos variam amplamente na sua capacidade de produzir e transformar substâncias essenciais ao seu desenvolvimento e sobrevivência. Estes processos considerados essenciais à vida são descritos de maneira geral como metabolismo primário e os componentes envolvidos de metabólitos primários. Fazem parte do metabolismo primário os polissacarídeos, açúcares, proteínas, lipídios e ácidos nucleicos. (DEWICK, 2002; VERPOORTE; MEMELINK, 2002).

Por sua vez, as plantas produzem e armazenam uma ampla variedade de substâncias em suas folhas, caules, raízes, flores e sementes, denominadas de metabólitos secundários. Estes produtos, embora não necessariamente essenciais para o organismo produtor, tem um papel importante na sobrevivência destas plantas em seu ecossistema. Uma característica importante de uma gama de metabólitos secundários é a sua distribuição relativamente restrita na natureza, que em alguns casos se limita a espécies ou subespécies únicas e são uma expressão de sua individualidade. Resultando em uma população de plantas naturais, que exibe uma quantidade grande de variações fenotípicas em seus metabólitos secundários. (BRENES-ARGUEDAS; COLEY, 2005; DEWICK, 2002; MALHEIROS; PERES, 2001).

Os metabólitos secundários por serem fatores de interação entre organismos, em sua maioria apresentam atividades biológicas interessantes. Algumas são facilmente percebidas, tais como defesa contra predadores, resistência contra pragas e doenças, atração de polinizadores, interação com microorganismos simbióticos, atrativos voláteis relacionados com a mesma ou outras espécies. (DEWICK, 2002; VERPOORTE et al., 2002). Muitos são de importância comercial tanto na área farmacêutica quanto nas áreas alimentar, agrônômica e de perfumaria, entre outras. (HARVEY, 2008).

Dentre os metabólitos secundários, os alcaloides, geralmente definidos como moléculas naturais contendo nitrogênio, independentemente do seu caráter básico, são abundantes nas plantas e representam uma das classes químicas de metabolitos além de apresentarem propriedades farmacológicas múltiplas e variadas. O termo "alcaloide" foi apresentado pela primeira vez pelo farmacêutico W. Meibner no século XIX, para conceituar metabolitos que foram isolados e

apresentavam características alcalina. Assim em sua primeira definição, os alcaloides tinham caráter básico, continham nitrogênio e eram obtidos de plantas. Posteriormente com o conhecimento da sua origem biogênica, os requisitos da sua forma heterociclo e serem derivados de aminoácidos foram acrescentados. (KLEIN-JÚNIOR; HENRIQUES, 2017). Atualmente, pode-se definir alcaloides como produtos biologicamente ativos, ou seja, de serventia ecológica, farmacológica ou mesmo medicinal, apresentando características básica, neutra ou ácida (alcaloides quaternários), quimicamente natural de estrutura heterocíclica, contendo um átomo de nitrogênio, derivado biosinteticamente de aminoácidos e encontrados em sua maioria em plantas, mas também estar presente em organismos marinhos, fungos e animais. (ANISZEWSKI, 2015; STÉVIGNY; BAILLY; QUETIN - LECLERCQ, 2005; KLEIN-JÚNIOR; HENRIQUES, 2017). Entre os alcaloides, os aporfinóides constituem um grande subgrupo de compostos benzilisoquinolínicos, com mais de 500 alcaloides isolados até o momento. Eles são amplamente distribuídos em um grande número de famílias de plantas incluindo Annonaceae, Lauraceae, Monimiaceae, Menispermaceae, Hernandiaceae, Ranunculaceae, apenas para citar algumas. (STÉVIGNY; BAILLY; QUETIN -LECLERCQ, 2005; JIA et al., 2000).

1.1 OBJETIVO GERAL

Avaliação do perfil alcaloídico e das atividades biológicas e antioxidante das frações obtidas da maceração de galhas de frutos de *Ocotea puberula* (RICH.) Nees

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar coleta dos frutos;
- Realizar maceração etanólica de galhas dos frutos;
- Obter frações apartir do processo de maceração;
- Obtenção dos extratos alcaloídicos das frações obtidas;
- Avaliar a atividade antioxidante das frações obtidas pelos métodos DPPH, Fosfomolibdenio e dosagem de compostos fenólicos;
- Avaliar as atividades biológicas das frações obtidas pelo método de artemia e hemólise;

- Avaliar atividade alelopática das frações obtidas pelos métodos de avaliação do crescimento de radícula e hipocótilo de *Lactuca sativa*;
- Identificação de alcaloides por métodos espectrocópicos, espectrométricos e RMN;
- Quantificação de alcaloides por HPLC;

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 FAMÍLIA LAURACEAE

A família Lauraceae é considerada importante na natureza, estima-se que indivíduos dessa família estejam divididos em 50 gêneros e aproximadamente 2500 a 3000 espécies. (CHADERBALI; WERFF; RENNER, 2001). Cerca de dois terços das espécies pertencem somente à 6 gêneros: *Ocotea* (+400), *Litsea* (+250), *Persea* (200), *Cinnamomum* (200), *Cryptocaria* (200) e *Beilschmiedia* (150). (CRONQUIST, 1981). Em relação à distribuição geográfica, encontram-se espécies de Lauraceae na África, Austrália, Ásia e América. (VAN DER WERFF; RICHTER, 1996). No Brasil estima-se 24 gêneros e 390 espécies (QUINET et al., 2006), contribuindo assim com cerca de 20% do total mundial dessas espécies. (SHEPHERD, 2000).

2.2 GÊNERO *Ocotea*

O gênero *Ocotea* tem despertado o interesse dos pesquisadores brasileiros devido a sua ampla distribuição no território nacional e ao fato de algumas de suas espécies serem muito apreciadas no comércio madeireiro devido ao alto valor de sua madeira. (RIZZINI; MORS, 1995; INOUE; RODERJAN; KUNIYOSHI, 1984). O gênero *Ocotea* possui o maior número de espécies medicinais, entre os gêneros pertencentes à família Lauraceae. (MARQUES; 2001). A importância econômica das espécies *Ocotea* se justifica à grande atividade biológica, que se atribui aos extratos, óleos essenciais (DA SILVA et al., 2017) e metabólitos secundários usualmente encontrados. (ZANIN; LORDELLO, 2011). É constituído por cerca de 400 espécies das quais aproximadamente 160 são encontradas no Brasil (ROHWER, 1993), sendo que no Paraná evidenciaram 31 espécies. (BROTTO; CERVI; SANTOS, 2013).

A espécie *Ocotea caudata* (Nees) Mez em seu primeiro estudo resultou no isolamento de dez alcaloides de isoquinolina, três flavonoides conhecidos, dois fenóis, um fitoesterol e um derivado de prolina. (ARCHILA; SUÁREZ, 2017). As *Ocoteas* apresentam estudos relacionados à toxicidade, em estudo recente de duas espécies do gênero, a *Ocotea duckei* e *Ocotea glomerata* demonstraram eficácia contra ácaros em método de fumigação. (MORAES; CAMARA; SILVA, 2017). Ainda

em estudos de atividade biológicas com o gênero, verificou-se a atividade larvicida contra o *Aedes aegypti* na espécie *Ocotea velloziana* com ação do isolado dicentrina. (GARCEZ et al., 2009). Podemos visualizar o potencial do gênero no QUADRO 1.

QUADRO 1 - RELAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS/FARMACOLÓGICAS REALIZADAS COM PLANTAS DO GÊNERO *Ocotea*

Espécie	Atividades farmacológicas e/ou biológicas	Referência
<i>Ocotea odorifera</i> (Vell.) Rohwer	Inseticida	Junior et al., 2010
	Alelopática	Carmo et al., 2007
<i>Ocotea macropylla</i> Kunth	Anti-inflamatória	Barrera; Suarez, 2011
	Fungicida	Prieto et al., 2010
<i>Ocotea acutifolia</i> (Nees) Mez	Anestésica	Silva et al., 2013
	Genotóxica	Guterres et al., 2013
	Citotóxica	Garcez et al., 2011
<i>Ocotea heterochorma</i> Mez & Sodiro	Tóxica	Cuca et al., 2009
<i>Ocotea suaveolens</i> (meissn.) Hassler	Antinociceptiva	Beirith et al., 1999
<i>Ocotea quixos</i> (Lam.) Kosterm.	Antibacteriana	Bruni et al., 2004
	Anti-inflamatória	Ballabeni et al., 2010
	Antiplaquetária e anti-trombótica	Ballabeni et al., 2007
<i>Ocotea duckei</i> Vattimo	Cardiovascular	Barbosa-Filho et al., 2008
	antileishmanial	Neto et al., 2007
<i>Ocotea longifolia</i> Kunth	Inseticida e fungicida	Prieto et al., 2010
<i>Ocotea puberula</i> (RICH.) Nees	Alelopática	Silva et al., 2006
	Antinociceptiva	Montrucchio et al., 2012
<i>Ocotea notata</i> (Nees & Mart.) Mez	Anti-herpética	Garrett et al., 2012
	Tóxica	Garrett et al., 2013
	Antimicrobiana	Garrett et al., 2007
<i>Ocotea leucoxylon</i> (Sw.) Laness.	Anticolinesterásica	Yamaguchi et al., 2012
<i>Ocotea diospyrifolia</i> (Meisn.) Mez	Antimicrobiana	Weber et al., 2018
<i>Ocotea silvestris</i> Vattimo-Gil	Antimicrobiana	Weber et al., 2018
<i>Ocotea bofo</i> Kunth	Antioxidante/antimicrobiana	Guerrini et al., 2006
<i>Ocotea lancifolia</i> (Schott) Mez	Antiprotozoária	Fournet et al., 2007
<i>Ocotea cymosa</i> Benth.	Inseticida	Rakotondraibe et al., 2015

FONTE : O autor (2018).

3.0 METABOLISMO SECUNDÁRIO

Por meio de distintos mecanismos metabólicos e pela ação de enzimas específicas ocorre o desenvolvimento dos organismos vegetais desde seu nascimento, desenvolvimento e reprodução, que em nível celular, agem com o fim de preservar e perpetuar essas plantas através da produção de energia na forma de trifosfato de adenosina (ATP), necessário à vida, resultante de conversões de compostos orgânicos através de reações oxidativas. (DEWICK, 2009). Metabolitos primários são aqueles provenientes do metabolismo primário, responsáveis pela realização das funções essenciais ao crescimento e desenvolvimento da planta, ou seja, ácidos nucleicos, aminoácidos, proteínas, açúcares, lipídeos, celulose. Esses metabolitos agrupam-se de acordo com o tipo de metabolismo dos quais são consequentes. (DEWICK, 2009; KREIS; MUNKERT; PÁDUA, 2017).

Similarmente, os metabolitos secundários são aqueles provenientes do metabolismo secundário variando de espécie para espécie e cuja produção, além de ser em menor concentração, depende de fatores ambientais como disponibilidade hídrica, altitude, temperatura, radiação ultravioleta, poluição atmosférica, ataques de patógenos entre outros. (GOBBO-NETO & LOPES, 2007). Geralmente apresentam baixo peso molecular, estrutura química complexa e atividades biológicas marcantes e, embora seja conhecido seu papel de defesa e polinização, ainda não se tem pleno conhecimento sobre seus benefícios às plantas. (BRAZ FILHO, 2009; DEWICK, 2009; BERG; LUBERT, 2008). A importância dos metabolitos secundários se dá não somente pelas atividades biológicas exercidas pelas plantas em resposta aos estímulos do meio ambiente, mas, principalmente em função da imensa atividade farmacológica que possuem. (PEREIRA; CARDOSO, 2012; BRAZ FILHO, 2010; KREIS; MUNKERT; PÁDUA, 2017). Esses metabolitos podem ser divididos em três grandes grupos quimicamente distintos: terpenos, compostos fenólicos e alcaloides. (GARCIA et al., 2010; KREIS; MUNKERT; PÁDUA, 2017). Dentre estas classes, os alcaloides e mais especificamente os alcaloides aporfínicos são os metabolitos de interesse do presente trabalho.

3.1 COMPOSTOS NITROGENADOS NAS PLANTAS

Uma grande variedade de metabólitos secundários de plantas possui nitrogênio em sua estrutura, como aminoácidos, amidas, ácidos nucleicos, nucleosídeos, nucleotídeos, proteínas, purinas, enzimas, vitaminas, hormônios e inclusos neste grupo os alcalóides, glicosídeos cianogênicos e glicosinolatos. (TAIZ; ZEIGER, 2002; PALLARDY, 2008).

Os compostos contendo nitrogênio (N), desempenham papéis essenciais nos processos bioquímicos e fisiológicos das plantas, sendo que as maiores concentrações de N estão em tecidos e órgãos com atividade fisiológica maior, onde as células são fisiologicamente mais ativas como nas folhas, no desenvolvimento de frutos e sementes e menores em tecidos inativos, como no cerne. (AGRIOS, 1997; SNOEIJERS, et al., 2000).

A quantidade de nitrogênio nas plantas é variável dependendo do tecido, da idade ou estágio de desenvolvimento e a estação. Nas plantas decíduas e perenes, a concentração de nitrogênio no tecido lenhoso tende a aumentar durante o outono e o inverno, diminui quando o crescimento começa e depois aumenta novamente, à medida que o crescimento diminui e cessa. (SNOEIJERS, et al., 2000).

O nitrogênio é adquirido pelas plantas do solo e da atmosfera. O nitrogênio do solo é geralmente absorvido como nitrato. O nitrato, que é a principal fonte de nitrogênio inorgânico disponível para as plantas, é convertido em amônia através de enzimas e incorporado na glutamina, glutamato, asparagina e aspartato, que são aminoácidos e sais de aminoácidos predominantes no transporte de nitrogênio nas plantas. Eles fornecem blocos de construção para a síntese de aminoácidos adicionais, clorofila e uma variedade de outros constituintes essenciais da planta. Uma grande parte do N nas folhas ocorre como enzimas nos cloroplastos e mitocôndrias das células, podendo conter mais de 40% da concentração total de N das plantas. (AGRIOS, 1997; SNOEIJERS, et al., 2000).

Altas concentrações de nitrogênio com frequência aumentam a suscetibilidade das plantas às doenças. Em geral, o nitrogênio é necessário para fornecer às plantas requisitos necessários para crescimento e para resistir ou recuperar lesões causadas por doenças. (AGRIOS, 1997; SNOEIJERS, et al., 2000).

3.1.1 Alcaloides

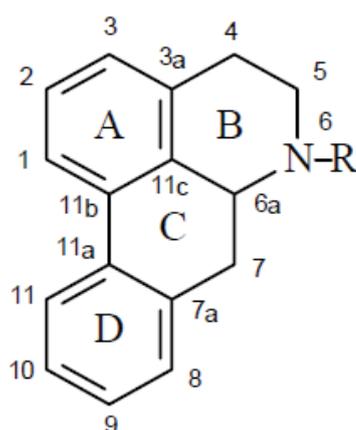
O termo "alcaloide" foi apresentado pela primeira vez pelo farmacêutico W. Meibner no século XIX, para conceituar metabolitos que foram isolados e apresentavam características alcalina. Assim em sua primeira definição, os alcaloides tinham caráter básico, continham nitrogênio e eram obtidos de plantas. Posteriormente com o conhecimento da sua origem biogênica, os requisitos da sua forma heterociclo e serem derivados de aminoácidos foram acrescentados. (KLEIN-JÚNIOR; HENRIQUES, 2017). Atualmente, pode-se definir alcaloides como produtos biologicamente ativos, ou seja, de serventia ecológica, farmacológica ou mesmo medicinal, pode ou não apresentar característica básica, sendo que podem ser neutros ou até ácidos (alcaloides quaternários), quimicamente natural de estrutura heterocíclica, contendo um átomo de nitrogênio, derivado biossinteticamente de aminoácidos e encontrados em sua maioria em plantas, mas podendo encontrar em organismos marinhos, fungos e animais. (ANISZEWSKI, 2015; STÉVIGNY; BAILLY; QUETIN - LECLERCQ, 2005; KLEIN-JÚNIOR; HENRIQUES, 2017). Quanto as suas derivações, algumas classes para este grupo de metabólitos foram criadas com o objetivo de acomodar as mais diversas estruturas que os alcaloides podem apresentar. Os alcaloides podem ser derivados tanto de aminoácidos quanto também de processos de transaminação podendo ser classificados de acordo com o aminoácido fornecedor de parte de seu esqueleto e nitrogênio. Dessa forma aqueles que derivam de aminoácidos e possuem nitrogênio em heterociclo são chamados de verdadeiros. Os alcaloides que possuem o nitrogênio fora do heterociclo são chamados de protoalcaloides. Por fim os alcaloides que não se originam de aminoácidos, mas sim de outras vias (acetato, chiquimato, mevalonato ou desoxixilulose fosfato), podem incorporar o nitrogênio por meio de outras reações e são denominados pseudoalcaloides. (ANISZEWSKI, 2015; KLEIN-JÚNIOR; HENRIQUES, 2017).

3.1.2 Alcaloides aporfínicos

Os alcaloides aporfínóides incluem os aporfínicos (*stricto sensu*) e os alcaloides biogeneticamente relacionados ou aporfínicos *lato sensu*, como os proaporfínicos e os derivados do catabolismo, os oxoaporfínicos e também os

fenantrenos que são os produtos de degradação mais comuns para estes compostos. As formas diméricas e os desidroaporfínicos, caracterizados por uma insaturação adicional no carbono 6a, estão incluídos neste grupo. (STÉVIGNY, BAILLY e QUETIN - LECLERCQ, 2005). Por conceito químico, os aporfínicos (*stricto sensu*) são bases tetracíclicas formadas por ligação direta dos anéis aromáticos A e D dos núcleos benzilisoquinolínicos típicos (1). O átomo de nitrogênio na posição 6 é normalmente terciário na forma básica mas, pode também ser quaternário, menos frequentemente acetilado ou formilado. Compostos N-óxidos também foram descritos. O alcaloide é chamado noraporfínico quando o nitrogênio é secundário. Nos aporfínicos naturais, as posições 1 e 2 são normalmente substituídas por grupos hidroxila, metoxila ou metilenodioxílico. O núcleo tetracíclico pode ser substituído em diferentes locais, nas posições 9, 10 e 11 e menos frequentemente nas posições 3 e 8, e em uns poucos casos, a posição 7 (ou 4) é oxigenada. Os aporfínicos são opticamente ativos, possuindo tanto a configuração absoluta R(-) ou S(+), dependendo da estereoquímica do carbono 6a. (STÉVIGNY, BAILLY e QUETIN - LECLERCQ, 2005).

FIGURA 1 – ESQUELETO DE ALCALOIDEOS APORFINICOS *Stricto sensu*.



FONTE: Adaptado de ZANIN, (2006).

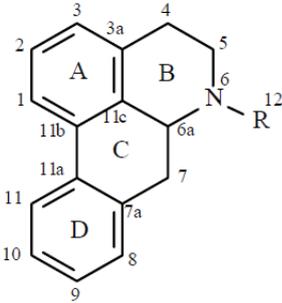
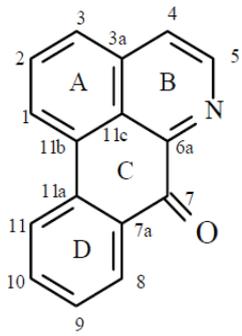
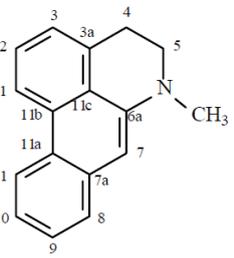
3.1.3 Alcaloides aporfínicos identificados em espécies do gênero *ocotea*

O gênero *Ocotea* é conhecido por seus princípios ativos que possuem ampla gama de atividades farmacológicas, como atividades anti-inflamatória, citotóxica, antimicrobiana, larvicida e antiproliferativa. Os resultados de isolamentos de

alcaloides que evidenciam o potencial terapêutico do gênero, aumentando a quantidade de dados e dando suporte a futuras aplicações clínicas e desenvolvimento de novos medicamentos. (SALLEH; AHMAD, 2017). A tabela 1 apresenta um levantamento bibliográfico de alcaloides aporfinóides isolados e identificados em diversas espécies do gênero *Ocotea*.

TABELA 1 - RELAÇÃO DOS ALCALOIDES APORFONÓIDES IDENTIFICADOS EM ESPÉCIES DO GÊNERO *Ocotea*

continua

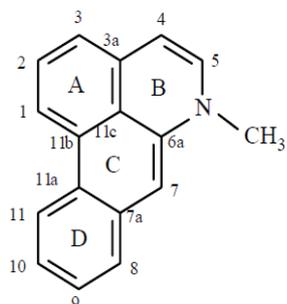
Alcaloide Aporfínico <i>stricto sensu</i>	Alcaloide	Espécie isolada	Referência
	predicentrina	<i>O. puberula</i>	Araujo, 2000
	glaucina	<i>O. vellosiana</i>	Garcez; Yoshida; Gottlieb, 1995
	dicentrina	<i>O. acutifolia</i>	Garcez et al., 2011
	ocoteina	<i>O. acutifolia</i>	Guterres et al., 2013
	leucoxina	<i>O. acutifolia</i>	Guterres et al., 2013
	leucoxilonina	<i>O. leucoxylon</i>	Zhou, 2000
	dicentrina	<i>O. macrophylla</i>	Pabon; Cuca, 2010
Alcaloide Oxoaporfínico			
	dicentrinona	<i>O. leucoxylon</i>	Zhou, 2000
	dicentrinona	<i>O. minarum</i>	Vecchiatti et al., 1979
	talicminina	<i>O. puberula</i>	Baralle et al., 1973
	ocominarona	<i>O. minarum</i>	Vecchiatti et al., 1979
	talicminina	<i>O. minarum</i>	Vecchiatti et al., 1979
Alcaloide Desidroaporfínico			
	deidronantenina	<i>O. macrophylla</i>	Franca et al., 1975
	deidrodicentrina	<i>O. macropoda</i>	Cava; Venkateswarlu, 1971

deidroocoteína *O. puberula* Baralle et al., 1972

deidroocopodina *O. macropoda* Cava; Venkateswarlu, 1971

3-hidroxi-6a,7-
diidronuciferina *O. brenesii* Lopez et al., 1996

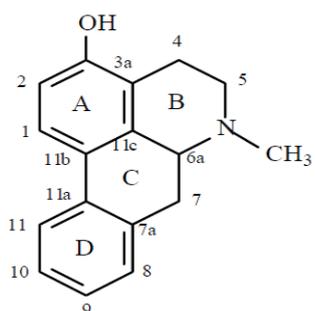
**Alcaloide
Didesidroaporfinico**



dideidroocoteína *O. puberula* Baralle et al., 1972

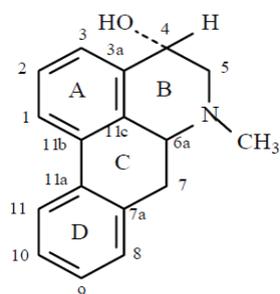
dideidroocoteína *O. macrophylla* Pabon; Cuca, 2010

**Alcaloide C-3-O-
aporfinico**



3-hidroxicentrina *O. puberula* Araujo, 2000

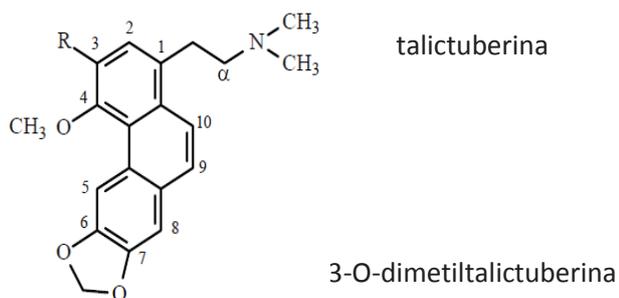
**Alcaloide C-4-O-
aporfinico**



4-hidroxicentrina *O. minarum* Vecchietti et al., 1979

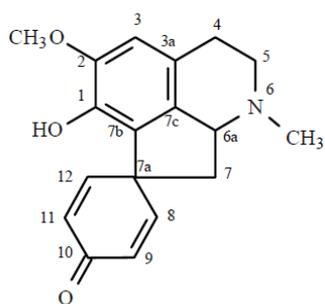
continua

Alcaloide fenantreno

*O. insularis*

Guinaudeau; Leboeuf; Cavé, 1994

**Alcaloide
proaporfínico**

*O. glaziovii*

Cava et al., 1968

O. variabilis

Cava; Behforouz; Mitchell, 1972

*O. brachybotra*Vecchietti; Casagrande; Ferrari,
1977

 FONTE : O autor 2018.

3.1.4 Rota biossintética dos alcaloides aporfinóides

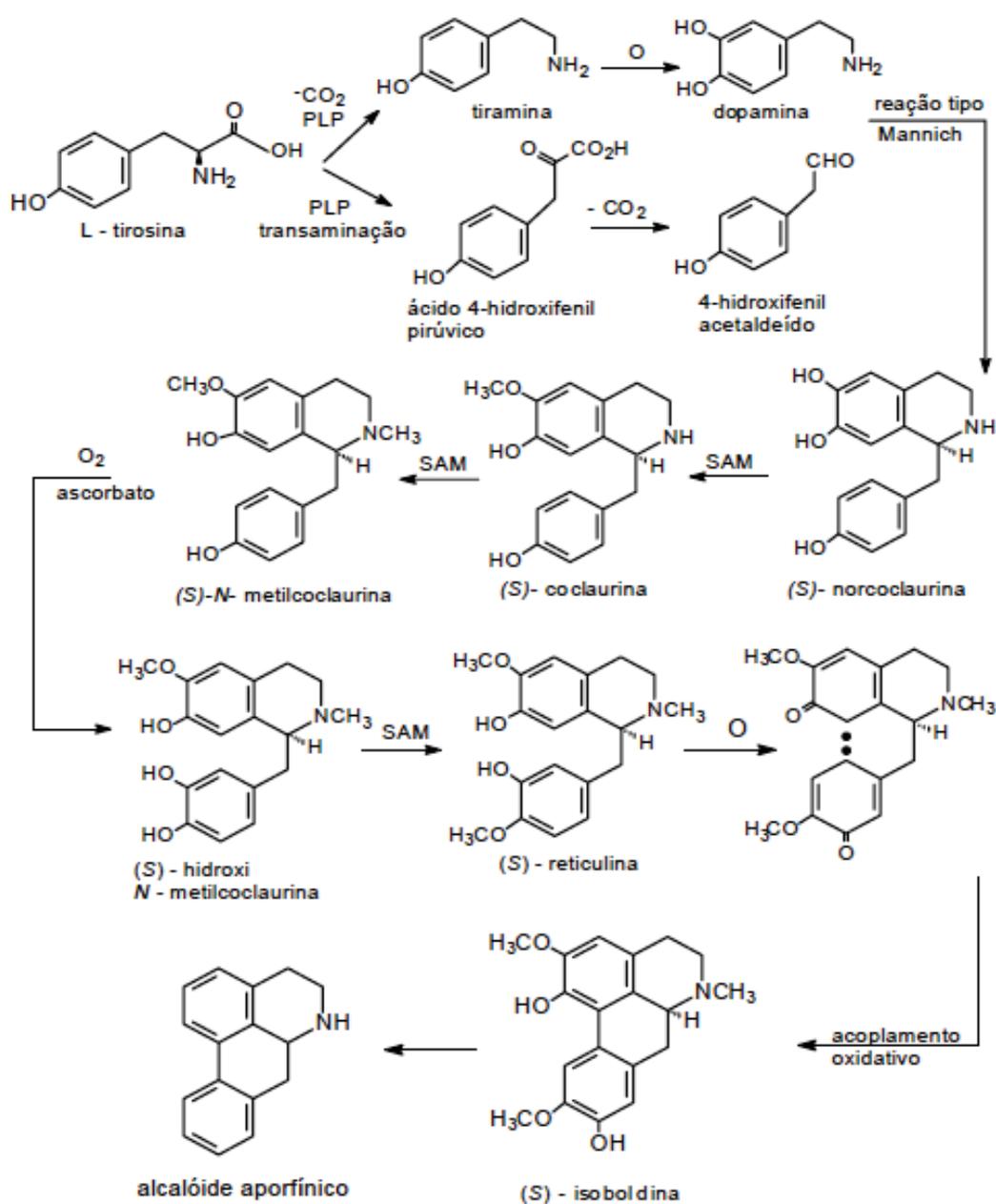
A partir de uma sequência de reações, as moléculas dos produtos naturais são biossintetizadas, geralmente catalisadas por enzimas. Em sua maioria existe um co-fator indicado, participando da transformação. Algumas reações tem por característica serem estereoespecíficas. Sendo as mais frequentes e importantes as de alquilação, transaminação, descarboxilação, oxidação e redução. Para os alcaloides aporfinóides a rota biossintética inicia pelo aminoácido L-tirosina como pode ser visto na FIGURA 2 (DEWIK, 2002).

Mesmo que duas moléculas de tirosina sejam utilizadas na rota biossintética, somente o fragmento feniletilamina do sistema anelar tetraidroisoquinolínico é produzido via DOPA (diidroxifenilamina), a tirosina por via do ácido 4-hidroxifenilpirúvico e 4- hidroxifenilacetaldeído libera carbonos remanescentes. A reação do tipo Mannich tem como produto o alcalóide triidroxilado norcoclaurina, produzindo estereoespecificamente como o enantiômero – (S). A etapa da O - metilação da (S) – norcoclaurina libera a (S) – coclaurina que, em seguida por N – metilação fornece a (S) – N – metilcoclaurina. Posteriormente a estas etapas, o anel benzílico é hidroxilado fornecendo o modelo de substituição tetraidroxílico. (DEWIK, 2002; KLEIN-JÚNIOR; HENRIQUES, 2017).

Segundo STÉVIGNY; BAILLY; QUETIN - LECLERCQ (2005), em relação a biossíntese dos alcaloides aporfínicos, a (S) – reticulina é reconhecida por ser precursora da maioria dos alcaloides isoquinolínicos. A partir de duas unidades de tirosina se forma o derivado tetraisoquinolínico. A (S) – (+) – norcoclaurina origina-se da condensação de duas unidades, catalizada pela (S) norcoclaurina sintetase. Os aporfínicos são originados nas plantas por acoplamento oxidativo intramolecular direto da (S) – reticulina, *orto* ao grupo fenólico no tetraidroisoquinolínico e *para* fenol do substituinte benzílico, a partir da forma radical bisdienona.

De acordo com DEWICK (2002) a alteração na configuração é posteriormente formada do isômero – (S) por oxidação – redução e do íon intermediário 1,2 – desidroreticulínio.

FIGURA 2 – ESQUEMA RESUMIDO DA BIOSÍNTESE DE ALCALÓIDES APORFÍNICOS



FONTE: adaptado DEWICK (2002).

4.0 ESPÉCIE *Ocotea puberula* (RICH.) Nees

4.1 ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO

O enquadramento taxonômico da espécie em estudo pode ser visto no QUADRO 2.

QUADRO 2 – ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO DA ESPÉCIE *Ocotea Puberula* (RICH.) Nees

Classe	Magnoliopsida (Dicotiledonae)
Subclasse	Magnoliidae
Superordem	Magnolianaes takht
Ordem	Lurales
Família	Lauraceae Juss.
Gênero	<i>Ocotea</i>
Espécie	<i>Ocotea puberula</i> (RICH.) Nees

Fonte: Adaptado de Carvalho (2002).

4.1.1 Ocorrência natural

A *Ocotea puberula* é uma espécie arbórea nativa, heliófita, indiferente as condições físicas do solo e uma das plantas pioneiras mais comuns do Planalto Sul-Brasileiro. Ocupam capoeiras e capoeirões, chegando a dominar um determinado estágio da sucessão secundária. Também ocorre em matas abertas e clareiras. Raramente ocorre no interior da floresta primária densa, inalterada. (LORENZI, 2002; FARAGO et al., 2005). Ocorre naturalmente no nordeste e norte Argentino, sul da Bolívia e no leste do Paraguai. No Brasil esta espécie ocorre nos estados do Espírito Santo, Bahia, Mato Grosso do Sul, Minas gerais, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, São Paulo, Santa Catarina e Distrito Federal, Pernambuco e em outros estados como mostra a FIGURA 3. No Paraná a espécie é amplamente distribuída, apresentando regeneração em florestas secundárias (CARVALHO, 2002; BROTTTO; CERVI; SANTOS, 2013).

FIGURA 3 – ESTADOS BRASILEIROS COM OCORRÊNCIA DA ESPÉCIE *Ocotea puberula* (RICH) Nees



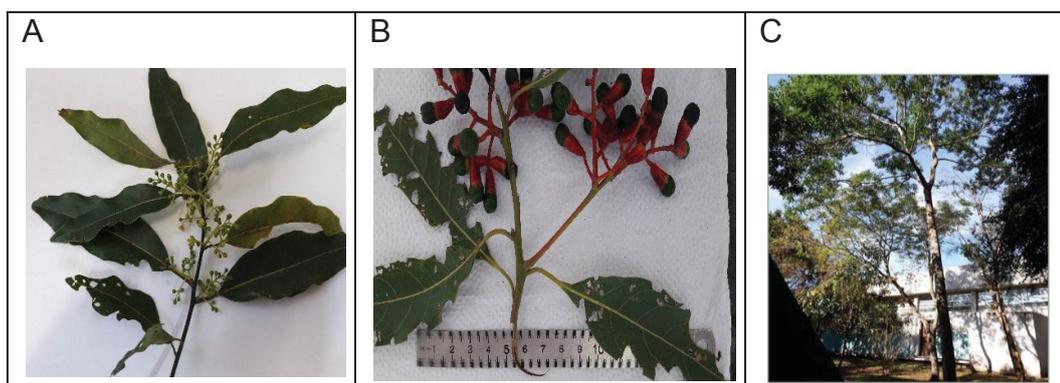
FONTE: Adaptado de QUINET et al. (2015).

4.1.2 Nomes populares

Ocotea é nome popular na Guiana; o termo *puberula* significa folhas sem pelo. Alguns de seus nomes vulgares no Brasil são amansa-besta, louro-pimenta, louro-vermelho na Bahia; canela, no Rio Grande do Sul; canela-amarela, no Paraná e no Estado de São Paulo; canela-babosa, canela-branca, canela-de-corvo, canelapinho, canelão, guaicazeiro e guaitaveiro, no Paraná; canela-guaicá, canela-guaica, em Santa Catarina; canela-parda, no Paraná, em Santa Catarina e no Estado de São Paulo; canela-pimenta e canelinha, no Estado de São Paulo; canela-preta, na Bahia e no Estado de São Paulo; canela-sebo, no Paraná, em Santa Catarina e no Estado de São Paulo; guaiacá; guaicá; louro-abacate. Seus nomes vulgares no exterior são aju'y guasu, no Paraguai, e laurel guaycá e guaica blanca, na Argentina. (CARVALHO, 2003).

4.1.3 Características morfológicas e utilidades

A *Ocotea puberula* é árvore perenifólia, com 10 a 15 m de altura podendo chegar a 25 m de altura e 20 a 60 cm de diâmetro podendo chegar a 90 cm de diâmetro. O tronco é cilíndrico a irregular, reto a inclinado suave, fuste com até 12 m de comprimento como pode ser visto na (FIGURA 4). Seus ramos são angulosos glabros com folhas alternadas e ápice acuminado. As folhas são subcoriáceas, de 10 a 12 cm de comprimento por 3 - 4 cm de largura. Suas flores são pequenas, unissexuadas com coloração que varia de creme a esverdeada, agrupadas em densas panículas axilares, multiflorais, dioicas, com 3 a 10 cm de comprimento. Seus frutos maduros são pretos, com 10 a 15 mm de comprimento por 6 a 7 mm de diâmetro, com cúpulas planas, pequenas e de coloração vermelha. A floração ocorre de maio a outubro e a frutificação de dezembro a fevereiro, apresentando pico de frutificação em dezembro. (BROTTO; CERVI; SANTOS, 2013; CARVALHO, 2002; LORENZI, 2002).

FIGURA 4 – *Ocotea puberula*

FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: (A) Flores (B) Frutos (C) Árvore adulta de *Ocotea puberula*

Na anatomia da casca da espécie, apresenta periderme constituída por súber com espessura média formada por volta de 25 camadas de células tubulares, por feloderme e felogênio. Possui córtex constituído por parenquemáticas de paredes comparativamente delgadas e periciclo com característica descontínua. Possui 2-3 fileiras de células em raios parenquimáticos que formam o sistema floemático, as fibras liberianas conjugadas em pequenos grupos com lumen reduzido e paredes espessas. Encontra-se na estrutura anatômica da casca, células compostas por substâncias fenólicas que se distribuem em região cortical e frequentemente ocorrem idioblastos de formação por meio de células secretoras de substâncias lipofílica e mucilaginosas. (FARAGO et al., 2004).

A dispersão de frutos e sementes é zoocórica, principalmente por aves. (CARVALHO, 2002; CALDATO; VERA; DONAGH, 2003). A madeira apresenta odor suave com coloração branco-amarelado, cerne variando do pardo-amarelado ao castanho-rosado. A superfície é medianamente lisa e com brilho pouco acentuado é leve, mole, baixa resistência mecânica, moderadamente resistente ao ataque de organismos xilófagos e ao apodrecimento. (CARVALHO, 2002). Devido a baixa resistência mecânica, a madeira da canela-guaicá é indicada principalmente para construções internas e construção civil leve; também pode ser usada em carpintaria, marcenaria, estrutura de móveis, móveis populares, caixas, portas, forro, tabuado, painéis, uso doméstico e embalagens em geral, laminação, compensado de base para lâminas nobres, revestimento para interiores, celulose, papel e alimentação para animais. A árvore pode ser utilizada na arborização urbana. Os frutos muito

apreciados pelos pássaros, não deve faltar nos plantios mistos de áreas degradadas e preservação permanente. (CARVALHO, 2002; LORENZI, 2002; INOUE; RODERJAN; KUNIYOSHI, 1984).

4.1.4 Usos na medicina popular

Para o uso medicinal, índios de várias etnias do Paraná e de Santa Catarina relataram o uso da parte interna do caule (quanto mais velha melhor) e a casca do caule no tratamento de furúnculo. A seiva da casca dá um emplastro para puxar espinhos ou estrepes; o chá é usado no combate às desinterias e diarreias. (CARVALHO, 2003; STEFANELLO, 1993).

4.1.5 Usos comprovados por testes clínicos

Vários alcalóides aporfínicos geralmente encontrados no gênero *Ocotea* apresentam pronunciada bioatividade, como a nantenina, bloqueador de contração muscular, translocação de Ca^{+2} (RIBEIRO et al., 2003); glaucina, citotóxica (HOET et al., 2004); derivados halogenados da predicentrina, aumento da afinidade aos receptores dopaminérgicos D1 (ASENCIO et al., 2005); dicentrina, inibição da topoisomerase II (WOO et al., 1999), atividade citotóxica (*in vitro*) e antineoplásica (*in vivo*) foram avaliadas com células tumorais humanas. Este composto significativamente inibe o crescimento da linha celular de hepatoma humano HuH-7, como também a biossíntese de DNA e RNA (STÉVIGNY, BAILLY e QUETIN-LECLERCQ, 2005; HUANG et al., 1998); dicentrinona, inibição da topoisomerase I (ZHOU et al., 2000); inclusive vários deles tendo sido alvo de patentes (JIA et al., 2000). Estudos apresentam atividade farmacológica que a espécie pode atuar.

4.1.6 Constituintes alcaloídicos presentes em *ocotea puberula*

Em estudo de CAVA et al. (1968) é citado a presença da ocoteína, um alcaloide aporfínico *stricto sensu*, presente em *Ocotea puberula*. Os primeiros estudos fitoquímicos conduzidos em *Ocotea puberula* por BARALLE et al. (1972) retratam a ocorrência de um alcaloide diidroaporfínico, a deidroocoteína e de um alcaloide dideidroaporfínico, a dideidroocoteína. Em estudo posterior de BARALLE; SCHVARZBERG; VERNENGO, 1973 foi isolado e identificado o alcaloide

oxoaporfínico talicminina. Ocorreu o isolamento de alcaloides a partir do extrato alcaloídico de folhas de *Ocotea puberula* coletadas em Curitiba, Estado do Paraná, conduzindo ao isolamento dos alcaloides aporfínicos *stricto sensu* ocoteína, dicentrina, predicentrina, N-metil laurotetanina, isodomesticina e leucoxina, além de dois novos alcaloides aporfínicos, o alcalóide C-3-O-aporfínico 3-hidroxicentrina e o aporfínico *stricto sensu* N-óxido dicentrina, previamente obtido por síntese. (ARAÚJO, 2000; GUINAUDEAU; LEBOEUF; CAVÉ, 1994).

4.1.7 Principais pragas, doenças e espécies afins

As principais pragas que se apresenta na espécie são o coleóptero cerambicídeo *Oncideres* spp., serrador, com danos em plantas com até 10 cm de diâmetro e besouros da família Scolytidae. Entre as doenças que atacam a espécie destacam-se o fungo *Botryconis pallida*, onde os frutos são repetidamente atacados na árvore, reduzindo significativamente a produção de sementes férteis. Nas espécies afins ocorrem cerca de 60 espécies do gênero *Ocotea* no Brasil, distribuídas principalmente no Sul e no Sudeste. Entre essas, podem ser destacadas *Ocotea porosa* ou imbuia e *Ocotea odorifera* ou canela-sassafrás com ocorrência na mesma área de *Ocotea puberula* ou canela-guaicá (CARVALHO, 2003).

4.2 DOENÇAS DE PLANTAS

Doenças nas plantas são causadas por microorganismos patogênicos, como vírus, bactérias, fungos, protozoários e nematoides. Outros agentes, concomitantes ou não, são as condições ambientais, competição com outras plantas e também frequentemente danos causados por insetos. (AGRIOS, 2005; TAIZ; ZEIGER, 2002; PALLARDY, 2008).

Os patógenos diferem em relação aos tipos de plantas que eles podem atacar, aos órgãos e tecidos que eles podem infectar e idade do órgão ou tecido da planta na qual podem crescer. Geralmente diferem também nas maneiras pelas quais atacam e adquirem seus nutrientes da planta hospedeira. Alguns patógenos são restritos a uma única espécie, outros a um gênero e outros ainda têm uma ampla gama de plantas hospedeiras, pertencentes a muitas famílias de plantas superiores. (AGRIOS, 2005).

A ação de patógenos resulta em absorção contínua de nutrientes que normalmente seriam utilizados pela planta hospedeira para o parasita. A depleção de nutrientes, no entanto, embora restrinja o crescimento da planta hospedeira e cause sintomas, nem sempre mata a planta. (AGRIOS, 2005; TAIZ; ZEIGER, 2002; PALLARDY, 2008).

Os patógenos, durante a infecção, liberam substâncias biologicamente ativas como enzimas, toxinas e reguladores de crescimento, que podem afetar a integridade estrutural das células da planta hospedeira ou seus processos fisiológicos. Em resposta, a planta hospedeira reage com uma variedade de mecanismos de defesa, que resultam em graus variados de proteção da planta contra os patógenos. (AGRIOS, 2005).

Insetos específicos também são vetores de certos patógenos fúngicos, bacterianos, nematoides e quando se movem entre plantas, carregam esses patógenos e os depositam na superfície ou nas feridas que fazem nas plantas durante a alimentação, provocando doenças. (AGRIOS, 2005).

Das substâncias secretadas pelos fungos, as toxinas podem alterar a permeabilidade das membranas das células afetadas. Fungos secretam muitos dos mesmos reguladores de crescimento produzidos pelas plantas hospedeiras e podem, assim, causar crescimento hiperplástico ou hipertrófico por ação direta. (TAIZ; ZEIGER, 2002; PALLARDY, 2008). Hiperplasia e hipertrofia são processos induzidos nas células infectadas das plantas por patógenos, formando órgãos anormais como as galhas. (AGRIOS, 2005).

As principais pragas que afetam a espécie *Ocotea puberula* são o coleóptero cerambicídeo *Oncideres* spp. , serrador, com danos em plantas com até 10 cm de diâmetro e besouros da família Scolytidae. Os frutos desta espécie também são atacados pelo fungo *Botryoconis pallida*, reduzindo significativamente a produção de sementes férteis e formando galhas. (CARVALHO, 2003).

4.2.1 Caracterização do fungo *Botryoconis pallida*

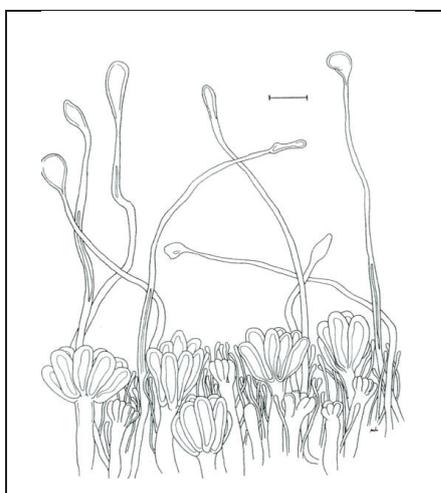
A espécie *Botryoconis pallida* pertence ao reino Fungi, divisão Basidiomycota, classe Exobasidiomycetes, ordem Exobasidiales, família Cryptobasidiaceae Malençon ex Donk, gênero *Botryoconis*, espécie *Botryoconis pallida*. Nome comum - *Botryoconis pallida* Syd. & P. Syd. Em 1907 (MB226284) Malençon (1953) mostrou

os feixes de esporos característicos do fungo e integrou o gênero *Botryoconis* na família das Cryptobasidiaceae (HENDRICHS; BAUER; OBERWINKLER, 2003) sendo patógenos que se desenvolvem como parasitas em folhas, caules e frutas de plantas especialmente na família Lauraceae. (CANNON; KIRK, 2007)

A espécie *Botryoconis pallida* é monotípica com a espécie *Botryoconis tumefaciens*, sendo os basidiósporos do *Botryoconis pallida* mais brilhantes como a principal diferença. (HENDRICHS; BAUER; OBERWINKLER, 2003). A espécie *Botryoconis pallida* foi descrita por Sidow (1907) para um fungo encontrado nos frutos da *Ocotea puberula* no sul do Brasil, causa forte deformação na madeira, folhas e frutos de *Ocotea*. Muitas espécies causam hipertrofia e outras deformações. (CANNON; KIRK, 2007; HENDRICHS; BAUER; OBERWINKLER, 2003).

O gênero *Botryoconis* é caracterizado por basidiósporos alongados, colados em feixes de 6-8 esporos por suas estruturas ornamentais, nunca são septados. Poros septais simples, haustorias presentes nas células hospedeiras. (CANNON; KIRK, 2007; HENDRICHS; BAUER; OBERWINKLER, 2003).

FIGURA 5 – PORÇÃO DO HYMENIUM COM BASIDIA EM DIFERENTES ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO DO FUNGO *Botryoconis pallida*.



FONTE: HENDRICHS et. al., (2003)

4.2.2 Doenças de plantas causada por fungos

Menos de 10% das aproximadamente 100.000 espécies fúngicas conhecidas são capazes de colonizar plantas, e uma fração ainda menor delas é capaz de causar doenças. (KNOGGE, 1996). Todas as aproximadamente 300.000 espécies de plantas com flores são atacadas por fungos patogênicos. (KNOGGE, 1996;

AGRIOS, 1974). Os fungos, como microorganismos heterotróficos, alimentam-se de outros organismos de formas distintas. Alguns fungos obtêm seus nutrientes de um hospedeiro vivo e são chamados de biófitos, outros obtêm seus nutrientes de plantas ou animais mortos e são chamados de saprófitas e outros fungos infectam um hospedeiro vivo, mas matam as células hospedeiras para obter seus nutrientes são chamados de necrófitos. (CARRIS; LITTLE; STILES, 2012).

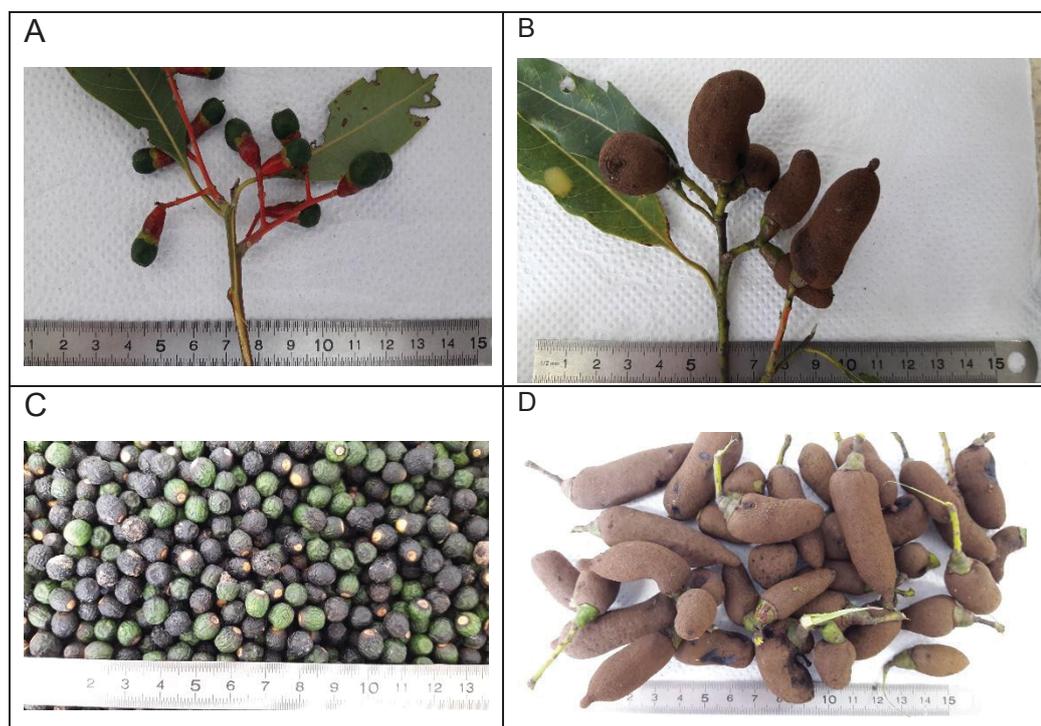
Os fungos penetram nos tecidos das plantas através de lesões, estomas e / ou através da cutícula e da epiderme. (AGRIOS, 1974). A infecção pode ser iniciada com um inóculo, podendo ser esporos, escleródios ou fragmentos de micélio dos fungos. As hifas ou apressórios são formadas no ponto de contato do tubo germinativo ou micélio com a superfície da planta. Apressórios tem a função de fixação e penetração e haustórios tem a função de absorção de nutrientes das células das plantas. (AGRIOS, 2005). Fungos biotrópicos obtêm nutrientes dos tecidos hospedeiros vivos, freqüentemente por meio de haustórios, que se formam dentro das células do hospedeiro. (CARRIS; LITTLE; STILES, 2012; AGRIOS, 1974).

A sobrevivência e o desempenho da maioria dos fungos patogênicos de plantas dependem muito das condições prevaletentes de temperatura e umidade e para fungos específicos, outros agentes, como água ou insetos, podem desempenhar um papel muito importante. (AGRIOS, 1974). A infecção fúngica das plantas altera o metabolismo das plantas, sendo um exemplo de alteração causada por fungos patogênicos de plantas a formação de galhas. (CARRIS; LITTLE; STILES, 2012; RAMAN; SURYANARAYANAN, 2017).

4.2.3 Galhas

A espécie *Ocotea puberula* desenvolveu frutos fenotipicamente diferentes dos encontrados em literatura (MONTRUCCHIO, 2012). Esses frutos não mantiveram suas características de frutos próprios da espécie, apresentando-se de cor marrom e tamanho maior, que podem ser visualizados na FIGURA 6.

FIGURA 6 – FOTO DO FRUTO COM CRESCIMENTO NORMAL E FRUTO COM CRESCIMENTO DIFERENCIADO (GALHA)



FONTE : O autor (2018).

LEGENDA: (A) e (C) Crescimento normal; (B) e (D) crescimento diferenciado

Galhas são estruturas vegetais que em resposta ao ataque de organismos indutores diferem a estruturas do fruto, geralmente estão associadas a alterações bioquímicas levando a modificação e/ou aumento de metabólitos. Destaca-se a hiperplasia e hipertrofia do mesófilo, e o aumento da produção de amidos, flavonas, flavonoides e flavononas, conferindo ao galhador proteção e nutrição. (DE OLIVEIRA et al., 2006). Vários pesquisadores relataram que essa anomalia ocorre pela presença do fungo *Botryconis pallida*, apresentando galhas nos frutos. (HIRANO; POSSAMAI, 2008; CARVALHO, 2002; HENDRICH; BAUER; OBERWINKLER, 2003). Galhas são encontradas em todas as partes das plantas, desde a extremidade da raiz às gemas apicais do caule, nas partes vegetativas e reprodutivas. Aproximadamente 70% das galhas da América do Sul são em folhas, 20% em ramos e galhos, 7% em botões e apenas 1 a 2% em flores, frutos e raízes. (FERNANDES; NETO; MARTINS, 1988).

As galhas induzidas por insetos diferem das galhas induzidas por fungos e bactérias em sua forma, organização e complexidade. (SANTOS, 2014; RAMAN, 2011). Latitude, altitude, temperatura e umidade são fatores que influenciam a

diversidade e a distribuição dos agentes galhadores. (CARVALHO; SANTOS; BARBOSA, 2015). Galhadores são altamente específicos ao órgão hospedeiro, ou seja, eles induzem galhas em apenas uma espécie ou um grupo muito pequeno de espécies de hospedeiros e as características morfológicas das galhas são específicas para cada espécie de galhador, pois são resultado da interação deste com a planta hospedeira. (CARVALHO; SANTOS; BARBOSA, 2015; RAMAN, 2011).

4.3 POLISSACARÍDEOS (GOMAS)

Polissacarídeos são macromoléculas sintetizadas em diferentes estágios do ciclo de vida de todos os organismos vivos com diferentes finalidades. (MAHAPATRA; BANERJEE, 2013). Geralmente são compostos de mais de dez unidades monoméricas (glicose, manose, galactose, xilose, arabinose etc) unidas através de ligações glicosídicas podendo ter distintas configurações anoméricas (α e β), pesos moleculares (número de monossacarídeo por molécula), conformações (linear, ramificada, helicoidal), posições das ligações, entre outras. (POSER, 2017). Das diversas fontes de produção de polissacarídeos (plantas fotossintéticas, fungos, algas, bactérias e assim por diante), a microbiológica é conhecida por sua capacidade de sintetize desses polímeros de inúmeras complexidades estruturais (MAHAPATRA; BANERJEE, 2013). Polissacarídeos produzidos por microrganismos podem ser classificados em três grupos, que se diferenciam de acordo com sua localização na célula: polissacarídeos citosólicos, são incumbidos por fornecerem carbono como fonte de energia para a célula, os exopolissacarídeos que são polissacarídeos excretados para o meio extracelular como cápsulas ou biofilme e os peptidoglicanos e lipopolissacarídeos polissacarídeos que formam a parede da célula. (DONOT et al., 2012). Os polissacarídeos podem ser divididos entre homogêneos, quando resultantes da condensação de um grande número de moléculas do mesmo açúcar e heterogêneos formados pela condensação de diferentes tipos de açúcares (gomos e mucilagens). (POSER, 2017).

Gomas são compostos de massa molecular alta, de natureza polissacarídica, parcial ou totalmente solúveis em água. Essas substâncias ocorrem em certos órgãos da planta, como raízes e caule, e são o resultado de lesões que o vegetal sofreu devido a traumatismos e ação de micro-organismos. A formação de goma também pode estar relacionado a um processo de adaptação do vegetal em certas

condições climáticas, constituindo a chamada "gomose fisiológica". Quimicamente, as gomas são caracterizadas por conter ácidos urônicos, açúcares comum e sempre apresentam estrutura ramificada. Diferente das gomas, as mucilagens são constituintes naturais do vegetal, não sendo patológicas da planta. (POSER, 2017).

4.4 MACERAÇÃO

A maceração consiste em um processo físico para extração de ativos de amostras vegetais, por meio de um solvente adequado. A escolha do processo de maceração e do líquido extrator a ser utilizado, se dá pelas características dos ativos a serem extraídos, como solubilidade, polaridade e outras propriedades físico-químicas. Este método é frequentemente usado para substâncias termolábeis. (PANDEY; TRIPATHI, 2014).

O tempo recomendado de duração do processo de extração é de no mínimo três dias e pode ser prolongado e repetido, conforme as características dos materiais a serem extraídos. As variáveis do processo como agitação, temperatura, pH e troca do solvente podem ser alteradas conforme características do material utilizado. (HANDA, 2008; AZWANIDA, 2015).

O processo de maceração mais simples é realizado utilizando-se a planta triturada ou pulverizada, em recipiente fechado, em repouso, temperatura ambiente, com agitação ocasional e sem renovação do líquido extrator. A extração é lenta e realizada inicialmente por difusão molecular. O processo de difusão é otimizado intensificando a dispersão das partículas, com agitação constante, que resulta no aumento à superfície de contato entre solvente e substância a ser extraída. Quando o equilíbrio entre a concentração da substância no macerado e no solvente é atingido, a extração é interrompida. O extrato obtido é filtrado e pode ser realizado o doseamento da substância desejada. Para evitar a evaporação deve se manter fechado o sistema. (HANDA, 2008).

O processo simples de maceração não esgota o macerado, e variações do método podem ser aplicadas, como a remaceração, digestão e a maceração dinâmica. Remaceração é o processo de repetição, utilizando o mesmo material já macerado, renovando-se apenas o líquido extrator. A Digestão consiste no processo de maceração utilizando um sistema de aquecimento, com temperaturas entre 40°C

e 60°C. Maceração dinâmica é o processo utilizando o auxílio de um agitador mecânico. (BASSANI ; PETROVICK, 2017).

4.4.1 Métodos de extração alcaloídica

Duas estratégias clássicas podem ser propostas para a obtenção de uma fração enriquecida de alcaloides. Na primeira situação o material vegetal é previamente desengordurado com um solvente de baixa polaridade. Em seguida o material é extraído com água acidificada ou solução hidroalcoólica acidificada. A fase aquosa é alcalinizada e fracionada com um solvente orgânico de baixa ou média polaridade, para assim obter seletivamente os alcaloides como bases livres e para purificação. O produto ao final da evaporação será uma fração rica em alcaloides. De modo alternativo, a extração pode ser realizada diretamente do material vegetal com solvente de alta polaridade e acidificado com ácido clorídrico (HCl 1 M) e fracionado com solvente de baixa polaridade. Em sequência, o extrato é alcalinizado e novamente fracionado com um solvente orgânico, e dará origem à fração alcaloídica após evaporação. (KLEIN-JÚNIOR; HENRIQUES, 2017).

Na segunda estratégia, os alcaloides são extraídos em sua forma de base. O material deve ser desengordurado com solvente apolar e na sequência umidificado com uma solução aquosa alcalina para liberar os alcaloides. A mistura é submetida à extração com solvente orgânico, como os clorados e éter etílico. Após o fracionamento líquido – líquido com solvente orgânico, utilizando como fase aceptor uma solução ácida, extraíndo o alcaloide em forma de sal. Por fim alcaliniza-se a fase aquosa ácida e fraciona com solvente de baixa polaridade, fazendo novamente os alcaloides migrar da forma de base livre para a fase orgânica. Gerando uma fração enriquecida em alcaloides, após evaporação sob pressão reduzida. (KLEIN-JÚNIOR; HENRIQUES, 2017).

4.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Antioxidantes são substâncias que presentes em baixas concentrações, quando comparadas ao substrato oxidável, desaceleram de forma significativa ou inibem a oxidação desse substrato (HALLIWELL et al., 2000). Existe uma ampla gama de metodologias para se determinar a capacidade antioxidante de uma

amostra, normalmente se baseiam em um mesmo princípio: forma-se um radical sintético e avalia-se a capacidade da amostra em eliminar ou neutralizar, monitorando tal capacidade em espectrofotômetro. Como esses ensaios estão sujeitos a interferências, recomenda-se que sejam empregadas no mínimo 2 técnicas diferentes para caracterizar um composto como antioxidante. (ARNÃO, 2000; HUNG; OU; PRIOR, 2005).

As plantas produzem uma variedade de substâncias com características antioxidantes. 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).

4.6 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

O Brasil é um país rico em biodiversidade botânica e muitas espécies de plantas são utilizadas a muito tempo pela população de maneira tradicional, em forma de chás, banhos e compressas caseiros sem respaldo de estudos que comprovem atividade, além do risco de doses inadequadas e forma incorreta de aplicação. (SILVA et al., 2006; CARVALHO et al., 2014). Sendo assim, se reforça a importância de ensaios de toxicidade. Estes estudos objetivam averiguar a segurança do uso e 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, podemos destacar a toxicidade preliminar frente à *Artemia salina*, um microcrustáceo de água salgada, utilizado em pesquisas preliminares de atividade biológica de extratos e frações obtidos a partir de produtos naturais. 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). O ensaio de hemólise *in vitro*, é um teste de triagem de toxicidade, pois podemos avaliar a ação da amostra sobre o rompimento de eritrócitos. A porcentagem de hemólise pode ser calculada frente ao Triton 1% e à água potável. (BANERJEE et al., 2008). O estudo da alelopatia é capaz

de avaliar a capacidade de um vegetal em influenciar o crescimento e desenvolvimento de sistemas biológicos e agronômicos através da liberação de compostos químicos no meio ambiente, denominados como aleloquímicos. (REIGOSA et al., 2013).

5 MATERIAL E MÉTODOS

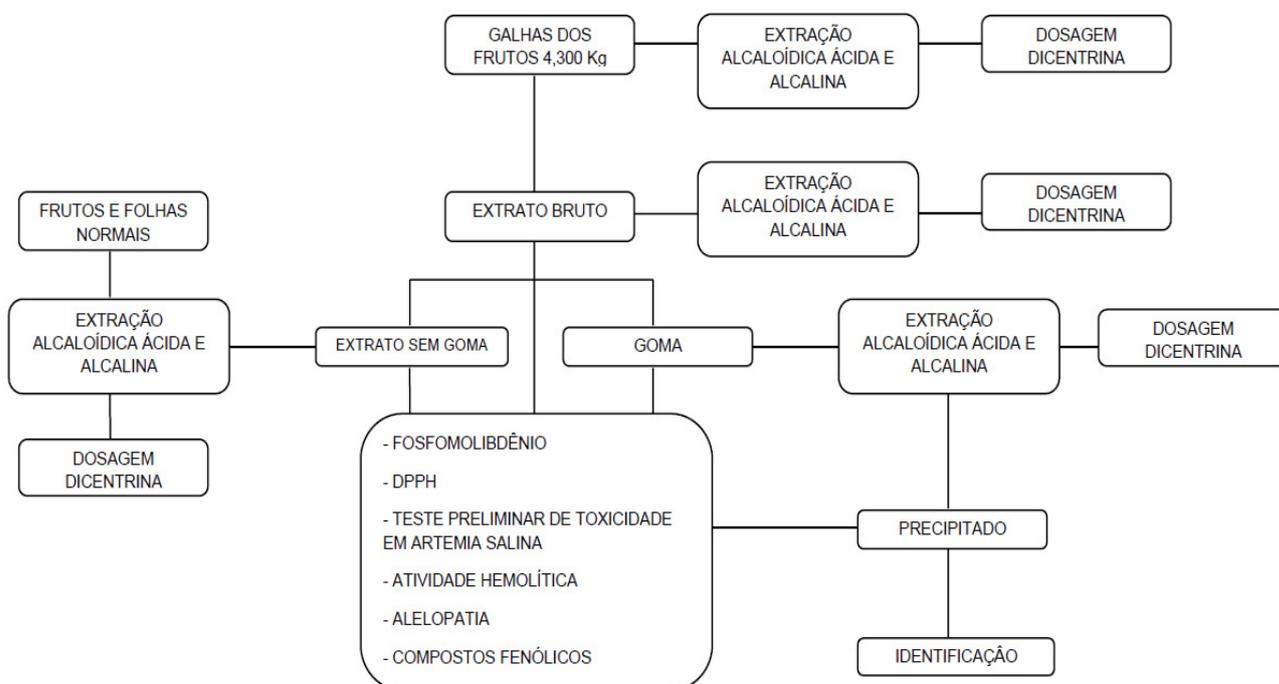
5.1 MATERIAL UTILIZADO

- Álcool etílico 96° V/V
- Balança analítica;
- Banho termostatzado quimis 1062®;
- BOD (estufa incubadora microbiológica –Incubadora BOD com fotoperíodo SL 224 SOLAB®);
- Centrífuga;
- Controles (metanol, rutina, saponina, Triton, vitamina C, BHT)
- Cromatoplasmas de sílica gel Whatman®;
- Frascos plásticos Eppendorfs;
- Equipamento MERCK HITACHI Elite Lachrom, com detector DAD L-2450, leitura na faixa de 220 a 400 nm, injetor manual, com coluna cromatográfica XTerra® RP18 5µm (4,6x250mm);
- Espectrofotômetro marca Multiskan FC Thermo Scientific®;
- Extrator Soxhlet;
- Freezer Brastemp®;
- Fita de pH;
- Fluxo laminar Airstream®;
- Fluxo laminar Labconco purifier class II total exhaust®;
- Hipoclorito de sódio;
- Micropipetas automáticas (10 a 1000µL-1);
- pHmetro MS TECNOPON mPA210®;

- Papel de filtro Whatman (nº 6);
- Reagentes (ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido fórmico, ácido acético, amônia, cloreto férrico, DPPH, Reativo de Bouchardat, Reativo de Dragendorff, Reativo de Mayer, Reativo de NEU, vanilina);
- Sangue de carneiro;
- Solução de água do mar artificial com 38g de sal marinho obtido comercialmente - marca Blue Greasure®;
- Soluções (NaOH, salina, Folin-Ciocalteu, fosfato de sódio, molibdato de amônio, NH₄OH);
- Solventes (acetato de etila, ácido acético glacial, ácido fórmico, água, clorofórmio, etanol, éter etílico, hexano, metanol grau analítico e HPLC, tolueno);
- Sonicador UltraCleaner 1400®.

A parte experimental do projeto se desenvolveu de acordo com o fluxograma representado na FIGURA 7.

FIGURA 7 – FLUXOGRAMA DE ATIVIDADES DESENVOLVIDAS NO TRABALHO



Fonte: O autor (2018).

5.2 MATERIAL BOTÂNICO

5.2.1 Material vegetal

Foi registrado do Sisgem o pedido de autorização para a pesquisa. Consta no cadastro de nº A0EB51A (ANEXO1). No mês de fevereiro de 2017, coletou-se 4.300 g de galhas dos frutos de espécimes adultas de *Ocotea puberula* de cinco matrizes identificadas e localizadas no campus Jardim Botânico da Universidade Federal do Paraná, município de Curitiba, Paraná, nas coordenadas geográficas 25°26'S e 49°14'W. As exsiccatas destas matrizes estão registradas no Museu Botânico de Curitiba sob os números 309643, 414487, 414488, 414489 e 414490 (ANEXOS 2, 3, 4, 5 e 6).

5.2.2 Maceração

A maceração foi realizada com o total de galhas de frutos coletados em etanol 96° v/v por um período de 14 dias com agitação mecânica diária esporádica.

5.3 FRAÇÕES DA MACERAÇÃO DE GALHAS

5.3.1 Extrato bruto

. O extrato bruto obtido da maceração foi filtrado em funil Büchner a vácuo eliminando-se o resíduo sólido

5.3.2 Goma e extrato bruto sem goma

Foi adicionado álcool etílico 96° na proporção 1:1 (v/v) ao extrato bruto concentrado e colocado sob-refrigeração a 4°C por um período mínimo de 12 horas, filtrando-se o precipitado em funil a vácuo. O sobrenadante foi reduzido o volume a 50°C e repetido o processo até não observar mais precipitação de goma do extrato, obtendo-se assim o extrato purificado sem goma etanólico (ESG) e extrato goma (GOMA).

5.4 EXTRAÇÕES ALCALOIDICAS

5.4.1 Extração alcaloídica dos extratos bruto, sem goma, goma, folhas, galhas do fruto e frutos normais em meio ácido

Para a extração de alcaloides com solvente orgânico em meio ácido, foi adicionado às amostras ácido clorídrico (HCl 5%), e submetidas à extração dos alcaloides por ultrassom e agitação magnética. Realizou-se a extração em Soxhlet com diclorometano (DCM). A fase ácida obtida foi alcalinizada com solução de hidróxido de amônia NH_4OH 25% até $\text{pH} = 10$, e feita extração com DCM para obtenção do extrato alcaloídico bruto. O método de extração foi acompanhado pelos reativos gerais para alcaloides e CCD conforme os itens 3.3.3 e 3.3.4

5.4.2 Extração alcaloídica dos extratos bruto, sem goma, goma, folhas, galhas do fruto e frutos normais em meio alcalino

Para a extração de alcaloides com solvente orgânico em meio alcalino, foi adicionado às amostras hidróxido de amônia NH_4OH à 10% 9:1 (vv), e submetidas à extração dos alcaloides por ultrassom e agitação magnética, com tempos definidos. Na sequência, foi adicionado 20 mL de solvente orgânico diclorometano (DCM), mantendo-se à agitação magnética e ultrassom, repetindo-se este processo até o esgotamento das amostras. Os ciclos de extrações dos alcaloides foram continuados na sequência com clorofórmio até o esgotamento dos alcaloides das amostras. A fase orgânica obtida foi acidificada com HCl 5% e repetido o processo até o esgotamento alcaloídico da fase orgânica, sendo o método de extração acompanhado com os reativos gerais para alcaloides e CCD conforme os itens 5.3.3 e 5.4 em todos os ciclos do processo de extração alcaloídica. A fase aquosa ácida obtida foi alcalinizada com NH_4OH até $\text{pH} 10$, e realizada a extração em Soxhlet com DCM, obtendo-se o extrato alcaloídico bruto das amostras.

5.4.3 Pesquisa de alcaloides para monitoramento das extrações

A pesquisa foi qualitativa e se baseiou na capacidade de mistura dos alcaloides, em estado de sal (extratos ácidos), com o iodo e metais pesados (bismuto, mercúrio, tungstênio), formando precipitados coloridos. Nesta técnica, cerca 3 mL de cada uma das amostras foi levada a secar em banho maria a 50°C e

os resíduos foram dissolvidos em 1 mL de etanol 96° v/v e 2 mL de ácido clorídrico 9% v/v. Para cada amostra testada, foi transferido 1 mL para 3 tubos de ensaio. Foram adicionadas duas gotas dos reativos gerais para alcaloides: Mayer (mercúrio tetraiodeto de potássio), Dragendorff (tetraiodeto bismuto de potássio) e Bouchardart (iodo-iodeto de potássio). O aparecimento de precipitado de diferentes colorações indica reação positiva para alcaloides, sendo o branco para o reativo de Mayer, cor tijolo para o reativo de Dragendorff e alaranjado para o reativo de Bouchardat.

5.5 Cromatografia em Camada Delgada

A Cromatografia em Camada Delgada (CCD) foi realizada com o precipitado do extrato alcaloídico (PEA) obtido da extração alcaloídica ácida, e também com o extrato bruto (EB), extrato sem goma (ESG) e extrato goma (GOMA), o qual foi o material de partida para a obtenção desse precipitado. E como controle de esgotamento de alcaloides, das extrações ácidas e alcalinas dos extratos bruto, sem goma, goma, folhas, galhas do fruto e frutos normais. Estas amostras foram solubilizadas em metanol na concentração de 1 mg/mL e aplicadas, com o auxílio de capilares, em cromatoplasmas de sílica gel 60 UV254, da marca Whatman®, de dimensões 20 x 20 cm. Após a revelação, as placas foram observadas a olho nu e sob luz ultravioleta. O QUADRO 3 apresenta as proporções de fases móveis e os solventes, assim como os reveladores utilizados nesta análise. Os resultados foram registrados como presença (+) ou ausência (-) dos grupos de compostos descritos.

QUADRO 3 – COMPOSIÇÃO DE FASES MÓVEIS E REVELADORES DA CROMATOGRRAFIA EM CAMADA DELGADA

CONSTITUINTE QUÍMICO	FASE MÓVEL	REVELADOR	RESULTADO ESPERADO	METODOLOGIA
Esteroides e Triterpenos	Tolueno/acetato de etila (93:7)	Vanilina sulfúrica (1%)	Presença de banda azul violácea e/ou verde (a olho nu) Presença de banda marrom escura (polifenóis)	Wagner: Blatt, 1996
Flavonoides e Taninos	Acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético glacial: água (100: 11: 11: 26)	Reativo de NEU (Flavonoide)	Presença de banda verde e/ou amarela e/ou laranja e/ou castanha (sob luz UV - 254 nm)	Wagner: Blatt, 1996
		Cloreto Férrico (taninos e polifenóis)	Presença de banda azul (taninos hidrolisados) e/ou verde escura (taninos condensados) Presença de banda castanha escura a preto (polifenóis) (a olho nu)	Wagner: Blatt, 1996
Alcaloides	Clorofórmio: metanol (95: 5) universo amônio (NH ₄ OH)	Dragendorff	Presença de banda de coloração tijolo (a olho nu)	Valente et al., 2006
Cumarinas	Tolueno: Acetato de etila (80:20)	Reativo de NEU e NaOH 1N	Presença de banda azul fluorescente sob luz UV (254 nm) que se intensifica com adição de NaOH	Miguel, 2003

FONTE : O autor 2018.

5.6 CROMATOGRRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foi realizada uma curva com o padrão dicentrina nas concentrações 5, 10, 15, 20 e 30 e dosagens das extrações alcalinas dos extratos bruto, sem goma, goma, folhas, galhas do fruto e frutos normais e comparadas suas concentrações.

Foram diluídas em metanol e submetidas à análise por CLAE/DAD (Merck Hitachi® Elite Lachrom) para avaliação do perfil cromatográfico. As condições de injeção foram: coluna analítica XTerra® RP18 (4,6 mm x 250 mm, partículas 5 µm) a 25°C, volume de injeção de 20 µL e fluxo 1,00 mL/minuto. O tempo de corrida foi de 18 minutos e a detecção foi realizada por varredura de espectro de 200 a 400 nm. A eluição ocorreu em gradiente de concentração utilizando uma fase ácida (ácido

fosfórico PA: ácido sulfúrico 0,1N: água miliQ, na proporção 2: 200: 800 mL) (Fase A) e Metanol (Fase B), conforme descrito no QUADRO 4.

QUADRO 4 – MÉTODO POR GRADIENTE EMPREGADO NAS ANÁLISES DE CLAE/DAD TEMPO (minutos) FASE A: FASE ÁCIDA FASE B: METANOL FLUXO DE INJEÇÃO

TEMPO (minutos)	FASE A: FASE ÁCIDA	FASE B: METANOL	FLUXO DE INJEÇÃO
0	62%	38%	1 mL
18	25%	75%	1 mL

FONTE: O autor (2018).

5.7 IDENTIFICAÇÕES DE ALCALOIDES

5.7.1 Difractometria de raios X de monocristal

Durante a extração alcaloídica ácida da goma ocorreu a precipitação de cristais, após a secura, os cristais foram submetidos à identificação por cristalografia de raio X. O precipitado isolado foi analisado por difratometria de raios X de monocristal (DRXM) realizado pelo departamento de química da UFPR. Os dados de difração foram coletados empregando um difratômetro Bruker – D8 Venture equipado com detector de área Photon 100 CMOS, duas fontes de radiação monocromática de Mo-K α ($\lambda = 0,7107 \text{ \AA}$) e Cu-K α ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$), e dispositivo Kryoflex II, para a realização de coletas a baixa temperatura. A análise foi realizada a 200 K utilizando-se a fonte de Cu-K α . Para a realização da análise foi selecionado um fragmento cristalino de uma porção de cristais imersos em óleo mineral, o qual foi transferido cuidadosamente para um *micro-mount* que foi fixado no goniômetro do difratômetro. Os dados foram processados utilizando o programa APEX3. Os parâmetros de célula unitária encontrados foram comparados com dados da literatura utilizando a base de dados do CCDC (Cambridge Crystallographic Data Centre) O diagrama da estrutura foi construído com o auxílio do programa ORTEP-3 para Windows (FARRUGIA, 2012).

5.7.2 Ressonância Magnética Nuclear

A substância isolada também foi submetida a análises espectrocópicas para confirmação da estrutura, através de Ressonância Magnética Nuclear, realizada no Centro de RMN do departamento de bioquímica da UFPR.

Os cristais foram diluídos em DMSO-d₆ contendo 0.1 % (v/v) de TMS e analisada em espectrômetro de RMN Bruker AVANCE III 400, operado a 9,4 Tesla, observando os núcleos de ¹H e ¹³C nas frequências de 400,1 e 100,6 MHz, respectivamente. Equipamento equipado com sonda multinuclear de detecção direta (X-núcleo e 1 H) de 5 mm e gradiente de campo no eixo z). Foram adquiridos espectros de RMN de ¹H, e experimentos bidimensionais em 400 MHz de correlação direta 1 H- ¹³C (HSQC) e correlação a longa distância 1 H- ¹³C (HMBC), a temperatura ambiente (~ 20 °C). Os deslocamentos químicos de H e de ¹³C foram expressos em ppm e referenciados em relação ao sinal do tetrametilsilano (TMS), referência interna, em 0,00 ppm. Os dados obtidos foram comparados com os dados de literatura.

6.0 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Para avaliar uma possível atividade antioxidante foram utilizadas duas metodologias: Redução do complexo fosfomolibdênio. (PRIETO; PENEDA; AGUILAR, 1999) e avaliação da capacidade de redução do radical DPPH•. (MENSOR et al., 2001). Para as duas metodologias, as amostras testadas foram o extrato bruto (EB), extrato sem goma (ESG), extrato goma (GOMA) e precipitado da extração alcaloídica (EA).

A técnica de avaliação da atividade antioxidante com formação de complexo fosfomolibdênio é fundamentada na redução do molibdênio (VI) a molibdênio (V), pela amostra com capacidade antioxidante, e formação de um complexo fosfatomolibdênio (V), em pH ácido apresenta de coloração verde, o qual é determinado espectrometricamente. (PRIETO; PENEDA; AGUILAR, 1999). O método de redução do radical DPPH• é usual, rápido e simples. As amostras que apresentam atividade antioxidante reduzem o radical livre DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazila), pela permuta de elétrons ou átomos de hidrogênio. (MENSOR et al., 2001).

6.1.1 Redução do complexo fosfomolibdênio

Para a realização deste ensaio, as amostras testadas e os controles positivos (ácido ascorbico, hidroxitolueno butilado (BHT) e rutina) foram preparadas na concentração de 200 µg/mL. O solvente utilizado para a mistura foi o metanol, para controles e amostras. Para a reação de formação do complexo foi necessário o preparo, de um reativo que consiste de uma solução aquosa de ácido sulfúrico 0,6 mol, fosfato de sódio 28 mmol e molibdato de amônio 4 mmol. Em tubos de ensaio, para cada amostra, foi pipetado uma alíquota de 0,3 mL, e adicionado 3 mL de reativo. O mesmo processo foi realizado com os controles positivos. O branco foi constituído de 0,3 mL de metanol e 3 mL de reativo. Os tubos foram tampados e colocados em banho-maria a 95°C por 90 minutos. Ao retornar a temperatura ambiente, foi realizada a leitura das absorvâncias (Abs) em microplacas com fundo redondo de 96 poços em formato de 'U', no comprimento de onda de 690 nm em espectrofotômetro Multiscan FC, Thermo Scientific ®. A análise das amostras foi realizada em triplicata. Os resultados estão expressos como atividade antioxidante relativa (AAR%) da amostra em relação ao ácido ascórbico, BHT e rutina (padrões considerados com atividade antioxidante 100%). A fórmula (1) demonstra o cálculo de atividade antioxidante frente a estes padrões:

$$(1) AAR (\%) = \frac{Abs_{amostra} - Abs_{branco} \times 100}{Abs_{padrão} - Abs_{branco}}$$

A análise de variância foi determinada pelo teste ANOVA e a diferença estatística entre as médias dos resultados obtidos pelo teste de Tukey, sendo que valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Para estes estudos, utilizou-se o software Sisvar versão 5.6. (FERREIRA, 2014).

6.1.2 Redução do radical do DPPH•

Foram preparadas em metanol, soluções iniciais para cada amostra a ser testada e dos controles positivos na concentração de 1 mg/mL. A partir destas soluções, foram realizadas as diluições nas concentrações propostas, de forma que cada curva tivesse um mínimo de 5 pontos e abrangesse a concentração de IC₅₀ (concentração necessária para exercer 50% da atividade antioxidante). As concentrações testadas das amostras e controles positivos podem ser visualizadas na QUADRO 5.

QUADRO 5 – CONCENTRAÇÕES DOS CONTROLES POSITIVOS E AMOSTRAS TESTADAS NO ENSAIO DE REDUÇÃO DO RADICAL DPPH•

AMOSTRAS	CONCENTRAÇÕES TESTADAS
	(µg/mL)
Ácido ascórbico	5, 6, 7, 8 e 10
BHT	12, 14, 16, 18 e 20
Rutina	10, 12, 14, 18 e 20
Extrato bruto	8, 10, 12, 14 e 16
Extrato sem goma	15, 21, 24, 30 e 36
Extrato goma	2, 4, 14, 16 e 18
Precipitado alcaloídico	400, 500, 600, 700 e 800

FONTE: O autor (2018).

A reação foi realizada em microplaca com fundo redondo de 96 poços em formato de 'U' e em triplicata. Foram pipetados 142 µL de cada solução diluída com adição de 58 µL de solução de DPPH• esta solução foi preparada no dia do teste com concentração de 0,3 mmol/L. Para cada amostra e controle positivo, foi preparado um branco, contendo 142 µL da solução de cada concentração e 58 µL de metanol. Como controle negativo foi preparado, contendo 142 µL de metanol e 58 µL de DPPH•. Após 30 minutos ao abrigo da luz e temperatura ambiente, foi realizada a leitura das absorbâncias das amostras, em espectrofotômetro de luz ultravioleta Multiscan FC, Thermo Scientific[®], com comprimento de onda a 540 nm. A porcentagem da atividade antioxidante (AA%) foi calculada a partir da fórmula (2):

$$(2)\% \text{ atividade antioxidante do DPPH} = \frac{100 - (Abs_{amostra} - Abs_{branco}) \times 100}{(Abs_{controle} - Abs_{branco})}$$

Para cada concentração de amostra e controles testados foram calculados a porcentagem de DPPH•. Por regressão linear foi montado um gráfico, onde a abscissa representa a concentração da amostra e ordenada a média da AA% das amostras de cada concentração. A equação da reta desse gráfico, do tipo $y = ax + b$, serviu de base para determinação do valor de IC₅₀.

A análise de variância foi determinada pelo teste ANOVA e a diferença estatística entre os resultados obtida pelo teste de Tukey, sendo que valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Para estes estudos, utilizou-se o software Sisvar versão 5.6.

6.2 QUANTIFICAÇÃO DO CONTEÚDO TOTAL DE COMPOSTOS FENÓLICOS

A metodologia empregada neste ensaio foi baseada segundo Singleton (1999) com modificações, a técnica se baseia na reação entre o reagente de Folin Ciocalteau com compostos fenólicos, em meio básico, formando um ânion fenolato que reduz o reagente de molibdato em óxido de molibdênio, com formação de um complexo (molibdênio-tungstênio) de coloração azul intensa (ROGINSKY; LISSI, 2005). Inicialmente foi preparada uma solução mãe com concentração de 1 mg/mL, usando metanol como solvente. As amostras foram transferidas para tubos de ensaio, adicionou-se a elas a água e o reagente de Folin-Ciocalteau. Os tubos foram homogeneizados e colocados em repouso por 10 minutos. Posteriormente foi adicionado a essa mistura um solução de carbonato de sódio (Na₂CO₃) 10% e deixado em repouso por 30 minutos conforme QUADRO 6. Após esse período, as absorbâncias das amostras foram verificadas com o comprimento de onda de 760nm no equipamento UV 1800 SHIMADZU®. Todo o ensaio foi realizado em triplicata.

QUADRO 6 – REAGENTES UTILIZADOS NO ENSAIO DE DETERMINAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS

AMOSTRA mL	ÁGUA mL	FOLIN- CIOCALTEAU mL	CARBONATO DE CÁLCIO mL
0,32	3,08	0,2	0,4

FONTE: O autor (2018).

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado em função da curva de calibração feita com o ácido gálico. Os resultados do padrão de ácido gálico obtidos foram colocados no programa Excel[®] em forma de tabela (concentração/absorbância) e com base nestes dados construído um gráfico de dispersão, adicionando linha de tendência, exibindo equação do gráfico e valor de R^2 no gráfico.

Os teores de fenóis totais foram determinados em porcentagem de ácido gálico por grama de amostra. Para a curva de calibração foi utilizada a seguinte equação: $Y = 0,0864 x - 0,05$; $R^2 = 0,9994$. Onde Y é a absorbância e x a concentração final de equivalentes de ácido gálico pela concentração utilizada de extrato.

6.3 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

6.3.1 Avaliação da toxicidade frente a *Artemia salina*

A toxicidade preliminar foi avaliada frente a *Artemia salina*, segundo a metodologia descrita por (MEYER et al., 1982).

A água do mar artificial foi preparada com 38 gramas de sal marinho adquirido da empresa Blue Treasure[®] e 1000 mL de água destilada. O pH foi ajustado para a faixa de 8-9, com Na_2CO_3 para evitar o risco de morte das larvas durante a incubação, mantendo-o na faixa de 6-10,5.

Os ovos de *Artemia salina* (200 mg/ 400 mL) foram colocados em contato com a água do mar artificial para eclodir por 48 horas, aerados por uma hora e expostos à iluminação constante (20 W) e temperatura controlada (27-30 °C).

O estudo foi realizado com as frações extrato bruto (EB), precipitado alcaloídico (PEA), extrato sem goma (ESG) e extrato goma (GOMA) todas diluídas com metanol na concentração 10mg/mL. A partir dessa solução, diluiu-se em três concentrações 10, 100 e 1000 μ g/mL. O solvente foi evaporado por 12 h, a 37°C.

Além do controle negativo (água do mar artificial), os náuplios foram avaliados frente ao solvente (metanol). Como controle positivo foi utilizado o sulfato de quinidina seu preparo foi realizado como descrito para as amostras. Todo o ensaio foi realizado em triplicata.

Para avaliar a toxicidade, após a eclosão dos ovos foram transferidos dez náuplios de *Artemia salina* para frascos de vidro contendo as amostras e controles negativo e positivo. O volume de todos os frascos foram ajustados com 5 mL de água do mar artificial. Os frascos 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 fonte luminosa. Os resultados foram submetidos a tratamento de análise estatística pelo método de Probitos, através do software SPSS®, o qual forneceu os valores CL_{50} (concentração letal para 50% dos indivíduos) com 95% de confiabilidade. Considerou-se amostras ativas as que CL_{50} foram menores que 1000 µg/mL, de acordo com MEYER (1982) e baixa toxicidade quando CL_{50} for superior a 500 µg/mL; moderada para CL_{50} 100 a 500 µg/mL e muito tóxica quando CL_{50} for inferior 100 500 µg/mL de acordo com (AMARANTE et al ., 2011).

6.3.1.1 Atividade hemolítica *in vitro*

O método da atividade hemolítica *in vitro* foi baseado no método descrito por Banerjee et al. (2008). Anteriormente a realização do teste, foi preparada a solução tampão fosfato-salino (PBS), sangue de carneiro desfibrinado adquirido na empresa Newprov®, soluções amostras e controles.

6.3.1.2 Preparo da solução tampão

A solução tampão PBS foi obtida a partir de cloreto de sódio (8,0 g/L), Cloreto de potássio (0,2 g/L), fosfato dissódico (1,15 g/L), fosfato monopotássico (0,2 g/L) e Água (q.s.p. 1000 mL). Após o preparo, o pH foi ajustado para 7,4 (pH ideal) e a solução PBS foi armazenada em geladeira e durante todo o experimento foi mantida na temperatura de 4°C

6.3.1.3 Preparo do sangue

No momento dos ensaios, o frasco de sangue de carneiro foi homogeneizado manualmente e delicadamente evitando hemólise das hemácias. Foram transferidos 3 mL a um tubo de falcon para centrifugação durante 5 minutos a 3000 rpm. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado, e o precipitado lavado com cerca de 5 mL de PBS gelado. O processo se repetiu nas mesmas condições até a obtenção de sobrenadante incolor e límpido. Em seguida, a papa de hemácias resultante foi diluída com PBS para obtenção de uma diluição a 2% (m/v). Para a viabilidade das células a solução foi mantida em temperaturas próximas a 4°C durante todo o ensaio.

6.3.1.4 Preparo das amostras, padrão e controles positivos.

Preparou-se inicialmente para cada amostra a ser testada uma solução-mãe na concentração de 1000 µg/mL, como solvente foi utilizado metanol 10 % e PBS. A partir das soluções mãe, foram realizadas diluições em PBS obtendo as concentrações 100, 250, 500, 750 e 1000 µg/mL. Como controles positivos foram utilizados Triton 1% em PBS e Água potável. Como controle negativo foi utilizado PBS e como padrão, foram preparadas soluções e diluições de Saponina nas mesmas concentrações das amostras. (KARABALIEV; KOCHEV, 2003).

6.3.1.5 Preparo das amostras, padrão e controles positivos

O teste de hemólise foi realizado em eppendorfs e em triplicata, e as reações procederam conforme o QUADRO 7.

QUADRO 7 – REAÇÃO REALIZADA NA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA

AMOSTRAS / BRANCOS / CONTROLES	REAÇÃO
Soluções amostras: Extrato bruto, extrato sem goma, extrato goma e precipitado extrato alcaloídico	200 µL de Amostra + 200 µL de Hemácia 2%
Padrão: diluições saponinas	200 µL saponina + 200 µL de Hemácia 2%
Controle positivo: Triton 1 % em PBS	200 µL Triton 1 % + 200 µL de Hemácia 2%
Controle positivo: Água potável	200 µL Água potável + 200 µL de Hemácia 2%
Branco cor: Soluções Amostras, Padrão, Controles positivos	200 µL soluções amostras/Padrão/Controles positivos + 200 µL PBS
Branco solvente: PBS, PBS + metanol	200 µL PBS/PBS + metanol + 200 µL Hemácia 2 %

FONTE: O autor (2018).

Após a realização das pipetagens, os eppendorfs foram incubados em estufa a temperatura de 37°C durante 3 horas. Em seguida, foram levados para centrifugação a 3000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido, 200 µL, para microplaca com fundo redondo de 96 poços em formato de 'U', para posterior leitura em espectrofotômetro Multiscan FC, Thermo Scientific® na faixa de 540nm.

A porcentagem da atividade hemolítica (AH%) foi calculada, em relação ao Triton 1% e em relação à Água potável, de acordo com as fórmulas (3 e 4):

$$(3) AH (\%)_{Triton} = \frac{(Abs\ Amostra - Abs\ branco\ cor - Abs\ branco\ solvente)}{(Abs\ Triton - Abs\ branco\ cor - abs\ branco\ solvente)} \times 100$$

$$(4) AH (\%)_{\text{Água}} = \frac{(Abs\ Amostra - Abs\ branco\ cor - Abs\ branco\ solvente)}{(Abs\ \text{água} - Abs\ branco\ cor)} \times 100$$

A análise de variância foi determinada pelo teste ANOVA e a diferença estatística entre os resultados obtidos pelo teste de Tukey, sendo que valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Para estes estudos, utilizou-se o software Sisvar versão 5.6. (FERREIRA, 2014).

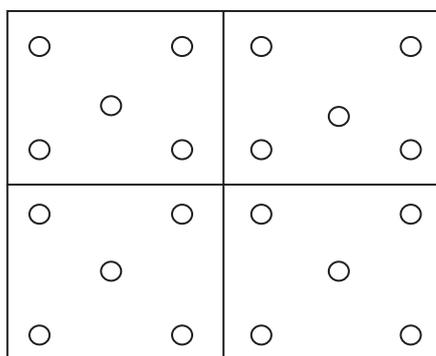
6.4 ATIVIDADE ALELOPÁTICA

O método de avaliação da atividade alelopática foi baseado no método descrito por Macias (2000); Chon (2005) e Dias (2005). Inicialmente, foram preparadas soluções iniciais para cada amostra testada na concentração de 1 mg/mL, como solvente foi utilizado metanol. A partir da solução inicial foram realizadas diluições obtendo as concentrações 100, 250, 500, 750, 1000 $\mu\text{g/mL}$.

Caixas gerbox de poliestireno cristal (11 cm x 11 cm x 3,5 cm) foram limpas com soluções de hipoclorito 0,9 % v/v e álcool 70%. Para cada amostra e controles testados, foram utilizadas 2 gerbox: uma para a verificação da germinação e outra para o crescimento. Em cada caixa foram colocados 2 papéis filtro Whatman n° 6, anteriormente autoclavados a 121° C/1 atm por 40 minutos. Como controles, foram utilizados água e metanol. Em fluxo laminar, foram transferidos 6 mL de cada concentração para as caixas gerbox. Para o controle com metanol, foram transferidos 6 mL de solvente. As amostras e controle metanol novamente em fluxo laminar foram deixados sob temperatura ambiente, por 24 horas, até total evaporação do solvente. Após evaporação total do solvente, as amostras e controle metanol foram resuspendidos com água destilada. Nesta etapa, foi preparado o controle com água pipetando 6 mL de água.

As caixas gerbox foram divididas em 4 quadrantes, que representa a quadruplicata do teste, e em cada um destes quadrantes foram depositadas 5 sementes de alface (*Lactuca sativa* variedade *Grand rapids*), de maneira a ficar igual e simetricamente distribuídas totalizando 20 sementes (FIGURA 8). Após a acomodação das sementes, as caixas foram envoltas em filme plástico e incubadas em estufa BOD (20 ± 5 °C) durante 7 dias.

FIGURA 8 – DISPOSIÇÃO DAS SEMENTES DE *Lactuca sativa* variedade *Grand rapids* NAS CAIXAS GERBOX



FONTE: O autor (2018).

Para a avaliação da germinação, foram realizadas leituras diárias, sempre no mesmo horário, durante 7 dias, retirando as sementes germinadas. Foi calculada a porcentagem de germinação (5) e Índice de velocidade de germinação (IVG) (6)

$$(5) (\%) \text{ germinação} = \frac{\text{germinação amostra}}{\text{germinação controle negativo}} \times 100$$

Onde: Germinação amostra: número de sementes germinadas nas caixas de amostra;
Germinação controle: número de sementes germinadas nas caixas de água destilada.

$$(6) IVG = \frac{n1}{1} + \frac{n2}{2} + \frac{nx}{x} + \dots + \frac{n7}{7}$$

Onde: IVG: Índice de velocidade de germinação;
n1: Número de sementes germinadas no dia 1;
n2: Número de sementes germinadas no dia 2;
nx: Número de sementes germinadas no dia x;
n7: Número de sementes germinadas no dia 7.

A verificação do crescimento foi realizada no último dia do teste, quando foram medidos o crescimento da radícula e hipocótilo com o auxílio de papel milimetrado e pinça.

Os resultados de porcentagem de germinação, IVG, crescimento de hipocótilo e radícula, foram analisados estatisticamente pelo teste de Scott-Knott, utilizando o software Sisvar versão 5.6. (FERREIRA, 2014).

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 MATERIAL VEGETAL

A secagem do material vegetal coletado foi realizada em estufa a 40 °C. Após a secagem, o material foi triturado com o auxílio de um moinho de facas e martelos, resultando em 1.341,60 g de galhas secas e umidade de 68,8 % \pm 0,28 desvio padrão (DP). A remoção da água da planta fresca é necessária para manter uma maior estabilidade e evitar um meio reacional propiciado por reações químicas, fenômenos físicos e proliferação microbológica (OLIVEIRA; PETROVICK, 2010).

7.1.1 Maceração

O processo de maceração foi definido neste trabalho principalmente por ser um processo extrativo em temperatura ambiente, evitando a formação de artefatos durante o processo por excesso de temperatura e também por ser um método clássico e relativamente simples de extração. O extrato bruto foi obtido pela maceração 4.300 g de galhas de frutos secos em aproximadamente 4,5 litros etanol 96° v/v. (PANDEY; TRIPATHI, 2014).

7.2 FRAÇÕES DA MACERAÇÃO DE GALHAS E FOLHAS E FRUTOS NORMAIS

7.2.1 Extrato bruto

O extrato bruto etanólico obtido da maceração foi filtrado em funil Büchner à vácuo. A umidade em estufa a 40 °C foi de 75,7 % \pm 0,61 DP. A quantidade de extrato bruto seco foi de 476,38 g, correspondendo a 35,51% de galhas base seca. O resíduo do funil colocado para secar em estufa a 50 °C foi de 865,22 g de material seco e descartado, correspondendo a 64,49 % das galhas base seca.

7.2.2 Extrato goma e extrato bruto sem goma

O volume do extrato bruto da maceração depois da redução para 1/3 de seu volume inicial em banho maria a 40 °C e a goma foi precipitada com álcool etílico 96° na proporção de 3 volumes de álcool para 1 volume de extrato (3:1 v/v) que após seca em estufa a 50 °C forneceu 362,60 g de extrato goma, equivalente a 27,03 % do peso das galhas, base seca. Após a extração da goma, o extrato bruto etanólico foi seco em banho maria a 40 °C, fornecendo 113,78 g de extrato bruto sem goma.

7.3 EXTRAÇÕES ALCALÓIDICAS

Nas frações obtidas da maceração das galhas de frutos, extrato bruto, extrato goma e extrato bruto sem goma, foram observados a presença de alcaloides em CCD com reativo de Dragendorff. A presença de alcaloides em *Ocotea puberula*, principalmente a dicentrina já citados em estudos anteriores. (ZANIN, 2006; MONTRUCCHIO, 2012).

Para confirmação da presença da dicentrina nas galhas de frutos, foram triturados 200 g de galhas de frutos in natura em moinhos de faca em álcool etílico e colocado em ultrassom por 2 horas, filtrado em funil de Büchner à vácuo e completado o volume em balão volumétrico para 500 mL. Foi diluído 5 mL do extrato em 5 mL de álcool etílico, centrifugado a 4.000 rpm por 5 min para eliminar resíduos e colocado em geladeira por 12 horas e em seguida centrifugado novamente a 4.000 rpm por 10 min, filtrado em 0,45 µm e injetado no CLAE usando dicentrina como padrão. Fase móvel formada pela fase ácida A com 1,24 mM de heptanosulfonato de sódio, 0,029 M de ácido fosfórico (H₃PO₄) e 0,01 M de ácido sulfúrico (H₂SO₄), fase B com metanol (MeOH) e fase C com acetonitrila (ACN) e água na proporção 9:1 (v/v), confirmando a presença da dicentrina nas galhas, sendo portanto os trabalhos direcionados para avaliação do perfil e quantificação dos alcalóides nas galhas de frutos, folhas, frutos e frações da maceração das galhas.

7.3.1 Extração alcaloídica dos extratos bruto, sem goma, goma, folhas, galhas do fruto e frutos normais em meio ácido

A extração alcaloídica com diclorometano (DCM) em meio ácido do extrato goma por partição em funil de separação foi conduzida usando-se 10,0 g de extrato goma, 50 mL de HCl a 2% e 50 mL de DCM em 4 extrações sucessivas. A fase aquosa alcalinizada com NH_4OH até pH 10 e feita a extração de alcalóides com DCM, resultou em 7,18% de extrato alcaloídico. Com a alcalinização da fase aquosa ácida até pH 10, ocorreu a formação de precipitado, que recuperado, solubilizado em acetona e seco em banho maria a 50°C , resultou em 3,61% de precipitado seco.

Nova extração alcaloídica com clorofórmio (CHCl_3) em meio ácido do extrato goma por partição em funil de separação foi realizada com 10,0 g de extrato goma, 9 mL ácido clorídrico (HCl) 10% e 75 mL de água com 3 extrações sucessivas de 25 mL de CHCl_3 resultou em 5,73 % de extrato alcaloídico e 1,58 % de precipitado. Observou-se a presença de alcaloides em CCD com revelador Dragendorff, tanto no extrato alcaloídico quanto no precipitado em ambos experimentos. Aparentemente o método de extração alcaloídica com DCM em meio ácido não foi adequado para o extrato goma por não conseguir a recuperação total dos alcalóides. A goma foi submetida a extração alcaloídica com DCM em extrator de Soxhlet com 100,0 g de amostra, resultando em 2,93 % de extrato alcaloídico e 5,59 % de precipitado. A extração alcaloídica foi repetida em extrator de Soxhlet com 105,0 g da mesma amostra, resultando em 2,41 % de extrato alcaloídico e 7,40 % de precipitado. O extrato bruto da maceração foi submetido extração alcaloídica com DCM em meio ácido em extrator de Soxhlet com 45,0 g de amostra e resultou em 3,48% de extrato alcaloídico e 9,66% de precipitado. Os dados estão apresentados na TABELA 2.

TABELA 2 – RESULTADOS DAS EXTRAÇÕES ALCALOÍDICAS POR SOLVENTE EM MEIO ÁCIDO

Amostra	Solvente	Método	Extrato alcaloídico (%)	Precipitado (%)
Extrato Goma	DCM	Partição em funil	7,71	3,61
Extrato Goma	CHCl_3	Partição em funil	5,73	1,58
Extrato Goma	DCM	Soxhlet	2,93	5,59
Extrato Goma	DCM	Soxhlet	2,41	7,4
EB	DCM	Soxhlet	3,48	9,66

FONTE: O autor (2018).

LEGENDA: Extrato bruto (EB), Diclorometano (DCM), clorofórmio (CHCl_3)

Os resultados do processo de extração alcaloídica com solvente orgânico em meio ácido de extrato goma e extrato bruto apresentaram a mesma dificuldade com a presença de alcalóides tanto no precipitado, como no extrato alcaloídico da fase aquosa alcalinizada. Com estes resultados, o método de extração alcaloídica com DCM em meio ácido foi considerado inadequado tanto em funil como em extrator de Soxhlet para o objetivo de quantificar a dicentrina nas frações da maceração. Possivelmente as características e a quantidade do extrato goma no extrato bruto influenciaram no processo extrativo dos alcalóides.

Pelo fato do nitrogênio dos alcalóides possuir 2 elétrons não compartilhados conferindo caráter básico a esses alcalóides, ocorra ligação química com os sítios ativos da goma, por exemplo, com ácidos urônicos. Assim, o uso do método de extração alcaloídica com solvente orgânico em meio alcalino foi utilizado (SILVA et. al., 2007; FISCHER, 2016) para evitar a formação de precipitado no processo extrativo, sendo usado no desenvolvimento deste trabalho com bons resultados.

7.3.2 Extração alcaloídica dos extratos bruto, sem goma, goma, folhas, galhas do fruto e frutos normais em meio alcalino

O método de extração alcaloídica com solvente em meio alcalino foi realizado inicialmente alcalinizando a amostra com NH_4OH , fazendo a extração de alcalóides com solvente orgânico em ciclos diários até o esgotamento da amostra. Na sequência foi feita a extração dos alcalóides da fase orgânica com HCl 5% em ciclos diários até o esgotamento de alcalóides da fase orgânica. A fase aquosa ácida foi então alcalinizada com NH_4OH até pH 10 e feita a extração de alcalóides com DCM em extrator de Soxhlet até o esgotamento dos alcalóides da fase aquosa ácida. O extrator de Soxhlet foi usado devido à baixa temperatura de ebulição do DCM.

O controle do esgotamento dos alcalóides foi acompanhado em CCD com reativo de Dragendorff e com reação negativa de alcalóides para os reativos de Mayer, Bouchardat e Dragendorff em meio ácido. O processo de extração alcaloídica foi em temperatura ambiente pode ser visualizado na TABELA 3, com ciclos de extração diária, estimulado por ultrassom e agitação magnética diária não contínua. Por este método, foi eliminada a presença de precipitado na alcalinização da fase aquosa ácida.

TABELA 3 – RESULTADOS DAS EXTRAÇÕES ALCALOÍDICAS POR SOLVENTE EM MEIO ALCALINO

Amostras	Peso seco (g)	Ciclos de extração alcalina		Ciclos de extração ácida HCl 5%
		CH ₂ Cl ₂	CHCl ₃	
Galhas	2	9	3	10
EB	1,14	5	7	14
ESG	1,07	5	7	11
Extrato Goma	1,06	-	7	10
Frutos normais	10	9	4	10
Folhas	5	9	6	12

FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: Extrato bruto (EB), Extrato bruto sem goma (ESG) Diclorometano (DCM), clorofórmio (CHCl₃), ácido clorídrico (HCl)

Os resultados obtidos de extratos alcaloídicos brutos das amostras com solventes orgânicos em meio alcalino estão apresentados na TABELA 4.

TABELA 4 – RESULTADO PARA EXTRATO ALCALOÍDICO BRUTO DAS AMOSTRAS

Amostras	Porcentagem (%)
Galhas	12,03
EB	31,54
ESG	14,62
Extrato Goma	9,05
Frutos normais	6,79
Folhas	2,95

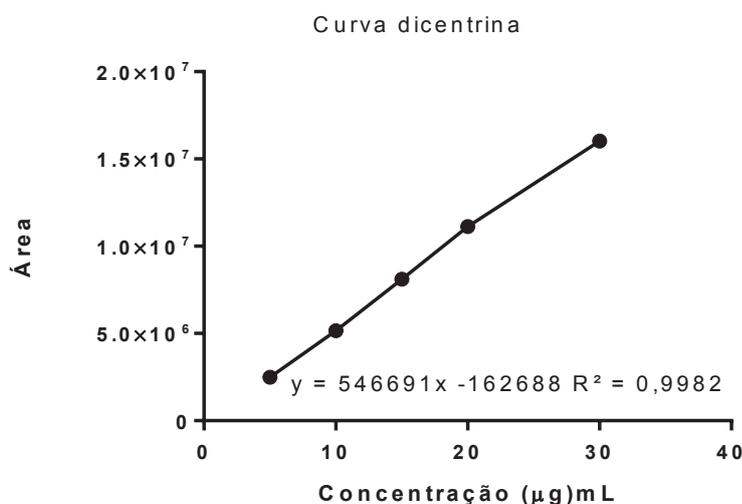
FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: Extrato bruto (EB), Extrato bruto sem goma (ESG)

7.4 CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Para a quantificação da dicentrina nos extratos alcaloídicos das amostras foi realizada uma curva padrão do alcaloide dicentrina em triplicata nas concentrações de 5, 10, 15, 20 e 30 µg.mL para verificação de linearidade, conforme GRÁFICO 1, resultando na equação $Y = 546691x - 162688$ e coeficiente de correlação $R^2 = 0,9982$.

GRÁFICO 1 – CURVA DE LINEARIDADE DA DICENTRINA



FONTE: O autor (2019).

Para o doseamento do alcaloide dicentrina nas galhas e frações de maceração de galhas (EB, GOMA, ESG), os extratos alcaloídicos respectivos foram solubilizados em metanol na concentração de 100 µg.mL e os extratos alcaloídicos de frutos normais e folhas solubilizados em metanol na concentração de 1.000 µg.mL para que pudesse ser quantificado, já que em concentrações de 100 µg.mL o espectro apresentou apenas sinais na faixa de ruído não sendo considerado a observação de nenhum pico cromatográfico que pudessem indicar a presença da substância. Estes resultados estão representados na TABELA 5.

TABELA 5 – DOSEAMENTO DA DICENTRINA NOS EXTRATOS ALCALOÍDICOS BRUTOS

Extratos alcaloídicos	Área	Dicentrina (µg/mL)	g Dicentrina/ 1g amostra	%
EB	4000406	7,62	0,0762	7,62
Ext. Goma	16746520	30,93	0,3093	30,93
Ext. Galhas	3728755	7,12	0,0712	7,12
ESG	2447896	4,78	0,0478	4,78
Ext. Folhas	67733656	124,2	0,1242	12,42
Ext. Frutos normais	2434781	4,75	0,0048	0,48

FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: Extrato bruto (EB), Extrato Goma, Extrato Galhas, Extrato bruto sem goma (ESG), Extrato Folhas, Extrato Frutos normais.

Quanto a presença de alcaloides nas galhas pode se considerar que uma grande variedade de metabólitos secundários de plantas possui nitrogênio em sua estrutura, como aminoácidos, amidas, ácidos nucleicos, nucleosídeos, nucleotídeos, proteínas, purinas, enzimas, vitaminas, hormônios e incluídos neste grupo os alcalóides, glicosídeos cianogênicos e glicosinolatos. (TAIZ; ZEIGER, 2002; PALLARDY, 2008).

A quantidade de nitrogênio nas plantas é variável dependendo do tecido, a idade ou estágio de desenvolvimento e a estação. Nas plantas decíduas e perenes, a concentração de nitrogênio no tecido lenhoso tende a aumentar durante o outono e o inverno, diminui quando o crescimento começa e depois aumenta novamente, à medida que o crescimento diminui e cessa. (SNOEIJERS, et al., 2000)

Apesar de sua ampla ocorrência em plantas, nenhum papel fisiológico essencial foi encontrado para alcaloides. Os alcalóides, parecem simplesmente ser subprodutos do metabolismo do nitrogênio e que de maneira geral não causam danos nem beneficiam as plantas que os produzem e podem desencorajar ataques de patógenos nas plantas. (PALLARDY, 2008).

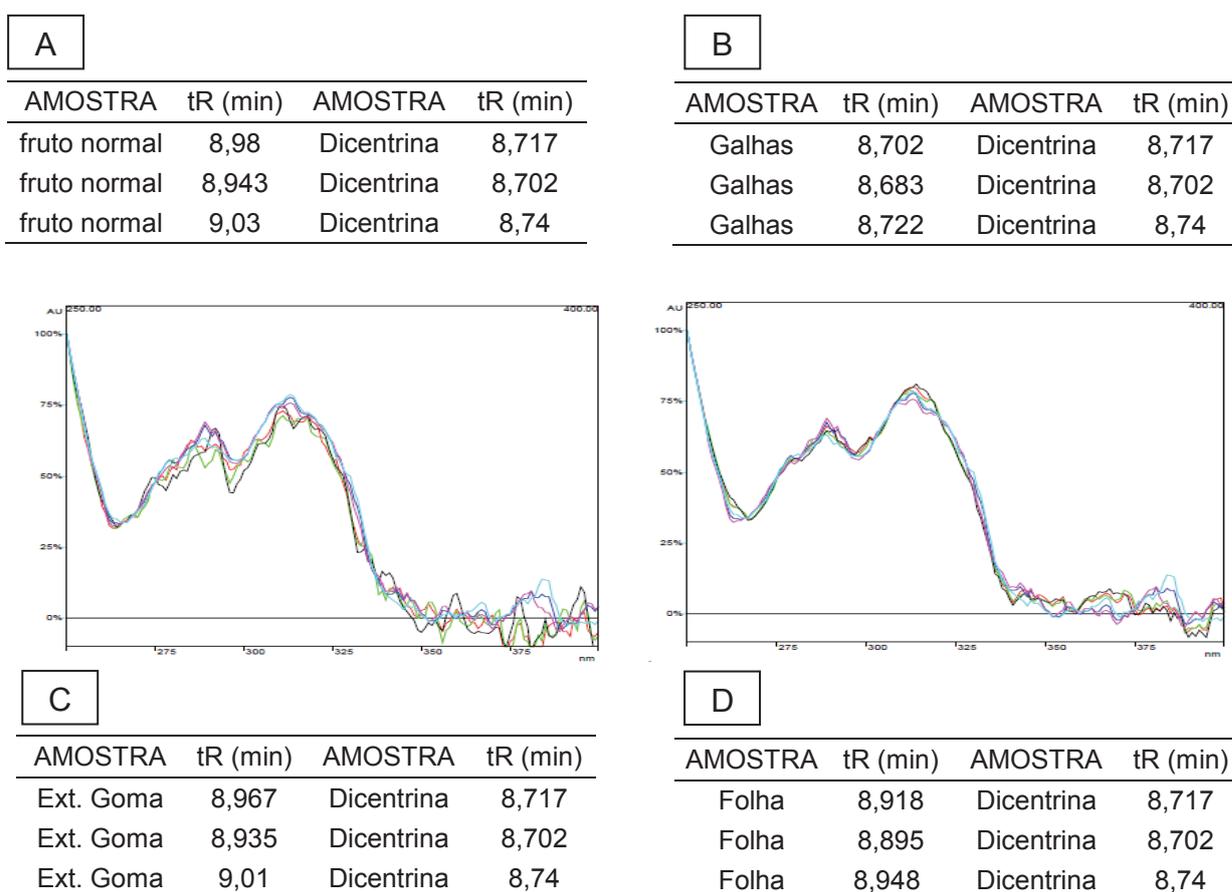
Gomas são compostos de massa molecular alta, de natureza polissacarídica. Essas substâncias ocorrem em certos órgãos da planta e são resultados de lesões que o vegetal sofreu devido a traumatismos e ação de micro-organismos. Quimicamente, as gomas são caracterizadas por conter ácidos urônicos, açúcares comum e sempre apresentam estrutura ramificada na planta que podem interagir com os dois elétrons não compartilhados do nitrogênio sendo assim justificando o

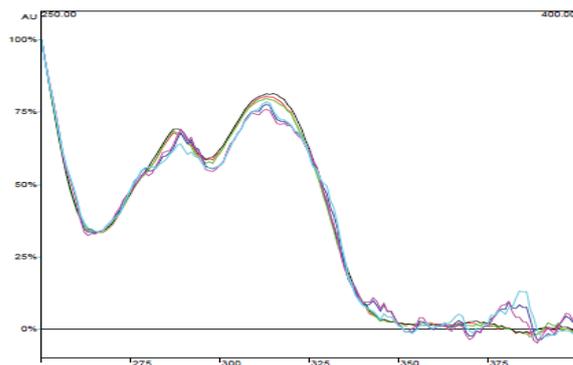
alto valor de dicentrina na fração goma. (POSER, 2017). Estes resultados obtidos com alcalóides sugerem a ação de fungos nos frutos de *Ocotea puberula* concomitante com mecanismos de defesa da planta contra esses fungos, formando galhas e utilizando alcalóides.

A identidade do composto pode ser comprovada, pelo o uso de um padrão dicentrina, sobrepondo pontos crescentes, médios e decrescentes dos espectros das galhas, goma, extrato bruto, folhas e frutos normais com a substância padrão, no qual obteve similaridade de > 99,0 %. Estes resultados estão representados nas FIGURAS 9 e 10.

FIGURA 9 – SOBREPOSIÇÃO ESPECTRAL DOS EXTRATOS DAS GALHAS, EXTRATO GOMA, EXTRATO BRUTO, FOLHAS E FRUTOS NORMAIS.

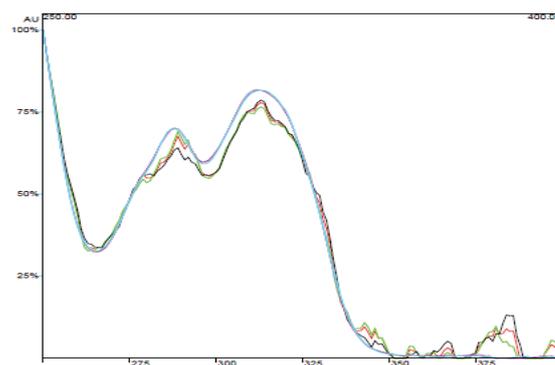
continua





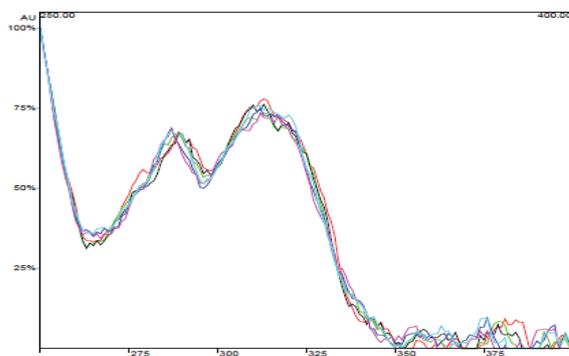
E

AMOSTRA	tR (min)	AMOSTRA	tR (min)
EB	8,805	Dicentrina	8,717
EB	8,787	Dicentrina	8,702
EB	8,833	Dicentrina	8,74



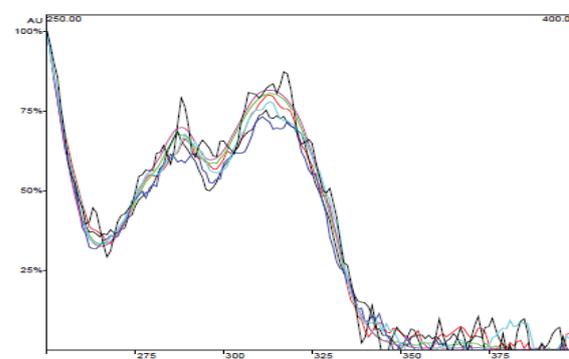
F

AMOSTRA	tR (min)	AMOSTRA	tR (min)
ESG	8,805	Dicentrina	8,717
ESG	8,750	Dicentrina	8,702
ESG	8,835	Dicentrina	8,74



G

AMOSTRA	tR (min)	AMOSTRA	tR (min)
Galha	8,7	Folha	8,917
EB	8,607	Fruto normal	8,99
Goma	8,968	Dicentrina	8,718
ESG	8,75		

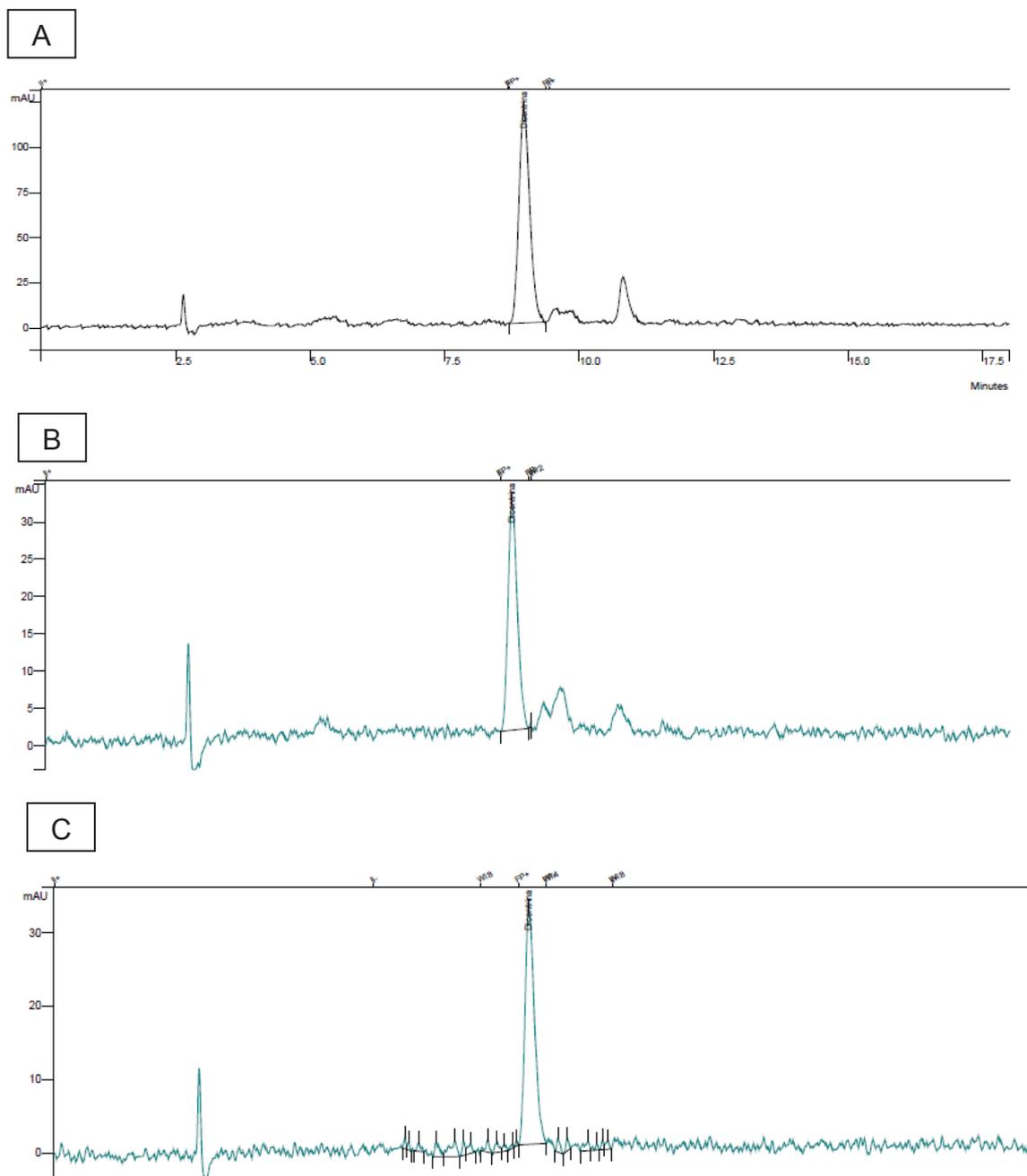


FONTE: O autor (2019).

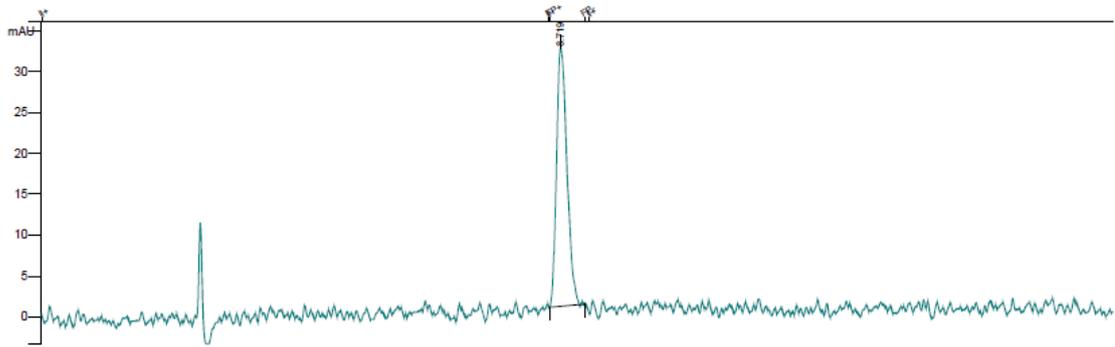
LEGENDA: (A) Sobreposição espectral dos extratos das galhas; (B) Sobreposição espectral do extrato goma; (C) Sobreposição espectral do extrato bruto (EB); (D) Sobreposição espectral das folhas; (E) Sobreposição espectral dos frutos normais; (F) Sobreposição espectral do extrato sem

goma (ESG) (G) Sobreposição espectral de um ponto de galhas, goma, extrato bruto, extrato bruto sem goma, folhas e frutos normais.

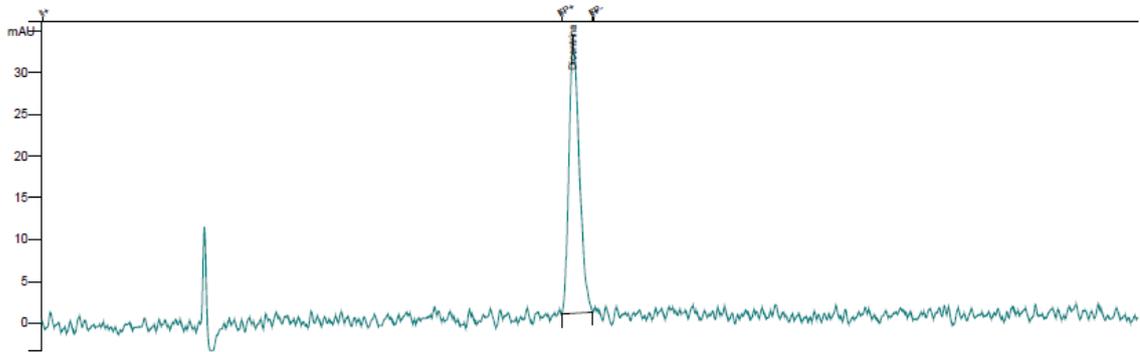
FIGURA 10 – CROMATOGRAMA PADRÃO DICENTRINA, GALHAS, EXTRATO GOMA, EXTRATO BRUTO, EXTRATO BRUTO SEM GOMA, FOLHAS E FRUTOS NORMAIS.



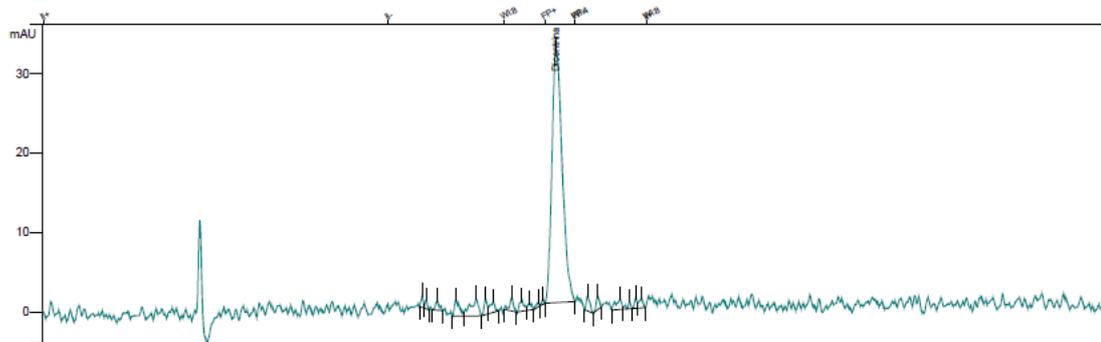
D



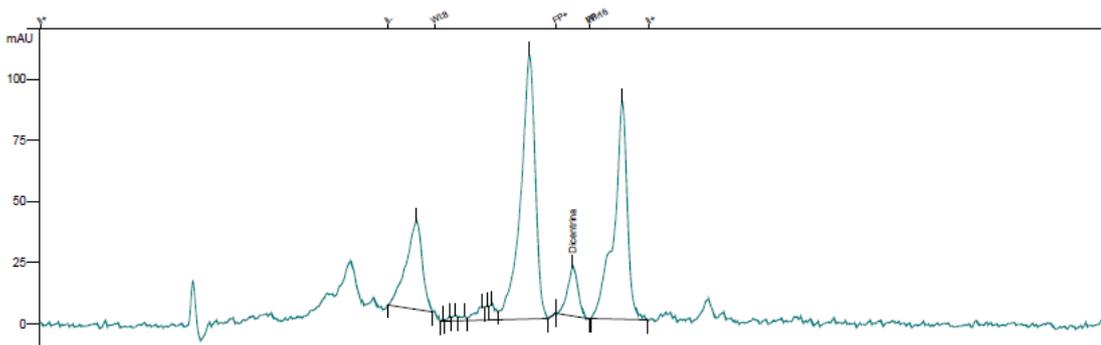
E



F



G



FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: (A) Cromatograma padrão dicentrina; (B) Cromatograma das galhas; (C) Cromatograma Do extrato goma; (D) Cromatograma do extrato bruto; (E) Cromatograma do extrato sem goma (F) Cromatograma das folhas; (G) Cromatograma dos frutos normais.

7.5 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

A cromatografia em camada delgada (CCD) é uma das técnicas mais utilizadas para a separação e identificação de compostos naturais, sendo considerado um método simples, rápido, eficiente e de baixo custo. Os resultados obtidos, mostrando os grupos de metabolitos encontrados no extrato bruto, extrato sem goma, goma e precipitado do extrato alcaloídico, como pode ser visto na TABELA 6.

TABELA 6 – CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA PARA A PESQUISA DE METABOLITOS NOS EXTRATO BRUTO, EXTRATO SEM GOMA, EXTRATO GOMA E PRECIPITADO DO EXTRATO ALCALOÍDICO.

MÉTABOLICOS	EB	ESG	GOMA	PEA
ESTEROIDES/TRITERPENOS	+	+	-	-
COMPOSTOS FENÓLICOS	+	+	-	-
ALCALOIDES	+	+	+	+
CUMARINAS	-	-	-	-

FONTE: O autor (2018).

LEGENDA: (-) negativo; (+) positivo, Extrato bruto (EB), Extrato sem goma (ESG), Precipitado extrato alcaloídico (PEA) extrato goma (GOMA).

Como podemos observar, a pesquisa de compostos fenólicos foi positiva para extrato bruto e extrato sem goma, com a observação de uma banda amarela. Para cumarinas, a reação foi negativa em todas as amostras. A pesquisa de esteroides e triterpenos foram positivo para duas amostras extrato bruto e extrato sem goma com o aparecimento de uma banda violácea. Todas as amostras tem em comum um grupo específico de metabólitos, os alcaloides, que apresentaram banda de coloração vermelho tijolo. A banda presente no precipitado, apresentou se única, sendo característico de uma substância pura.

7.6 IDENTIFICAÇÕES DE ALCALOIDES

No processo de extração alcaloídica do extrato goma com solvente orgânico em meio ácido, quando a fase aquosa ácida foi alcalinizada com NH_4OH até pH 10, ocorreu a formação de um precipitado amorfo que foi recuperado, solubilizado em acetona e seco em banho maria a 50°C .

O precipitado foi redissolvido em MeOH, centrifugado a 4.000 rpm por 10 minutos para eliminação de resíduos insolúveis e deixado em bancada para evaporação do solvente por 48 horas em temperatura ambiente. Em seguida foi adicionado solvente hexano para redução de polaridade do meio e colocado em freezer por 12 horas para cristalização da amostra, sendo encaminhada para identificação por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e difratometria de raio X. O padrão dicentrina também foi submetido à difratometria de Raio X para comparação de dados.

7.6.1 Difratometria de raios X de monocristal

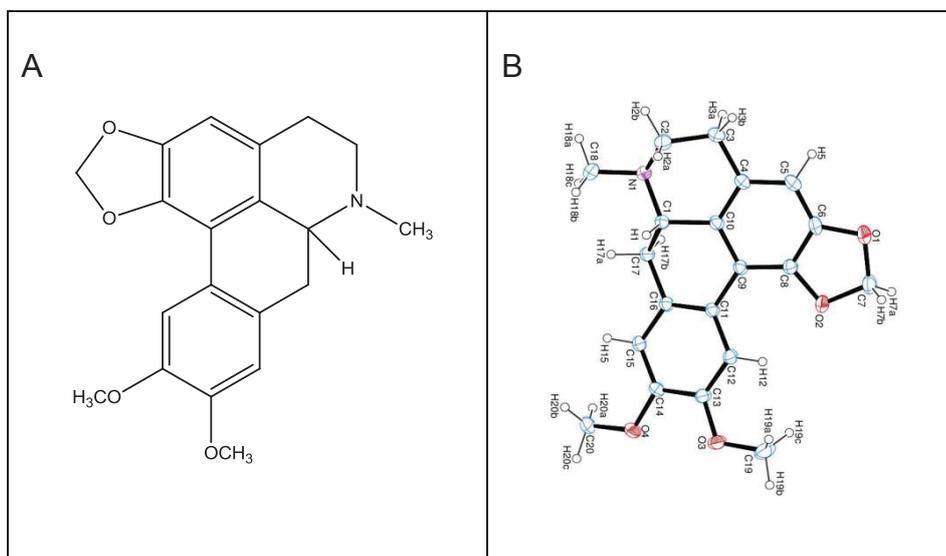
Após análise de Difratometria de raios X de monocristal, foi possível verificar que os parâmetros de célula unitária obtidos estavam de acordo com a estrutura do padrão dicentrina (TABELA 7). O diagrama Ortep foi desenhado a partir do arquivo de informação cristalográfica (Crystallographic Information File, CIF) sendo inédito no âmbito de cristalografia e tendo sua estrutura comparada e confirmada por RMN como poder ser visualizado na FIGURA 11.

TABELA 7 – PARÂMETROS DE CÉLULA UNITÁRIA UTILIZADOS NA IDENTIFICAÇÃO DA ESTRUTURA CRISTALINA

Parâmetros	Padrão Dicentrina	Amostra
Fórmula elementar	$\text{C}_{20} \text{H}_{21} \text{N} \text{O}_4$	$\text{C}_{20} \text{H}_{21} \text{N} \text{O}_4$
Massa molecular	339.38	339.38
Sistema cristalino	Ortorrômico	Ortorrômico
Grupo espacial	P 21 21 21	P 21 21 21
Dimensão célula unitária	a = 7.71(2)	a = 7,71
	b = 13.13(4)	b = 13,14
	c = 16.78(5)	c = 16,81
	alfa=beta=gama=90 graus	alfa=beta=gama=90 graus
Volume	1699.05(8)	1703.0
Temperatura de análise	200 K	200 K

FONTE: O autor (2019).

FIGURA 11 – ESTRUTURA DA DICENTRINA OBTIDA POR RMN (A) E POR DIFRATOMETRIA DE RAIOS X (B).



FONTE: O autor (2019).

7.6.2 Ressonância Magnética Nuclear

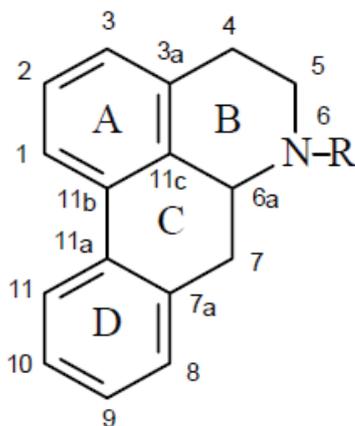
No espectro de RMN de ¹H do PEA (FIGURA 1) foram observados três singletos em δ 6,76 (1H), δ 7,02 (1H) e δ 7,60 (1H) os quais foram atribuídos aos hidrogênios H-3, H-8 e H-11 respectivamente. Foi observado também no espectro de RMN de ¹H dois dupletos em 6.05 e 6.19 ambos com constante de acoplamento de 0.91, característicos de hidrogênio metilenodioxólico (OCH₂O), o que pode ser confirmado pela correlação direta desses hidrogênios com o carbono metilênico (δ 101.19), no experimento de HSQC (FIGURA 2). Dois singletos em δ 3.81 e δ 3.77 ambos com interação três foram atribuídos à presença de dois grupamentos metoxílicos (OCH₃) na estrutura, esses hidrogênios mostraram correlação direta com os carbonos δ 55.48 e δ 55.67 no experimento de HSQC. Observou-se no experimento de HSQC correlação entre o carbono δ 40.76 com o hidrogênio δ 2,56 referente ao carbono metílico ligado ao nitrogênio. Esses dados fornecidos pela análise de RMN, comparados com os presentes na literatura TABELA 8 confirmaram a presença da dicentrina FIGURAS 12, 13, 14, 15 e 16.

TABELA 8 - COMPARAÇÃO DOS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE RMN DE ^1H E DE ^{13}C DA DICENTRINA.

Dicentrina alcaloide				
^{13}C	δ_{H} experimental	δ_{H} literatura ^a	δ_{C} experimental	δ_{C} literatura ^a
1			142.06	141.80
2			147.54	146.66
3	6.76 (1H, s)	6.51 (1H, s)	106.59	106.75
3a			124.51	126.49
4	3.31 (m) e 2.86 (m)	-	25.5	28.98
5	3.36 (m) and 3.65 m	-	51.49	53.47
6a	4.33 m		60.76	62.31
7	2.97 m	2.66 (1H, dd, $j=14,3; 14,3$)	29.76	34.06
	3.43 m	3,19 (1H, dd, $J =$ 14,3; 4,42)		
7a			125.68	128.19
8	7.02 (1H, s)	-	112.05	110.45
9			148.64	148.23
10			147.77	147.66
11	7.60 (1H, s)	7,66 (1H, s)	110.55	111.21
11a			121.93	123.47
11b			115.67	116.59
11c			120.51	126.30
N-CH3	2.97 (3H, s)	2,56 (3H, s)	40.76	43.67
9-OCH3	3.81 (3H, s)	3,91 (3H, s)	55.48	55.86
10-OCH3	3.77 (3H, s)	3,92 (3H, s)	55.67	56.08
-O-CH2-O-	6.05 e 6.19 (1H cada $J=0,91$)	5,92 e 6,07 (1H cada, d, $J = 1,5$)	101.19	100.63

Os deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C são expressos em ppm em relação ao sinal do TMS como referência em δ 0,00 ppm. As constantes de acoplamento J são expressas em Hz^a (ZHOU, B.N. *et al.*, 2000).

FIGURA 12 - EXTRUTURA MOLECULAR DA DICENTRINA



FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: R= CH₃

FIGURA 13 - EXPECTRO DE RMN ¹H DA DICENTRINA. ANÁLISE REALIZADA EM (DMSO DE TMS 400 MHz, 30°C)

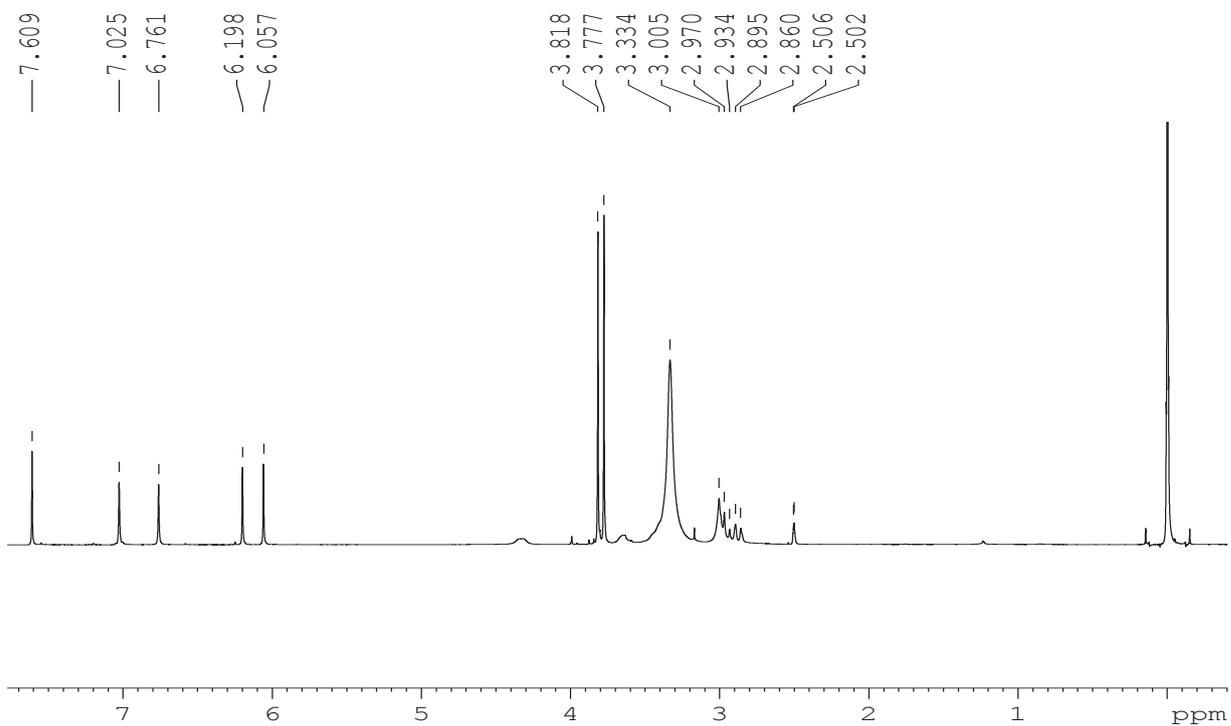


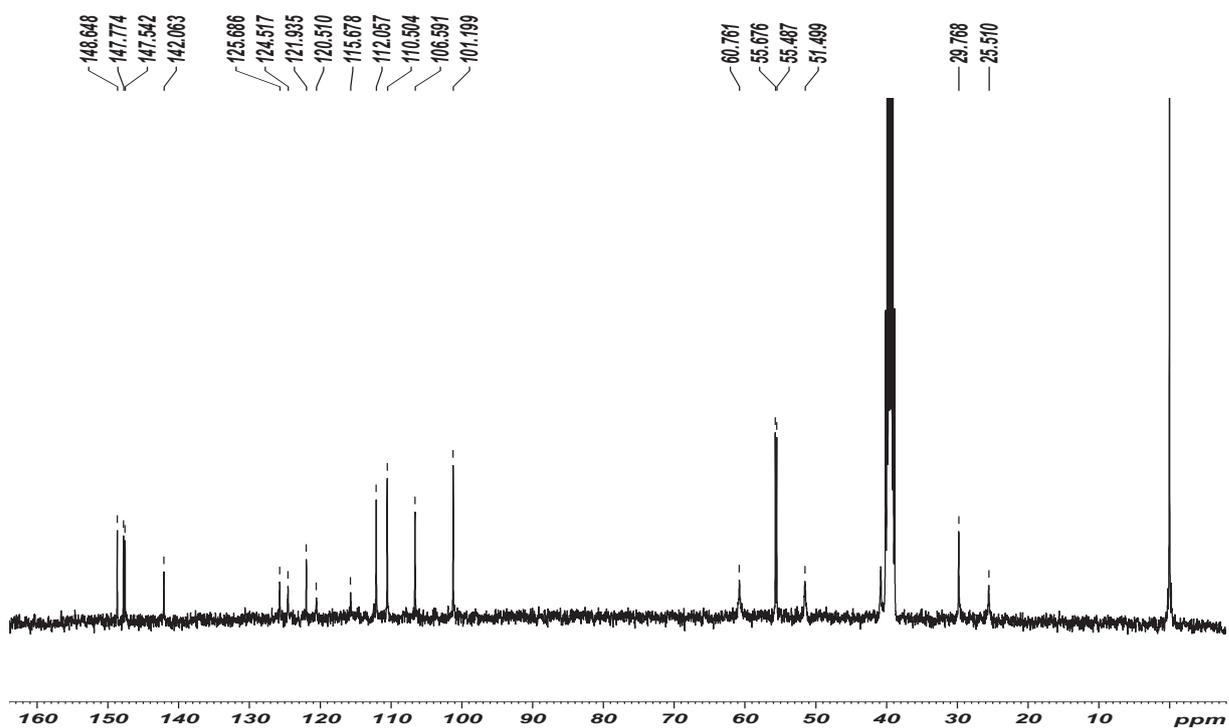
FIGURA 14 - ESPECTRO DE RMN ^{13}C DA DICENTRINA. ANÁLISE REALIZADA EM (DMSO DE TMS 400 MHz, 30°C)

FIGURA 15 - ESPECTRO DE HSQC DICENTRINA EM (DMSO DE TMS 400 MHz, 30°C)

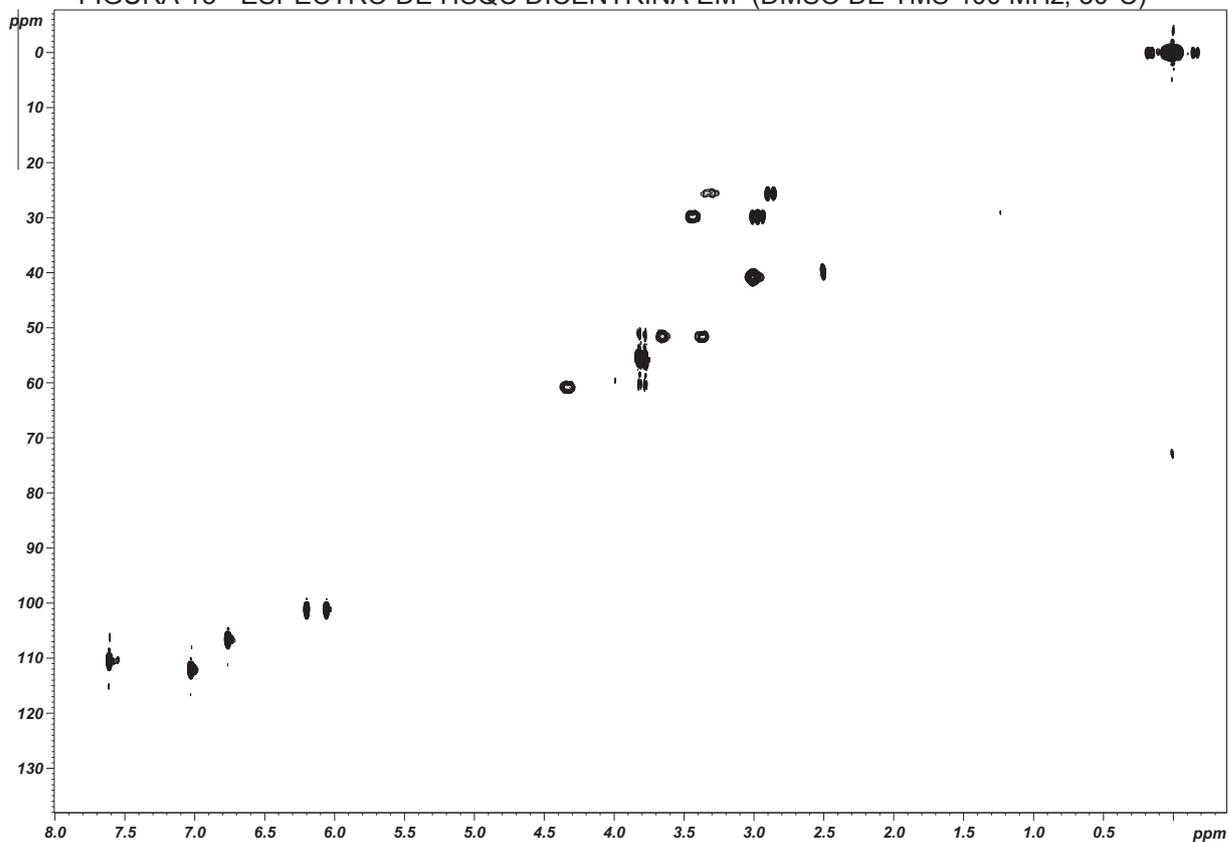
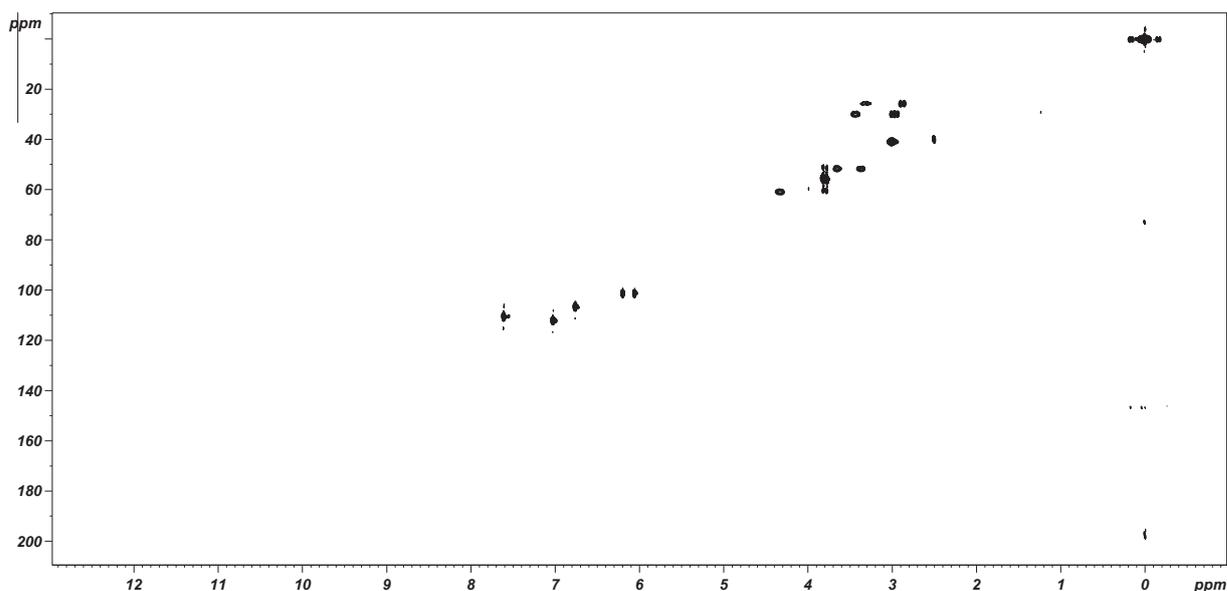


FIGURA 16 - ESPECTRO DE HMQC DICENTRINA EM (DMSO DE TMS 400 MHz, 30°C)



7.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

7.7.1 Redução do complexo fosfomolibdênio

Este ensaio tem como princípio a avaliação da oxidação ocorrida no reativo, por compostos lipofílicos e hidrofílicos. As amostras (extrato bruto, extrato sem goma, extrato goma e precipitado extrato alcaloídico) foram calculadas utilizando como padrões comparativos: BHT, Rutina e o Ácido ascórbico, onde as atividades foram consideradas como 100%. Os resultados obtidos estão expressos na TABELA 9, FIGURA 17.

TABELA 9 – RESULTADOS OBTIDOS NA AVALIAÇÃO DA REDUÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO DAS AMOSTRAS FRENTE À RUTINA, BHT E ÁCIDO ASCÓRBICO

Amostra	AAR % ¹ Rutina		AAR % ¹ BHT		AAR % ¹ Ácido ascórbico	
	Média ± DP	Teste de Tukey ²	Média ± DP	Teste de Tukey ²	Média ± DP	Teste de Tukey ²
Rutina	100	a2	-	-	-	-
BHT	-	-	100	a2	-	-
Ácido ascórbico	-	-	-	-	100	a2
Goma	70,59 ± 7,8	a1	30,42 ± 2,0	a1	12,97 ± 1,08	a1
ESG	57,28 ± 1,5	a1	24,76 ± 1,0	a1	10,54 ± 0,2	a1
EB	59,92 ± 21,9	a1	25,55 ± 8,2	a1	10,95 ± 3,75	a1
PEA	48,65 ± 7,1	a1	21,16 ± 4,28	a1	8,99 ± 1,58	a1

FONTE: O autor (2018).

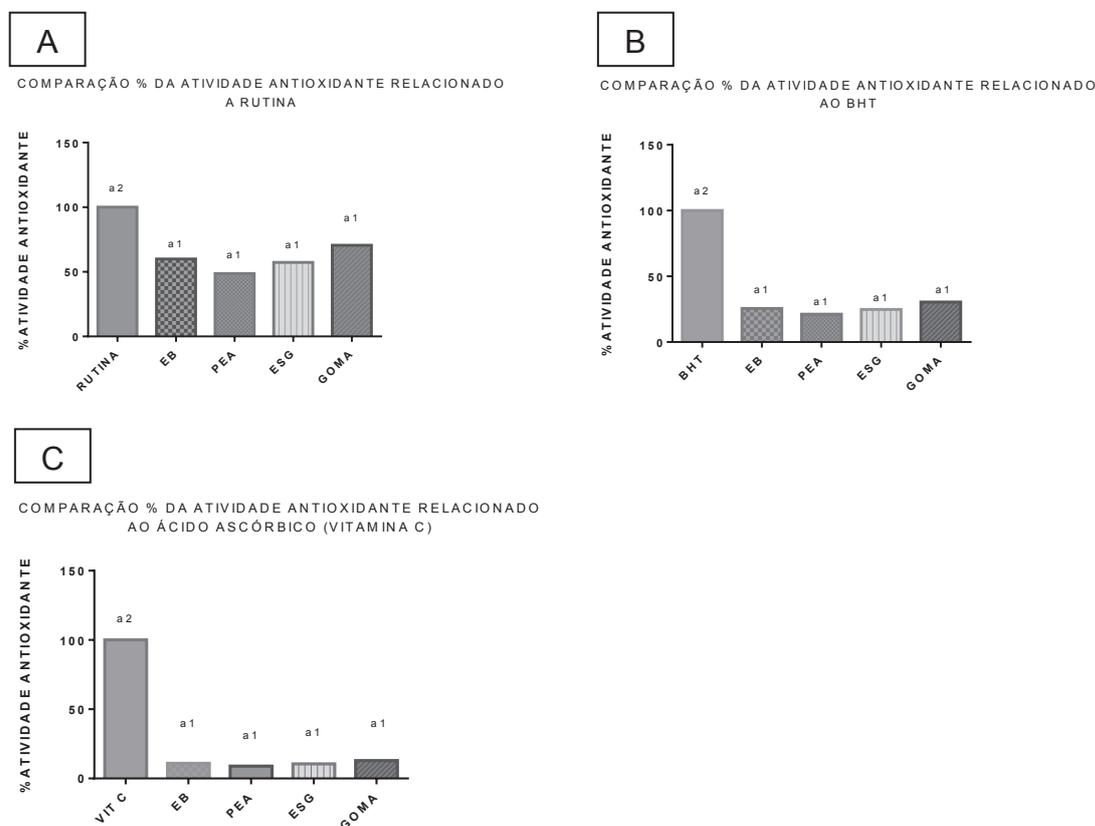
NOTA 1: Amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente ($p < 0,05$) entre si, pelo teste de Tukey.

LEGENDA: Desvio Padrao (DP), Hidroxitolueno butilado (BHT), Extrato bruto (EB), Extrato sem goma (ESG), Precipitado extrato alcaloídico (PEA), Extrato goma (Goma)

A partir dos dados representados na tabela, pode se avaliar que todas as amostras demonstraram atividade antioxidante por formação do complexo fosfomolibdênio que estatisticamente não foi significante. Os resultados das amostras testadas apresentaram atividade antioxidante com resultados mais significativos frente à Rutina, seguidos de BHT e Acido ascórbico. A fração que mais se aproxima estatisticamente comparado ao padrão rutina é o extrato goma seguida do extrato bruto, extrato sem goma e precipitado extrato alcaloídico.

Embora o resultado em relação ao BHT tenham sido menor do que os resultados obtidos em comparação a rutina, as frações goma e extrato bruto demonstraram resultado considerável de 30,42% e 25,55% respectivamente.

FIGURA 17 - CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO DAS AMOSTRAS COMPARADAS A RUTINA, BHT E VITAMINA C



FONTE: O autor, 2019

NOTA 1: Hidroxitolueno butilado (BHT), Extrato bruto (EB), Extrato sem goma (ESG), Precipitado extrato alcaloídico (PEA), Extrato goma (Goma).

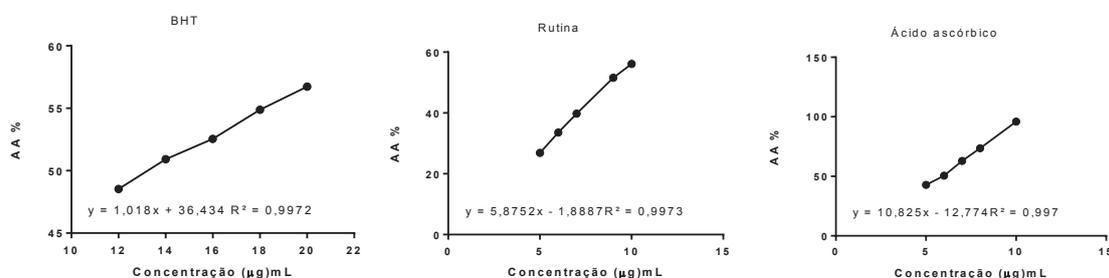
LEGENDA: (A) Capacidade de formação do complexo fosfomolibdênio das amostras comparadas a rutina (B); Capacidade de formação do complexo fosfomolibdênio das amostras comparadas ao BHT; (C) Capacidade de formação do complexo fosfomolibdênio das amostras comparadas ao ácido ascórbico (vitamina c).

7.7.2 Redução do radical do DPPH•

A avaliação da atividade antioxidante de extratos pelo método do DPPH• é simples e preciso quando comparado a outras técnicas. O ensaio se baseia na capacidade antioxidante de uma determinada substância em sequestrar o DPPH• que tem capacidade de aceitar um radical hidrogênio para tornar-se uma molécula diamagnética estável, o difenil-picrilhidrazina. Sendo assim, ocorre a mudança simultânea na coloração de violeta a amarelo pálido resultando desaparecimento da absorção, monitora pelo decréscimo da absorbância. (SÁNCHEZ-MORENO, 2002)

A partir dos resultados obtidos determina-se a porcentagem de DPPH• remanescente no meio reacional (% de DPPH• que não foi reduzida a hidrazina). Para cada amostra e padrão testados foram calculados a IC₅₀ por regressão linear, onde foi plotado um gráfico em que a abscissa representa a concentração da amostra e a ordenada e a porcentagem da atividade antioxidante (AA%) das médias obtidas das concentrações. O GRÁFICO 2 apresenta as curvas obtidas para a determinação da IC₅₀ dos padrões utilizados e o GRÁFICO 3 para as amostras testadas.

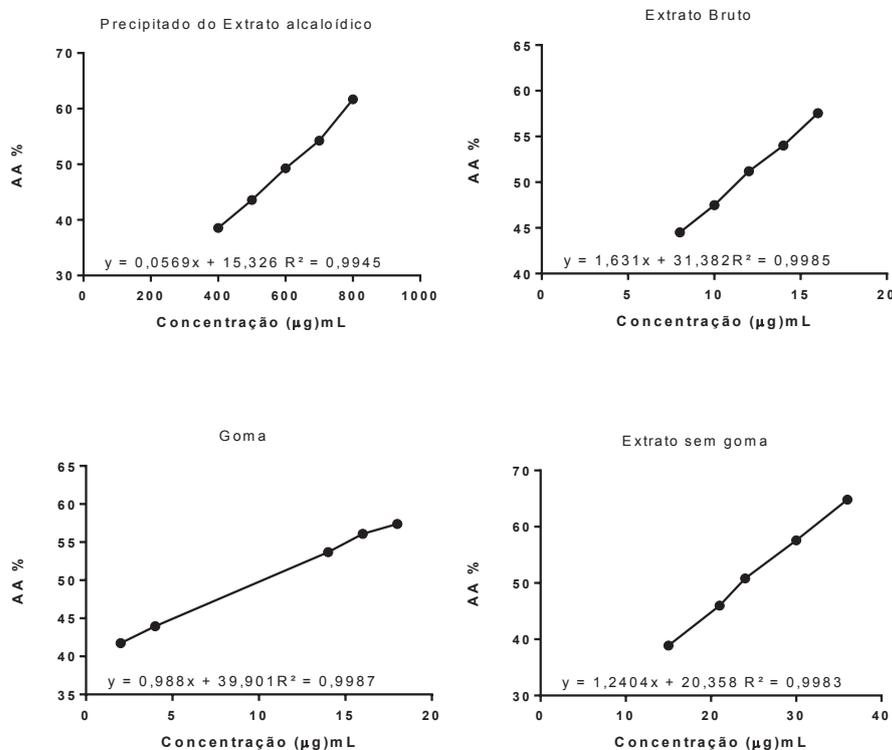
GRÁFICO 2 – CURVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS PADRÕES PELA REDUÇÃO DO DPPH•



FONTE: O autor 2018

NOTA 1: Hidroxitolueno butilado (BHT)

GRÁFICO 3 - CURVA DA PORCENTAGEM DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATO BRUTO, EXTRATO SEM GOMA, EXTRATO GOMA E PRECIPITADO DO EXTRATO ALCALOÍDICO PELA REDUÇÃO DO DPPH•



FONTE: O autor 2019

LEGENDA: Extrato bruto (EB), Extrato sem goma (ESG), Precipitado extrato alcaloídico (PEA), Extrato goma (Goma).

A partir das curvas de obtidas foi possível determinar a IC₅₀, concentração necessária para exercer 50% da atividade antioxidante ou reduzir 50% da concentração inicial de DPPH•. Estes resultados estão representados, por suas médias, na TABELA 10.

TABELA 10 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELA REDUÇÃO DO RADICAL DPPH• DO EXTRATO BRUTO, EXTRATO SEM GOMA, EXTRATO GOMA, PRECIPITADO DO EXTRATO ALCALOÍDICO E PADRÕES.

Amostra	IC ₅₀ (µg/mL)	±DP	Classificação do teste de Tukey
Ácido ascórbico	5,93	± 0,017	a1
BHT	13,32	± 0,433	a1 a2
Rutina	8,38	± 0,200	a2
EB	11,39	± 0,330	a1 a2
ESG	23,89	± 0,206	a3
GOMA	10,16	± 0,478	a1 a2
PEA	609,5	± 6,823	a4

FONTE: O autor (2018).

NOTA 1: Amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente ($p < 0,05$) entre si, pelo teste de Tukey.

LEGENDA: Desvio Padrão (DP), Hidroxitolueno butilado (BHT), Extrato bruto (EB), Extrato sem goma (ESG), Precipitado extrato alcaloídico (PEA), Extrato goma (Goma).

As amostras foram comparadas aos padrões Rutina, BHT e Ácido ascórbico e através dos testes estatísticos de análise de variância – Tukey e Anova – chegou se em 5 grupos que se diferem entre si das 8 amostras testadas.

A fração do extrato goma foi a que apresentou melhor IC_{50} (10,39 $\mu\text{g/mL}$), sendo este resultado inferior ao padrão BHT e estatisticamente similares ao padrão BHT e rutina. A fração extrato bruto apresentou IC_{50} (11,39 $\mu\text{g/mL}$) inferior ao padrão BHT pertencendo também ao mesmo grupo estatístico do padrão BHT e rutina. Assim, em baixas concentrações, as frações são capazes de reduzir 50% de DPPH• do meio reacional, evidenciando sua relevante atividade antioxidante.

As frações que obtiveram as maiores concentrações de IC_{50} e mais se distanciaram dos padrões estatisticamente foram o extrato bruto sem goma e o precipitado extrato alcaloídico, com 23,89 $\mu\text{g/mL}$ e 609,5 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente.

O DPPH• é um radical estável que reage de forma estequiométrica somente com moléculas que sejam boas doadoras de hidrogênio (KEDARE; SINGH, 2011). Dentre essas moléculas destaca-se as que possuem grupos hidroxila ativos, com facilidade de doar hidrogênio, como as vitaminas E e C, polifenóis e flavonoides (LU et al., 2010). Logo se espera que as frações mais polares, apresentem os melhores resultados por possuírem um maior número de compostos com hidroxilas disponíveis. (MENSOR et al., 2001). Assim, o menor valor de IC_{50} para goma pode se atribuir ao fato de ser um polissacarídeo. (POSER, 2017). Os polissacarídeos tem recebido maior atenção, devido entre outras, a atividade antioxidante e pesquisas para produção de fármacos. Estudos demonstraram que os polissacarídeos podem inibir a peroxidação lipídica, e assim melhorar a capacidade de eliminar radicais livres, atividade antienvhecimento, inibição de doença cerebrovascular e de doenças cardiovasculares. (WANG et al., 2017).

Somando-se a isso o extrato bruto tem como resultado da cromatografia em camada delgada, com presença de compostos fenólicos. Além desses fatores, o meio reacional é considerado polar, visto que as amostras e o reativo são preparados em metanol, facilitando a solubilização de moléculas com essa mesma característica físico-química. Em literatura com espécies do gênero *Ocotea* os resultados também se mostraram satisfatórios em relação ao potencial antioxidante,

tais como: *O. odorífera* (CANSIAN et al., 2010); *O. minor* (YAMAGUCHI et al., 2012); *O. bofo* (GUERRINI et al., 2006) entre outros.

7.8 QUANTIFICAÇÃO DO CONTEÚDO TOTAL DE COMPOSTOS FENÓLICOS

O teor de fenóis totais dos extratos de *Ocotea puberula* foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu, os resultados obtidos foram expressos em gramas de equivalentes de ácido gálico por grama (g EAG.g) e estão descritos na TABELA 11

TABELA 11 – TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS (EQUIVALENTE EM ÁCIDO GÁLICO – EAG) DO EXTRATO BRUTO, EXTRATO SEM GOMA, EXTRATO GOMA, PRECIPITADO DO EXTRATO ALCALOÍDICO.

AMOSTRA	COMPOSTOS FENÓLICOS		
	g EAG/ g \pm DP	%	TESTE DE TUKEY
EB	0,1321 \pm 0,0005	13,21	a4
ESG	0,1049 \pm 0,0005	10,49	a1
GOMA	0,1258 \pm 0,0002	12,58	a3
PEA	0,0219 \pm 0,0003	2,19	a1

FONTE: O autor (2018).

NOTA 1: Desvio Padrão (DP), Extrato bruto (EB), Extrato sem goma (ESG), Precipitado extrato alcaloídico (PEA), Extrato goma (Goma).

NOTA 2: Amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente ($p < 0,05$) entre si, pelo teste de Tukey.

De acordo com a classificação de Chew et al. (2011), pode-se afirmar que as amostras de extrato bruto, extrato sem goma e extrato goma apresentaram alto teor de compostos fenólicos ($\geq 0,05$ g.EAG/g), e o precipitado do extrato alcaloídico com médio baixo teor de compostos fenólicos ($\geq 0,01 - 0,03$ g.EAG/g). Fenólicos são os principais componentes antioxidantes dos alimentos. Enquanto em óleos vegetais e gorduras estas são basicamente monofenólicas, os polifenóis solúveis em água são mais típico em produtos polares. Esses compostos podem sequestrar ou neutralizar os radicais livres, quelar metais e intermediar reações estáveis. (ROGINSKY; LISSI, 2005). Os polifenóis constituem uma classe importante de antioxidantes naturais e algumas de suas atividades biológicas possuem propriedades anticancerígenas, antifúngicas, antibacterianas, antivirais, antiulceras e anticolesterol (BADHANI et al., 2015). Estes resultados estão de acordo com os verificados no ensaio do DPPH que apresentaram propriedades antioxidantes. E a

triagem química preliminar realizada em CCD revelou a presença de compostos fenólicos no extrato bruto e extrato sem goma.

7.9 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

7.9.1 Avaliação da toxicidade frente a *Artemia salina*

Este teste tem como principal finalidade ser um modelo de estudo preliminar de toxicidade em micro-organismos, bem como apresentar correlação para atividades farmacológica, antitumoral, antibacteriana e estudos de ecotoxicidade. Extratos de plantas e derivados com alta toxicidade contra a *Artemia salina* sugerem alto potencial para atividades biológicas, sendo útil a utilização deste bioensaio na busca de substâncias bioativas. (AMARANTE et al., 2011). Além disto, o estudo é de fácil realização e baixo custo. (BEDNARCZUK et al., 2010). Os resultados, presentes na TABELA 12, foram avaliados com a da determinação das concentrações letais CL₅₀ e intervalos de confiança de 95% a partir de estudos estatísticos pelo método Probitos.

TABELA 12 – RESULTADOS OBTIDOS NA AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE FRENTE AO EXTRATO BRUTO, EXTRATO SEM GOMA, EXTRATO GOMA E PRECIPITADO DO EXTRATO ALCALOÍDICO.

Teste qui-quadrado					
Amostra	CL ₅₀ (µg/mL) ¹	Intervalo de confiança	Qui- quadrado	Grau de liberdade	Nível de significância
Sulfato de Quinidina 1	352,421	0,342-1,033	26,377	1	0
Sulfato de Quinidina 2	338,258	0,792-1,734	0,119	1	0,73
Goma	1000,023	3,783-10,938	0,005	1	0,94
ESG	1842,126	0,509-1,960	0,112	1	0,73
EB	1239,348	0,392-1,229	1,025	1	0,31
PEA	345,454	0,495-1,272	0,579	1	0,44

Fonte: O autor (2018)

NOTA: (1) CL50: Concentração letal 50 %

NOTA: (2) Extrato bruto (EB), Extrato sem goma (ESG), Precipitado extrato alcaloídico (PEA), Extrato goma (Goma).

Segundo Meyer et al. (1982), as amostras são consideradas tóxicas quando CL_{50} for inferior a 1000 $\mu\text{g/mL}$. Assim, considerando as amostras testadas, apenas o precipitado extrato alcaloídico apresentou atividade tóxica, sendo que as demais não apresentam toxicidade aos organismos avaliados. Já Amarante et al. (2011), descreve uma classificação melhor delimitada: considera-se baixa toxicidade quando a concentração letal 50% (CL_{50}) for superior a 500 $\mu\text{g/mL}$; moderada para CL_{50} entre 100 a 500 $\mu\text{g/mL}$ e muito tóxico quando a CL_{50} for inferior 100 $\mu\text{g/mL}$. Segundo esta classificação, o precipitado extrato alcaloídico (345,454 $\mu\text{g/mL}$) apresenta toxicidade moderada.

Esta toxicidade presente na espécie pode estar relacionada às propriedades biológicas dos compostos majoritários em sua maioria alcaloides. A amostra que apresentou toxicidade moderada é um alcaloide, determinado por cristalografia e ressonância magnética nomeado de dicentrina, tal substância já apresentou toxicidade em outros estudos, como atividade antimicrobiana frente ao *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*. (PABON; CUCA, 2010). Alguns estudos do gênero já evidenciaram tal toxicidade, como na espécie *Ocotea acutifolia* demonstrou elevado potencial genotóxico (GUTERRES et al., 2012), *Ocotea longifolia* apresentou potencial atividade citotóxica (DA SILVA et al., 2016) e atividade antimicrobiana nas espécies *Ocotea caudata*, *Ocotea cujumary*, *Ocotea caniculata*, *Ocotea floribunda*, *Ocotea veraguensis* e *Ocotea whitei*. (DA SILVA et al., 2017). Podendo assim utilizar essa substância em testes para citotoxicidade e genotoxicidade, presentes em estudos de espécies do mesmo gênero de *Ocotea puberula*. O precipitado extrato alcaloídico não demonstrou significativo resultado nas atividades antioxidante e no teor fenólico afirmando a sua toxicidade preliminar.

7.9.2 Atividade hemolítica *in vitro*

O ensaio de hemólise *in vitro*, realizado para extratos brutos, extrato sem goma, goma e precipitado extrato alcaloídico é um teste de triagem de toxicidade, pode se avaliar a ação da amostra sobre o rompimento de eritrócitos. A porcentagem de hemólise foi calculada frente ao Triton 1% (TABELA 13) e Água potável (TABELA 14), considerados como 100%. As concentrações de 100 $\mu\text{g/mL}$ e 250 $\mu\text{g/mL}$ dos extrato bruto e precipitado extrato alcaloídico não apresentaram atividade hemolítica, por isso seus dados não constam nas tabelas.

TABELA 13 – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA DO EXTRATO BRUTO, EXTRATO SEM GOMA, EXTRATO GOMA E PRECIPITADO DO EXTRATO ALCALÓIDICO FRENTE AO TRITON 1 %.

Amostra µg/mL	Hemólise ± DP	Classificação do teste de Tukey
Saponina 100	18,82 ± 2,15	a3 a4
Saponina 250	60,25 ± 3,01	a11
Saponina 500	85,49 ± 0,76	a12
Saponina 750	88,47 ± 3,17	a12
Saponina 1000	84,52 ± 3,06	a12
EB 500	8,526 ± 0,11	a2
EB 750	15,20 ± 0,12	a3
EB 1000	22,31 ± 0,22	a4 a5 a6
GOMA 100	47,77 ± 2,44	a10
GOMA 250	35,60 ± 1,05	a9
GOMA 500	32,42 ± 1,36	a8 a9
GOMA 750	26,33 ± 0,49	a5 a6 a7
GOMA 1000	24,75 ± 1,22	a5 a6 a7
ESG 100	2,670 ± 1,34	a1
ESG 250	21,12 ± 0,66	a4 a5
ESG 500	27,74 ± 1,79	a6 a7 a8
ESG 750	28,04 ± 2,13	a7 a8
ESG 1000	21,11 ± 0,26	a4 a5
PEA 500	8,356 ± 0,84	a1 a2
PEA 750	37,62 ± 6,03	a9
PEA 1000	16,63 ± 3,82	a3 a4

FONTE: O autor (2018).

NOTA 1: Desvio Padrão (DP), Extrato bruto (EB), Extrato sem goma (ESG), Precipitado extrato alcaloídico (PEA), Extrato goma (Goma).

NOTA 2: Amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente ($p < 0,05$) entre si, pelo teste de Tukey.

TABELA 14 – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA DO EXTRATO BRUTO, EXTRATO SEM GOMA, EXTRATO GOMA E PRECIPITADO DO EXTRATO ALCALOÍDICO FRENTE À ÁGUA.

Amostra μg/mL	Hemólise ± DP	Classificação do teste de Tukey
Saponina 100	17,66 ± 2,07	a3 a4
Saponina 250	60,05 ± 1,59	a10
Saponina 500	82,54 ± 0,74	a11
Saponina 750	85,39 ± 3,06	a11
Saponina 1000	81,32 ± 1,54	a11
EB 500	8,236 ± 0,10	a2
EB 750	14,69 ± 0,11	a3
EB 1000	21,55 ± 0,21	a4 a5 a6
GOMA 100	46,16 ± 2,36	a9
GOMA 250	34,40 ± 1,02	a8
GOMA 500	31,33 ± 1,32	a7 a8
GOMA 750	25,45 ± 0,47	a5 a6
GOMA 1000	24,73 ± 1,22	a5 a6
ESG 100	2,58 ± 0,35	a1
ESG 250	20,41 ± 0,64	a4 a5
ESG 500	26,81 ± 1,73	a6 a7
ESG 750	27,09 ± 2,05	a6 a7
ESG 1000	20,40 ± 0,25	a4 a5
PEA 500	8,08 ± 0,82	a1 a2
PEA 750	36,35 ± 5,82	a8
PEA 1000	16,07 ± 3,69	a3 a4

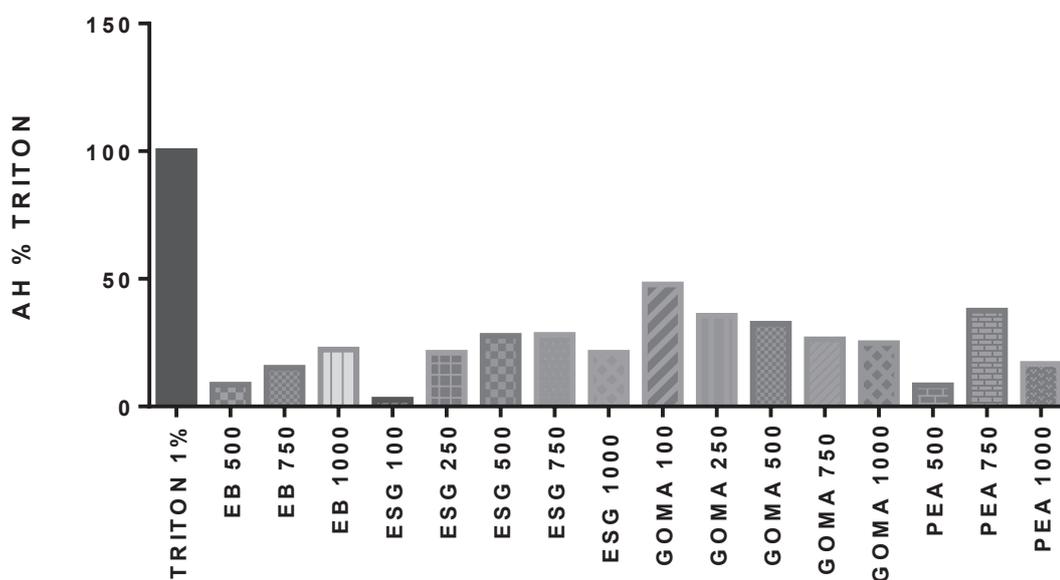
FONTE: O autor (2018).

NOTA 1: Desvio Padrão (DP), Extrato bruto (EB), Extrato sem goma (ESG), Precipitado extrato alcaloídico (PEA), Extrato goma (Goma).

NOTA 2: Amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente ($p < 0,05$) entre si, pelo teste de Tukey.

De acordo com as tabelas, pode-se observar que as amostras que mais se aproximaram estatisticamente frente ao triton e à água foram a goma com 46,16% e 47,77% respectivamente de atividade e a que apresentou menor porcentagem foi o extrato sem goma com 2,58 % 2,67 % de atividade. Nesta concentração, nota-se o aumento da atividade hemolítica em decorrência do aumento da concentração testada, a hemólise também foi testada com o metabólito saponina, padrão fitoquímico da qual a atividade é conhecida e descrita na literatura, estas substâncias são altamente ativas, sendo capazes de causar hemólise dos glóbulos vermelhos com liberação de hemoglobina, mesmo em baixas concentrações (KARABALIEV; KOICHEV, 2003). Uma melhor visualização destes resultados está representada nos GRÁFICO 4 e GRÁFICO 5. Similar à toxicidade frente à *Artemia salina*, o teste de atividade hemolítica é um indicador de citotoxicidade visto que através da avaliação da estabilidade mecânica da membrana do eritrócito de carneiro podemos caracterizar os danos que o composto provoca (hemólise) e correlacionar a toxicidade dos extratos ou frações com potencial de atividade terapêutica. (SHARMA; SHARMA, 2001)

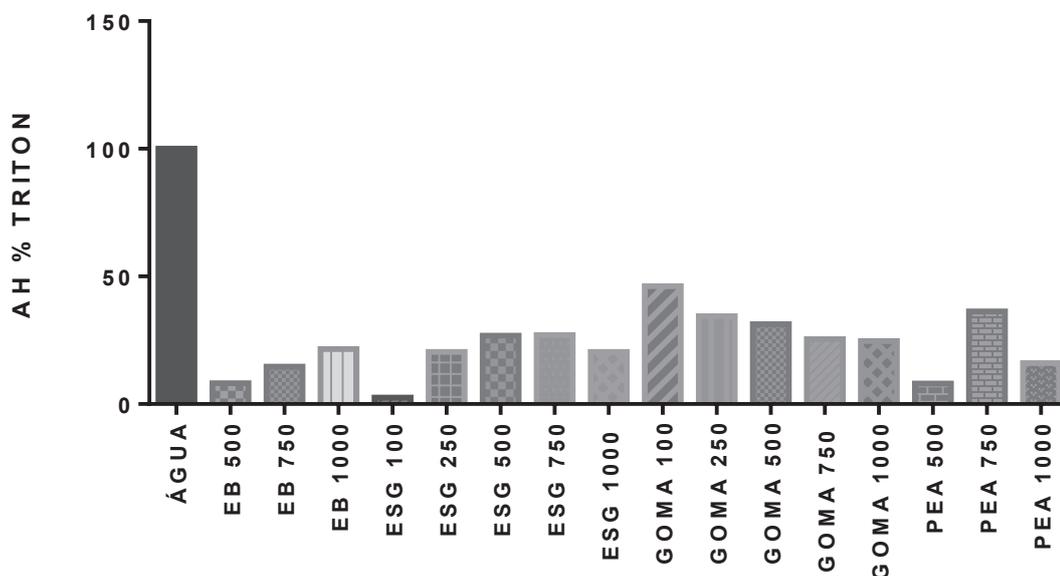
GRÁFICO 4 - CAPACIDADE HEMOLÍTICA DAS AMOSTRAS COMPARADAS AO TRITON 1%



Fonte: O autor (2018)

NOTA: (1) Extrato bruto (EB), Extrato sem goma (ESG), Precipitado extrato alcaloídico (PEA), Extrato goma (Goma).

GRÁFICO 5 - CAPACIDADE HEMOLÍTICA DAS AMOSTRAS COMPARADAS À ÁGUA.



Fonte: O autor (2018)

NOTA: (1) Extrato bruto (EB), Extrato sem goma (ESG), Precipitado extrato alcaloídico (PEA), Extrato goma (Goma).

7.9.3 Atividade alelopática

As plantas produzem substâncias por meio de metabólitos secundários, quando liberados no meio ambiente interferem na capacidade de germinação e no desenvolvimento de outras plantas. (BORELLA; PASTORINI, 2010). A aplicação do estudo da alelopátia é qualificado para avaliar a eficiência de um vegetal em influenciar o crescimento e desenvolvimento de sistemas biológicos e agrônômicos através da liberação de compostos químicos no meio ambiente, denominados como aleloquímicos (REIGOSA et al., 2013). Após liberação dos aleloquímicos, os organismos e o meio ambiente sofrem, interferindo no crescimento e desenvolvimento das plantas, com modificações a nível celular, função de membrana, fito-hormônios, fotossíntese e absorção de nutrientes Este teste e um modelo de estudo preliminar da divisão celular vegetal, servindo como base para o direcionamento de possíveis atividades farmacológicas e imunológicas. (FRANCO et al., 2015).

No ensaio de atividade fitotóxica foi avaliada a influência do extrato bruto, extrato sem goma, goma e precipitado extrato alcaloídico, na germinação e índice de

velocidade de germinação (IVG) de sementes de *Lactuca sativa* cv. Grand Rapids TBR (TABELA 15).

TABELA 15 – RESULTADOS DE GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *Lactuca sativa* cv. Grand Rapids TRATADAS COM CONTROLES E AMOSTRAS PROVENIENTE DE *Ocotea puberula* (RICH.) Nees.

AMOSTRA	Concentração µg/mL	% Germinação		IVG	
		Média e DP	Scot- knott ¹	Média e DP	Scot- knott ¹
CONTROLE ÁGUA	-	-	a2	4,75 ± 0,50	a3
CONTROLE METANOL	-	100 ± 0	a2	4,78 ± 0,43	a3
GOMA	100	100 ± 0	a2	4,75 ± 0,28	a3
	250	95 ± 10	a2	4,45 ± 0,62	a3
	500	100 ± 0	a2	4,62 ± 0,47	a3
	750	100 ± 0	a2	4,87 ± 0,25	a3
	1000	100 ± 0	a2	4,50 ± 0,00	a3
ESG	100	100 ± 0	a2	4,75 ± 0,28	a3
	250	100 ± 0	a2	3,95 ± 0,47	a2
	500	100 ± 0	a2	4,75 ± 0,50	a3
	750	100 ± 0	a2	3,66 ± 0,56	a2
	1000	100 ± 0	a2	4,66 ± 0,38	a3
EB	100	95 ± 10	a2	2,95 ± 0,24	a1
	250	100 ± 0	a2	3,79 ± 0,56	a3
	500	100 ± 0	a2	5,00 ± 0,00	a3
	750	100 ± 0	a2	4,08 ± 1,06	a2
	1000	100 ± 0	a2	4,18 ± 0,47	a2
EA	100	100 ± 0	a2	5,00 ± 0,00	a3
	250	100 ± 0	a2	4,87 ± 0,25	a3
	500	100 ± 0	a2	5,00 ± 0,00	a3
	750	100 ± 0	a2	5,00 ± 0,00	a3
	1000	95 ± 10	a2	4,50 ± 0,40	a3

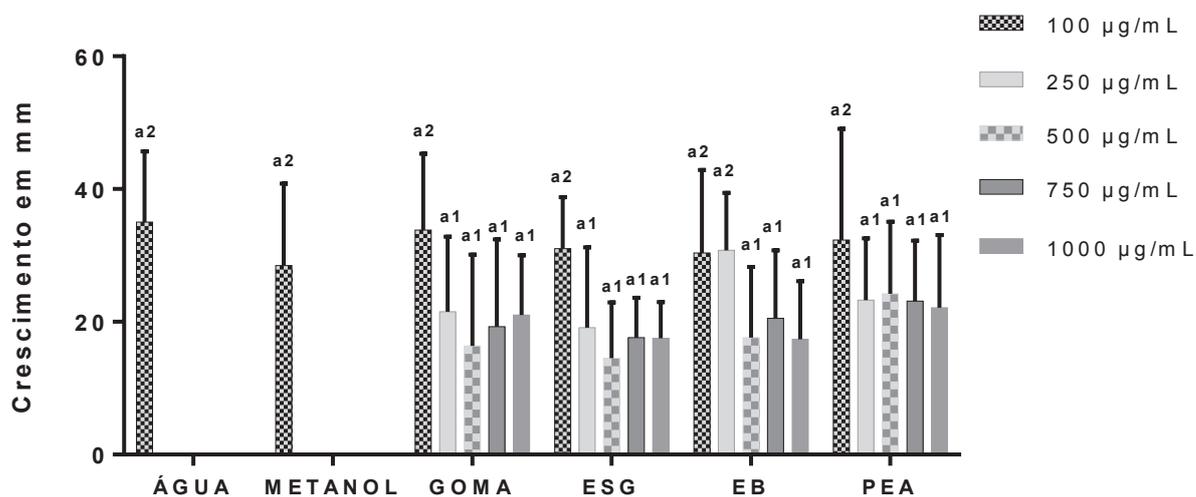
FONTE: O autor (2018).

NOTA 1: Desvio Padrão (DP), Extrato bruto (EB), Extrato sem goma (ESG), Precipitado extrato alcaloídico (PEA), Extrato goma (Goma).

De acordo com a análise estatística, para a porcentagem de germinação não foram significativos. Sendo assim, pode se dizer que nenhuma das amostras testadas influenciou na germinação. Para o índice de germinação algumas amostras se distanciaram estatisticamente dos controles, diminuindo a velocidade de germinação nas amostras, extrato sem goma concentrações 250 µg/mL e 750 µg/mL e extrato bruto 100 µg/mL, 750 µg/mL e 1000 µg/mL.

A influência causada pelos extratos e frações no crescimento do hipocótilo e da radícula pode ser vista nos GRÁFICO 6 e GRÁFICO 7.

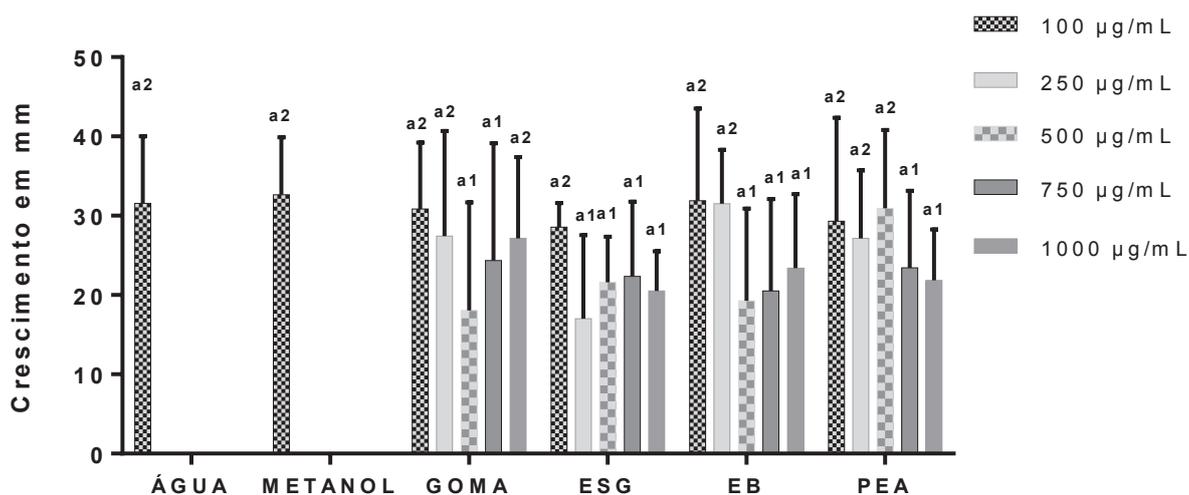
GRÁFICO 6 – INFLUÊNCIA DE AMOSTRAS PROVINIENTES DE *Ocotea puberula* (RICH.) Nees.QUE APRESENTARAM ATIVIDADE NO CRESCIMENTO DO HIPOCÓTILO DE *Lactuca sativa* cv. Grand Rapids



Fonte: O autor (2018)

NOTA: (1) Extrato bruto (EB), Extrato sem goma (ESG), Precipitado extrato alcaloídico (PEA), Extrato goma (Goma).

GRÁFICO 7 – INFLUÊNCIA DE AMOSTRAS PROVINIENTES DE *Ocotea puberula* (RICH.) Nees.QUE APRESENTARAM ATIVIDADE NO CRESCIMENTO DA RADÍCULA DE *Lactuca sativa* cv. Grand Rapids



Fonte: O autor (2018)

NOTA: (1) Extrato bruto (EB), Extrato sem goma (ESG), Precipitado extrato alcaloídico (PEA), Extrato goma (Goma).

A partir dos resultados pode se observar que na maioria dos casos de influência, foi de inibição do crescimento. Dentre os resultados obtidos para o hipocótilo, as frações extrato sem goma, extrato goma e precipitado extrato alcaloídico inibiram o crescimento nas concentrações 250 µg/mL, 500 µg/mL, 750 µg/mL e 1000 µg/mL. O extrato bruto apresentou inibição nas concentrações de 500 µg/mL, 750 µg/mL e 1000 µg/mL, as concentrações 100 µg/mL e 250 µg/mL estão estatisticamente próximas aos controles negativos. A radícula apresentou inibição na fração goma na concentração 500 µg/mL e 750 µg/mL, no extrato bruto 500 µg/mL, 750 µg/mL e 1000 µg/mL, precipitado extrato alcaloídico 750 µg/mL e 1000 µg/mL e extrato sem goma 250 µg/mL, 500 µg/mL, 750 µg/mL e 1000 µg/mL.

Estes resultados corroboram com os descritos anteriormente (toxicidade frente a *Artemia salina* e hemólise), e evidenciam o potencial citotóxico. Os efeitos alelopáticos podem variar de acordo com a sua intensidade, considerando que a ação dos aleloquímicos é dependente de diversos fatores. Geralmente, os efeitos são dependentes das concentrações dos aleloquímicos, ou seja tendem a ser mais acentuados em concentrações mais altas. Entretanto os efeitos alelopáticos podem diferenciar desse padrão, já que os efeitos resultam de uma somatória de alterações moleculares. Os efeitos alelopáticos resultam da ação de várias substâncias que atuam em conjunto. (SILVA; AQUILA, 2006). Vários grupos químicos como ácidos fenólicos, cumarinas, terpenoides, flavonoides, alcaloides, taninos, quinonas complexas, podem ser responsáveis pelos efeitos alelopáticos observados nas plantas (EINHELLIG, 1986; MEDEIROS, 1990).

Em literatura com espécies do gênero *Ocotea* os resultados confirmam que os metabolitos secundários pertencentes ao gênero podem vir a se tornar alelopáticos, como exemplo a *Ocotea odorífera* que causam alterações metabólicas e morfológicas nas plantas de sorgo. (CARMO; LIMA; TAKAKI, 2007). A espécie *Ocotea puberula* possui atividade alelopática em extratos de folhas adultas. (SILVA; AQUILA, 2006).

CONCLUSÃO

Não foi evidenciado em literatura estudo em galhas de frutos de *Ocotea puberula*, há relatos que evidenciam infestação por fungos, apresentando galhas em seus frutos. Nas análises de CCD obtiveram-se resultados positivos pra esteroides e triterpenos, compostos fenólicos e alcaloides. A banda presente no precipitado se apresentou única, sendo característico de uma substância pura. A identificação por RMN e cristalografia resultou em um alcaloide aporfínico denominado dicentrina. As dosagens do perfil da dicentrina nas amostras mostraram alta concentração na fração goma seguida pelo extrato bruto e extrato sem goma respectivamente.

Os ensaios de atividade antioxidante mostraram resultados significativos para todas as amostras no método Redução do radical DPPH•. A concentração de compostos fenólicos apresentou alto teor no extrato bruto, extrato sem goma e goma. Nos estudos de toxicidade, apenas o isolado dicentrina apresentou-se tóxico contra a *Artemia salina*, sendo esta atividade considerada como moderada. Já no teste de hemólise, a fração goma apresentou atividade, a partir da concentração de 100 µg/mL e com resultados na faixa de 20, 30 e 50%. Os resultados de atividade alelopática foram relevantes na inibição do crescimento de *Lactuca sativa*, com destaque para o extrato sem goma, goma e dicentrina, os quais inibiram o crescimento do hipocótilo nas concentrações superiores a 250 µg/mL e o extrato bruto, goma, extrato sem goma e dicentrina, os quais inibiram o crescimento da radícula com variações de concentração.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A pesquisa realizada em galhas de frutos é inédita. Assim, considerando a presença do constituinte dicentrina, as propriedades antioxidantes, alelopáticas e tóxicas demonstradas pelos extratos brutos e frações. É importante a realização de outros testes biológicos, farmacológicos e isolamento de metabólitos secundários e sua identificação. A pesquisa deve ser continuada para contribuição e enriquecimento da espécie. Considerando a importância científica e econômica dos compostos na *Ocotea puberula*, com ênfase a dicentrina, pode-se afirmar tratar-se esta pesquisa de grande contribuição para a sociedade científica e mercado farmacêutico.

REFERÊNCIAS

AGRIOS, G.N. Plant Pathology. **Academic Press**, 4 ed. San Diego (USA) 1997

AMARANTE, C. B.; MULLER, A. H.; POVOA, M. M.; DOLABELA, M. F. Estudo fitoquímico biomonitorado pelos ensaios de toxicidade frente a *Artemia salina* e de atividade antiplasmodica do caule de aninga (*Montrichardia linifera*). **Acta Amazonica**, v. 41, n.3, p.431-434, 2011.

ANISZEWSKI, T. Alkaloids: Chemistry, Biology, **Ecology, and Applications**. Elsevier. 3th ed.2015.

ARAUJO, A. J. **Estudo fitoquímico das folhas de *Ocotea puberula* (Reich.) Nees (LAURACEAE)**. Curitiba, 2000. 110f. Dissertação (Mestrado em Química) - Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná.

ARCHILA, E.G.; SUÁRES, L.E.C. Phytochemical study of leaves of *Ocotea caudate* from Colombia. **Natural Product Research**, Colombia, p. 1-7, 2017. Disponível:<<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/14786419.2017.1344663>> . Acesso em: 10 de agosto de 2017.

ARNÃO, M.B. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. Trends in food **Science e Technology**, v. 11, n.11, p. 419-421, 2000

ASENCIO, M.; GUZMÁN, C.H.;LÓPEZ, J.J.; CASSELS, B.K.; PROTAIS, P.; CHAGRAOUI, A. Structure-affinity relationships of halogenated predicine and glaucine derivatives at D1 and D2 dopaminergic receptors: halogenation and D1 receptor selectivity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry** 13, p.3699-3704. 2005.

AZWANIDA N. N. A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle,Strength and Limitation. **Medicinal & Aromatic Plants**, v. 4, n. 3, p. 1-6, 2015. Disponível:<[doi:10.4172/2167-0412.1000196](https://doi.org/10.4172/2167-0412.1000196)> . Acesso em: 10 de outubro de 2017.

BADHANI, B.; SHARMA, N.; KAKKAR, R. Gallic acid: a versatile antioxidant with promising therapeutic and industrial applications. **RSC Advances**, v. 5, p. 27540–27557, 2015.

BALLABENI, V. et al. Antiplatelet and antithrombotic activities of essential oil from wild *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. (Lauraceae) calices from Amazonian Ecuador. **Pharmacological Research**, Londres, v. 55, p. 23-30, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17079160>>. Acesso em: 14 de julho de 2018.

BALLABENI, V.; TOGNOLINI, M.; GIORGIO, C.; BERTONI, C.; BRUNI, R.; BAROCELLI, E. *Ocotea quixos* Lam. essential oil: In vitro and in vivo investigation on its anti-inflammatory properties. **Fitoterapia**, v. 81, n.4, p.289-295, 2010. Disponível: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19825398>> . Acesso em: 10 de agosto de 2017.

BANERJEE, A. et al. Concentration dependent antioxidant/pro-oxidant activity of curcumin studies from AAPH induced hemolysis of RBCs. **Chem Biol Interact.** v. 174, n.2, p. 134-9. 2008. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18571152>. Acesso em 12 de agosto de 2017.

BARALLE, F.; SCHVARZBERG, N.; VERNENGO, M.J. Thalictmine from *Ocotea puberula*. **Phytochemistry**, v.12, p.948-949, 1973.

BARALLE, F.; SCHVARZBERG, N.; VERNENGO, M.; COMIN J. Dehydroocoteine and didehydroocoteine from *Ocotea puberula*. **Experientia**, v.28(8), p.875-876. 1972.

BARBOSA-FILHO, J. M. et al. CG-MS analysis and cardiovascular activity of the essential oil of *Ocotea duckei*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 18, n. 1, p. 37-41, 2008. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbfar/v18n1/a09v18n1.pdf>>. Acesso em: 20 de julho de 2018.

BARRERA, E. D. B.; SUAREZ, L. E. C. In vitro anti-inflammatory effects of naturally-occurring compounds from two Lauraceae plants. **Anais Academia Brasileira de Ciências**, vol.83, n.4, pp. 1397-1402, 2011. Disponível: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S000137652016000501841&script=sci_abstract&lng=pt> . Acesso em: 10 de agosto de 2018.

BASSANI, V. L.; PETROVICK P. R. **Farmacognosia do produto natural ao medicamento**: Desenvolvimento tecnológico de produtos farmacêuticos a partir de produtos naturais, 1 ed. Brasil: Artmed, 2017 p 305 – 315.

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.

BERG, J. M. T.; LUBERT, J. Bioquímica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 6o Ed. 2008.

BEIRITH, A.; SANTOS, A. R.; CALIXTO, J. B.; HESS, S. C.; MESSANA, I.; FERRARI, F.; YUNES, R. A. Study of the antinociceptive action of the ethanolic extract and the triterpene 24-hydroxytormentonic acid isolated from the stem bark of *Ocotea suaveolens*. **Planta Médica**, v.65, n.1, p. 50-55, 1999. Disponível: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10083846>> . Acesso em: 10 de agosto de 2018.

BORELLA, J.; PASTORINI, L. H. Efeito alelopático de frutos de umbu (*Phytolacca dioica* L.) sobre a germinação e crescimento inicial de alface e picão-preto. **Ciência e Agrotecnologia**. v. 34, n. 5, p. 1129-1135, 2010. Disponível: < DOI: 10.1590/S1413-70542010000500008 > Acesso em: 10 novembro de 2018.

BRAZ FILHO, R. Contribuicao da fitoquimica para o desenvolvimento de um país emergente. *Quimica Nova*. 2010. V. 33, n. 1, 229 – 239.

BRENES-ARGUEDAS, T.; COLEY P. D. Phenotypic variation and spatial structure of secondary chemistry in a natural population of a tropical tree species. *Oikos*, v.108, p. 410-420. 2005.

BROTTO, M. L.; CERVI, A. C.; SANTOS, E. P. dos. O gênero *Ocotea* (Lauraceae) no estado do Paraná, Brasil. *Rodriguésia*, Rio de Janeiro, v. 64, n. 3, p. 495-525, 2013. Disponível em: <<http://rodriguesia-seer.jbrj.gov.br/index.php/rodriguesia/article/view/ID%20694/301>> Acesso em: 10 de agosto de 2017.

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. Disponível:<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814603003698>>. Acesso em 28 de agosto de 2017.

CALDATO, S.L., VERA, N., DONAGH, P.M. Estructura poblacional de *Ocotea puberula* em um bosque secundário y primário de la selva mixta misionera. *Ciência Florestal*, v.13, n.1. p. 25-32. Santa Maria, 2002. Disponível:<<https://periodicos.ufsm.br/cienciaflorestal/article/view/1773>>. Acesso em 28 de agosto de 2017.

CANNON, P.F.; KIRK, P.M. Fungal families of the world. **CABI**, Wallingford, UK. p. 456. 2007.

CANZIAN, R. L. et al. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS DE CANELA-SASSAFRÁS (*Ocotea odorifera* (VELL.) ROWHER). **PERSPECTIVA**, Erechim, v.34, n.127, p. 123-133, 2010.

CARMO, F.M. da S.; BORGES, E. E. de L.; TAKAKI, M. Alelopatia de extratos aquosos de canela-sassafrás (*Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer). **Acta Botanica Brasilica**, v.21, n.3, p. 697-705, 2007. Disponível: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S010233062007000300016&script=sci_abstract&lng=pt>. Acesso em: 10 de agosto de 2017.

CARRIS, L. M.; LITTLE, C. R.; STILES, C. M. **Introduction to Fungi. The Plant Health Instructor** Washington State University, 2012

CARVALHO, A. C. B.; RAMALHO, L. S.; MARQUES, R. F. O.; PERFEITO, J. P. S. Regulation of herbal medicines in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 158, Part B, p. 503-506, 2014.

CARVALHO, L. L. G.; SANTOS, R. N. S.; BARBOSA, J. F. Occurrence of entomogenous galls in plants of the forest park of pioneers, in Maringa, Parana, Brazil. **Uningá** v. 23, n.1, p. 21-23, 2015

CARVALHO, P. E. R. **Canela Guaicá**. Circular técnica 62. Brasília: Embrapa

Informação Tecnológica; Colombo, PR: Embrapa Florestas, v.1, 2002.

CAVA, M.P.; BEHFOROUZ, M.; MITCHELL, M.J. Ocotea alkaloids: variabilina, a novel aminoaporphine. **Tetrahedron Letters**, 46, p.4647-4649. 1972.

CAVA, M.P.; WATANABE, Y.; BESSHO, K.; MITCHELL, M.J.; ROCHA, A.J.; HWANG, B.; DOUGLAS, B.; WEISBACH, J.A. Ocotea alkaloids: the characterization and structures of four new aporphine bases. **Tetrahedron Letters**, v.20, p.2437-2442. 1968. Disponível: < [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)76150-8](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)76150-8)>. Acesso em: 10 de agosto de 2018.

CAVA, M.P.; WENKATESWARLU, A. Dehydroocopodine, dicentrinone and other alkaloids from *Ocotea macropoda* and *Hernandia jamaicensis*. **Tetrahedron Letters**, v. 27, p.2639-2643. 1971. Disponível: <[https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)98053-6](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)98053-6)>. Acesso em: 10 de agosto de 2018.

CHANDERBALI, A.S.; WERFF, H.V.; RENNER, S.S. Phylogeny and Historical Biogeography of Lauraceae: Evidence from the Chloroplast and Nuclear Genomes, **Journal Article**, Winter, v. 88 n.1, p 104-134, 2001. Disponível: <http://www.jstor.org/stable/2666133?seq=2#page_scan_tab_contents>. Acesso em 20 de julho de 2017.

CHEW, Y. L. et al Assessment of phytochemical content, polyphenolic composition, antioxidant and antibacterial activities of Leguminosae medicinal plants in Peninsular Malaysia. **Complementary and Alternative Medicine**, 2011. Disponível: <<http://www.biomedcentral.com/1472-6882/11/12>> Acesso em 20 de novembro de 2018.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University Press, 1981. p. 1-79.

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**, vol.45, n.2, p.179-18, 2009. Disponível: < <https://colciencias.pure.elsevier.com/en/publications/abicyclo321octanoidneolignan-and-toxicity-of-the-ethanol-extrac>>. Acesso em 20 de julho de 2018.

DONOT, F. et al. Microbial exopolysaccharides: main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 2, p. 951-962, 2012.

DA SILVA, D. B. et al. Isolamento e avaliação da atividade citotóxica de alguns alcalóides oxaporfínicos obtidos de annonaceae. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 8, p.1809 – 1812, 2007. Disponível: < http://quimicanova.sbq.org.br/detalhe_artigo.asp?id=1905>. Acesso em 20 de julho de 2018.

DA SILVA, T. B. C. et al Citotoxic potential of selected medicinal plants in northeast Brazil. *Complementary and alternative medicine*, v. 16 n. 199, 2016.

DA SILVA, J.C. E et al, Chemical Diversity, Biological Activity, and Genetic Aspects of Three *Ocotea* Species from the Amazon, **International Journal of Molecular Sciences**. Basel, v.18 n. 5 p. 1081, 2017. Disponível: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28524091>>. Acesso em 18 de julho de 2018.

DE OLIVEIRA, D.C. et al Reações de defesas químicas e estruturais de *Lonchocarpus muehlbergianus* Hassl. (Fabaceae) à ação do galhador *Euphalerus ostreoides* Crawf. (Hemiptera: Psyllidae). **Revista Brasil**. v.29 n. 4 p. 657-667. 2006 Disponível em: http://www.academia.edu/16084600/Rea%C3%A7%C3%B5es_de_defesas_qu%C3%ADmicas_e_estruturais_de_Lonchocarpus_muehlbergianus_Hassl._Fabaceae_%C3%A0_a%C3%A7%C3%A3o_do_galhador_Euphalerus_ostreoides_Crawf._Hemiptera_Psyllidae_. Acesso em 15 de agosto de 2017.

DEWICK, P.M. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic approach**, 2 ed. UK: Wiley & Sons, 2002. p.322-340.

DEWICK, P. M. *Medicinal natural products: A Biosynthetic Approach*. John Wiley & Sons, Ltd. 3rd ed. 2009. p.320-342.

DIAS, J. DE F. G.; CIRIO, G. M.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Contribution to the allelopathic study of *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss., Celastraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 3, p. 220-223, 2005.

EINHELLIG, F. A. Mechanisms and modes of action of allelochemicals. In: PUTNAM, A.R.; TANG, Chung-Shih. **The Science of Allelopathy**. Toronto: John Wiley & Sons, p. 171-187, 1986.

FARAGO, P.V. et al. Análise farmacognóstica das cascas de *Ocotea puberula* (Rich.) Nees, Lauraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. Ponta Grossa, 2004. v.85 n.1 p. 23-26. Disponível: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2005000300016>. Acesso em 10 de julho de 2017.

FARAGO, P.V. et al. Análise morfoanatômica de folhas de *Ocotea puberula* (Rich.) Nees, Lauraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. Ponta Grossa, 2005 v.15 n.3 p. 250-255. Disponível: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2005000300016>. Acesso em 10 de julho de 2017.

FARRUGIA, L. WinGX and ORTEP for Windows: an update. **Journal of Applied Crystallography**, v. 45, n. 4, p. 849-854, 2012.

FERNANDES, W. G.; NETO, E. T.; MARTINS, R. P. Ocorrência e caracterização de galhas entomógenas na vegetação do campus pampulha da universidade federal de minas gerais. **Revista Brasileira de Zoologia** v. 5 p. 11-29, 1988

FRANCA, N.C.; GIESBRECHT, A.M.; GOTTLIEB, O.R.; MAGALHÃES, A.F.; MAGALHÃES, E.G.; MAIA, J.G.S. Benzylisoquinolines from *Ocotea* species. **Phytochemistry**, v.14, p.1761-1672. 1975. Disponível: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0031942275853908>>. Acesso em 18 de julho de 2018.

FOURNET A. et al. Phytochemical and antiprotozoal activity of *Ocotea lancifolia*. **Fitoterapia**, v. 78 p. 382-384, 2007. Disponível: < doi:10.1016/j.fitote.2007.03.003>. Acesso em 18 de julho de 2018.

GARCEZ, F. R.; SILVA, A. G. F.; GARCEZ, W. S.; LINCK, G.; MATOS, M. C. F.; SANTOS, E. C. S.; QUEIROZ, L. M. M. Cytotoxic Aporphine Alkaloids from *Ocotea acutifolia*. **Planta Médica**, v.77, n.4, p. 383-387, 2011. Disponível: <https://www.researchgate.net/publication/47337804_Cytotoxic_Aporphine_Alkaloids_from_Ocotea_acutifolia>. Acesso em 18 de julho de 2018.

GARCIA, L. M. Z.; OLIVEIRA, T. F. de.; SOARES, P. K.; BRUNS, R. E.; SCARMINIO, I. S. **Statistical mixture design** - Principal component determination of synergic solvent interactions for natural product extractions. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. 2010. V. 103, 1 – 7.

GUTERRES, Z. R. et al. Atividade genotóxica de extratos etanólicos de plantas do gênero *Ocotea*. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 10, n. 2, p. 157-163, 2012. Disponível: <<http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/1952>>. Acesso em 18 de julho de 2018.

GUTERRES, Z. R. et al. Mutagenicity and recombinagenicity of *Ocotea acutifolia* (Lauraceae) aporphinoid alkaloids. *Mutation Research*, v.757, n.1, p. 91-96, 2013. Disponível: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383571813002040>>. Acesso em 18 de julho de 2018.

GARCEZ, W.S.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O.R. Benzylisoquinoline and flavonols from *Ocotea vellosiana*. **Phytochemistry**, v.39, n.4, p.815-816. 1995. Disponível:<<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/003194229400961R>>. Acesso em 18 de julho de 2018.

GARCEZ, W. S. et al. Larvicidal activity against *Aedes aegypti* of some plants native to the West-Central region of Brazil. **Bioresource Technology**, Nova York, v. 100, p. 6647-6650, 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852409007780>>. Acesso em: 14 de julho de 2017.

GARRETT, R.; CRUZ, A. S. R.; GUERRA, M. S; GATTUSO, M.; ROCHA, L. Atividade antibacteriana do óleo essencial de *Ocotea notata* guiada pelo ensaio de toxicidade sobre artemia salina . **Boletín Latinoamericano y del Caribe Plantas Medicinales y Aromáticas**, v.6, n.6 p. 344–345, 2007. Disponível em: <<http://www.redalyc.org/html/856/85617472016/index.html>>. Acesso em: 14 de julho de 2018.

GARRETT, R.; ROMANOS, M. T. V.; BORGES, R. M.; SANTOS, M. G.; ROCHA, L.; SILVA, A. J. R. da. Antiherpetic activity of a flavonoid fraction from *Ocotea notata* leaves. **Revista Brasileira Farmacognosia**, vol.22, n.2, p. 306-313, 2012. Disponível em: <
http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102695X2012000200009
Acesso em: 14 de julho de 2018.

GARRETT, R.; CRUZ, A. S. R.; ROCHA, L.; SANTOS, M. G.; SILVA, A. J. S. Chemical Composition and Toxicity of *Ocotea notata* (Nees) Mez Essential Oil. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 13, n.4, p. 455-459, 2013. Disponível em: <
<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/0972060X.2010.10643849>>. Acesso em: 14 de julho de 2018.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabolitos secundários. *Química Nova*. 2007. V. 30, 374 – 381.

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. Disponível em: <http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/jf0605493>. Acesso em 28 de agosto de 2017.

GUINAUDEAU, H.; LEBOEUF, M.; CAVÉ, A. Aporphinoid alkaloids V, **Journal of Natural Product**, v.57, n.8, p.1033 - 1133, aug. 1994.

GUTERRES, Z. R.; SILVA, A. F. G.; GARCEZ, W. S.; GARCEZ, F. R.; FERNANDES, C. A.; GARCEZ, F. R. Mutagenicity and recombinogenicity of *Ocotea acutifolia* (Lauraceae) aporphinoid alkaloids. **Mutation Research**, v.757, n.1, p. 91-96, 2013. Disponível em: <
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383571813002040>>. Acesso em: 14 de julho de 2018.

HARVEY, A. L.; Natural products in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v.13, p.894-901, 2008 Disponível em : <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2008.07.004>Get rights and content. >. Acesso em: 14 de julho de 2018.

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

HANDA, S. S. **Extraction Technologies for medical and aromatic plants**. An overview of extraction techniques for medicinal and aromatics plants. p. 21-26, 2008.

HENDRICHS M.; BAUER R.; OBERWINKLER F. The Cryptobasidiaceae of tropical Central and South America. **Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H**, Austria, v. 55, n.1, p. 33-64, 2003 Disponível em: <

https://www.zobodat.at/pdf/Sydowia_55_0033-0064.pdf>. Acesso em: 14 de julho de 2018.

HIRANO, E. ; POSSAMAI, E. Estadio de maturação do fruto e germinação de sementes de três espécies de Lauraceae. **Scientia Agraria**, Curitiba. v.9 n.2 p.219-223, 2008. Disponível em: <http://revistas.ufpr.br/agraria/article/view/11006>. Acesso em 19 de agosto 2017.

HOET,S.; STEVIGNY, S.; BLOCK, S.; OPPERDOES, F.; COLSON, P.; BALDEYROU, B.; LANSIAUX, A.; BAILLY, C.; QUETIN - LECLERCQ, J. Alkaloids from *Cassytha filiformis* and related aporphines: antitrypanosomal activity, cytotoxicity, and interaction with DNA and topoisomerases. **Planta Medica** v. 70 n. 5, p.407-413. 2004.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R.L. The chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 53, p. 1841-1856, 2005.

HUANG, R.L.; CHEN, C.C.; HUANG, Y.L.; OU, J.C.; PO HU, C.; CHEN, C.C.; CHUNGMING, C. Anti-tumor effects of d-dicentrine from the root of *Lindera megaphylla*. **Planta Medica** v. 64, p.212-215. 1998.

INOUE, M. T., RODERJAN, C.V., KUNIYOSHI, Y.S. **Projeto madeira do Paraná**. Curitiba: Fundação de Pesquisas Florestais do Paraná, 1984. p. 15, 55-69.

JIA, Q.; QIU, Z.; NISSANKA, A.; FARROW, T.M.; **Method for the prevention and treatment of chronic venous insufficiency**. US Patent Application , Kind Code, serial nº 741215, Séries Code 09. december 19, 2000.

JUNIOR, A. R. P.; CARVALHO, R. I. N. DE; NETTO, S. P.; WEBER, S. H.; SOUZA, E. DE; FURIATTI, R.S. Bioatividade de óleos essenciais de sassafrás e eucalipto em cascudinho. **Ciencia Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 3, p. 637- 643, 2010. Disponível: <<http://www.scielo.br/pdf/cr/v40n3/a489cr1280.pdf>>. Acesso em: 12 de outubro de 2018.

KARABALIEV, M.; KOCHEV, V. Interaction of solid supported thin lipid films with sapoin. **Sensors and Actuators**. v. B, n. 88, p. 101-105, 2002. Disponível: <Pii:s0925-4005(02)00311-8>. Acesso em: 12 de novembro de 2018.

KEDARE, S. B.; SINGH, R. P. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. **Association of Food Scientists & Technologists**, India, v.48, n.4, p. 412-422, 2011.

KLEIN-JÚNIOR L. C.; HENRIQUES A. T. **Farmacognosia do produto natural ao medicamento**: Desenvolvimento tecnológico de produtos farmacêuticos a partir de produtos naturais, 1 ed. Brasil: Artmed, 2017 p 305 – 315.

KREIS W.; MUNKERT J.; PÁDUA R. M. **Farmacognosia do produto natural ao medicamento**: Desenvolvimento tecnológico de produtos farmacêuticos a partir de produtos naturais, 1 ed. Brasil: Artmed, 2017 p 147 – 150.

KNOGGE, W. **Fungal Infection of Plants**: The Plant Cell, American Society of Plant Physiologists v. 8, p.1711-1722, 1996

LOPEZ J.A.; BARILLAS, W.; GOMEZ LAURITO, L.; LIN, F.T.; ALREHAILY, A.J.; SHARAF, M.H.M.; SCHIFF, P.L. Aporphine alkaloids of *Ocotea Brenesii*. **International Journal of Pharmacognosy**, 34(2), p.145-147. 1996. Disponível: <<https://doi.org/10.1076/phbi.34.2.146.13187>>. Acesso em: 12 de outubro de 2018.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 4.ed. São Paulo: **Nova Odessa**, Instituto Plantarum, 2002. v.1. p. 11-16,145.

LU, J. et al. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. **Foundation for Cellular and Molecular Medicine/Blackwell**, v.14, n. 4, p. 840-860, 2010. Disponível: < doi:10.1111/j.1582-4934.2009.00897.x> Acesso em 17 de novembro de 2018.

MACIAS, F.A.; CASTELLANO, D.; MOLINILLO, J.M.G. Search for a standard phytotoxic bioassay for allelochemicals. Selection of standard target species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** , Puerto Real. v. 48 n. 6 p. 2512-2521, 2000. Disponível: <<http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/jf990305>>. Acesso em 17 de agosto de 2017.

MALHEIROS, A.; PERES, M. T. L. P. Alelopatia: Interações químicas entre espécies. In YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. (Ed.). **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001. p.505.

MAHAPATRA, S.; BANERJEE, D. Fungal exopolysaccharide: production, composition and applications. **Microbiology insights**, v. 6, p. MBI. S10957, 2013.

MARQUES, C. A. Importância econômica da família Lauraceae Lindl. **Floresta e Ambiente**, Rio de Janeiro, v. 8, n. 1, p. 195-206, 2001. Disponível: < <http://www.floram.org/files/v8n%C3%BAnico/v8nunicoa25.pdf>>. Acesso em: 12 de julho de 2017.

MEDEIROS, A . R. M. Alelopatia. **Horti Sul**, v. 1, n. 3, p. 27-32, 1990.

MENSOR, L. L. et al. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, Londres, v. 15, n. 2, p. 127-130 2001. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11268111>>. Acesso em: 15 de julho de 2017.

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.

MEYER, B. N. et al. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 45, n. 5, p. 31-34, 1982. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17396775>>. Acesso em: 12 de julho de 2017.

MONTRUCCHIO, D. P **Avaliação da Atividade Antinociceptiva do Extrato e do Alcaloide S-(+)-Dicentrina Extraído de Frutos De *Ocotea Puberula* (Lauraceae).** Tese (Doutorado em Farmacologia) – Setor de Ciências da Saúde – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2012.

MONTRUCCHIO, D. P. et al. Antinociceptive effects of a chloroform extract and the alkaloid dicentrine isolated from fruits of *Ocotea puberula*. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 78, n. 14, p. 1543-1548, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22815198>>. Acesso em: 13 de julho de 2017.

MORAES, M.M.; CAMARA, A.G.; SILVA, M.M.C. Comparative toxicity of essential oil and blends of selected terpenes of *Ocotea* species from Pernambuco, Brazil, against *Tetranychus urticae* Koch. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, ISSN 0001-3765, P. 1-5, 2017. Disponível: <<http://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201720170139>>. Acesso em 20 de julho de 2017.

NETO, M. L. R. et al Crude ethanolic extract, lignoid fraction and yangambin from *Ocotea duckei* (Lauraceae) show antileishmanial activity. **Verlag der Zeitschrift für Naturforschung**, Tübingen, v. 62, n.5-6, p. 348-352, 2007. Disponível:<<https://pdfs.semanticscholar.org/1336/54f345378d499fd628be4e4e7fa75141d896.pdf>>. Acesso em 20 de julho de 2018.

PALLARDY, S. G. **PHYSIOLOGY OF WOODY PLANTS** **School of Natural Resources** University of Missouri 3 ed. Columbia, Missouri 2008

PANDEY A.; TRIPATHI S. Concept of standardization, extraction and pre phytochemical screening strategies for herbal drug. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 2, n. 5, p.115-119, 2014. Disponível:<http://www.phytojournal.com/vol2Issue5/Issue_jan_2014/11.pdf>. Acesso em 20 de outubro de 2018.

PABON, L. C.; CUCA, L. E. Aporphine alkaloids from *Ocotea macrophylla* (Lauraceae). **Química Nova**, vol.33, n.4, p.875-879, 2010. Disponível:<http://quimicanova.sbq.org.br/imagebank/pdf/Vol33No4_875_20-AR09450.pdf>. Acesso em 20 de julho de 2018.

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. das G. Metabolitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**. 2012. V. 3, n. 4, 146 – 152.

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

POSER G. L. V. **Farmacognosia do produto natural ao medicamento: Desenvolvimento tecnológico de produtos farmacêuticos a partir de produtos naturais**, 1 ed. Brasil: Artmed, 2017 p 188-189.

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**, Nova York, v. 269, p. 337-341, 1999. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003269799940198>>. Acesso em: 14 de julho de 2017.

PRIETO, J. A.; PABON, L. C.; PATIÑO, O. J.; DELGADO, W. A.; CUCA, L. E. Constituyentes químicos, actividad insecticida y antifúngica de los aceites esenciales de hojas de dos especies Colombianas del género *Ocotea* (LAURACEAE) **Revista Colombiana de Química**, vol. 39, n.2, p.199-209, 2010. Disponível: <<http://www.redalyc.org/pdf/3090/309026684004.pdf>>. Acesso em 20 de julho de 2018.

QUINET, A. et al, **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB8507>> Acesso em: 19 de julho de 2017.

QUINET, A. Lauraceae na Reserva Biológica de Poço das Antas, Silva Jardim, Rio de Janeiro, Brasil, **Journal Article**, Rodriguésia, v. 57 n.3 p. 543-568, 2006. Disponível: <<http://www.jstor.org/stable/23498745>>. Acesso em 23 de julho de 2017.

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 p. 431-440, 2015. Disponível: <DOI: 10.1021/np5008153>. Acesso em 23 de julho de 2018.

RAMALHO, V. F.; SILVA, A. G. Biochemical and structural changes induced in plant tissues by galling insects **Natureza on line** v. 8 n. 3 p.117-122, 2010.

RAMAN , A.; SURYANARAYANAN, S. T. **Fungus-plant interaction influences plant-feeding insects**: Fungal Ecology 29 p.123-132, 2017.

RAMAN , A.; WHEATLEY, W.; POPAY, A. **Endophytic Fungus Vascular Plant—Insect Interactions** Entomological Society of America, 2012

REIGOSA, M.; GOMES, A. S.; FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. Allelopathic research in Brazil. **Acta Botanica Basilica**, v. 27, n. 4, p. 629-646, 2013.

RIBEIRO, R.A.; CARMO, L.G.; VLADIMIROVA, J.; JURKIEWICZ, N.H.; JURKIEWICZ, A. Nantenine blocks muscle contraction and Ca²⁺ transient induced by noradrenaline and K⁺ in rat vas deferens. **European Journal of Pharmacology** 470, p.37-43. 2003.

RIZZINI, C. T.; MORS, W. B. **Botânica econômica brasileira**. 2.ed. revista e

atualizada. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural, 1995. p. 141-142.

ROGINSKY, V.; LISSI, E.A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**, v. 92, p. 235–254, 2005 Disponível: <doi:10.1016/j.foodchem.2004.08.004> Acesso em 20 de novembro de 2018.

ROHWER, J.G. 2013. Lauraceae. *In*: K. Kubitzki, J.G.; Rohwer & V. Bittrich (eds.). **The Families and Genera of Vascular Plants**. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, GmbH. 2, p.366-391.

SALLEH W. H. N. M. W.; AHMAD F. Phytochemistry and Biological Activities of the Genus *Ocotea* (Lauraceae): A Review on Recent Research Results 2017 **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 7, n. 5, p. 204-218, 2017. Disponível: <DOI: 10.7324/JAPS.2017.70534> Acesso em 20 de agosto de 2018.

SÁNCHEZ-MORENO, C. Review: Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems. **Food Science and Technology International**. V. 8, n. 3, p. 121–137, 2002. Disponível: < DOI: 10.1106/108201302026770> Acesso em 20 de novembro de 2018.

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. *In*: SIMÕES, C .M. O. *et al.* (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 1. ed. Porto Alegre e Florianópolis: Ed. Universidade UFRGS e Ed. da UFSC, 1999. p. 324-325, 331-339.

SANTOS, L. M. L. Morphological and histochemical study leaf galls in three species of Euphorbiaceae from Northeast Brazilian Seasonal Tropical Dry Forest **Plant Protection Quarterly**, 2014

SHARMA, P.; SHARMA J. D. In vitro hemolysis of human erythrocytes- by plant extracts with antiplasmodial activity. **Journal of Ethnopharmacology** v. 74, p. 239–243, 2001.

SHEPHERD, G. J. Brasil. Ministério do Meio Ambiente - MMA. Secretaria de Biodiversidade e Florestas – SBF. **Conhecimento de diversidade de plantas terrestres do Brasil**, São Paulo: Unicamp, 2000. p.13-14, 46.

SILVA, F. M.; AQUILA, M. E. A. Contribuição ao estudo do potencial alelopático de espécies nativas. **Revista Árvore**, v.30, n.4, p.547-555, 2006. Disponível: < <http://www.scielo.br/pdf/rarv/v30n4/31675.pdf>. > Acesso em 20 de agosto de 2017.

SILVA, F. M.; AQUILA, M. E. A. Potencial alelopático de espécies nativas na germinação e crescimento inicial de *Lactuca sativa* L. (Asteraceae)1. **Acta botânica brasileira**. n. 20, p. 1, p. 61-69, 2006.

SILVA, L. L.; SILVA, D. T.; GARLET, Q. I.; CUNHA, M. A.; MALLMANN, B. B.; LONGHI, S. J.; PEREIRA, A. M. S.; HEINZMANN Anesthetic activity of Brazilian native plants in silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Neotropical ichthyology**, Porto Alegre, v. 11, n. 2, p. 443-451, 2013. Disponível: <

<http://www.scielo.br/pdf/ni/v11n2/1679-6225-ni-11-02-0443.pdf>>. Acesso em 23 de julho de 2018.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R. ; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of FolinCiocalteu reagent. **Methods in enzymology**, v. 299, p. 152-172, 1999

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

STEFANELLO, M.E.A. **Avaliação estatística de plantas medicinais:química, farmacologia e sistemática**. São Paulo: 1993. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, p. 8, 11.

STEVIGNY, C.; BAILLY, C.; QUENTIN-LECLERCQ, J. Cytotoxic and antitumor potentialities of aporphinoid alkaloids. **Current Medicinal Chemistry - Anti-Cancer Agents**. v. 5, n. 2, p. 173 – 182 2005. Disponível: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15777224>> Acesso em 23 de julho de 2018.

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

TAIZ, L.; ZEIGER E. Plant Physiology, **Sinauer Associates**; 3 ed. 2002

VAN DER WERFF, H.; RICHTER, H. G. Toward an improved classification of Lauraceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, Missouri, v. 83, n. 3, p. 409-418, 1996. Disponível: <http://www.jstor.org/stable/2399870?seq=1#page_scan_tab_contents>. Acesso em: 05 de julho de 2018.

VECCHIETTI, V.; CASAGRANDE, C.; FERRARI, G. Alkaloids of *Ocotea brachybotra*. **Farmaco [Sci]** 32(11), p.767-769. 1977

VECCHIETTI, V.; CASAGRANDE, C.; FERRARI, G.; SEVERINI RICCA, G. New aporphine alkaloids of *Ocotea minarum*. **Farmaco [Sci]**, 34(10), p.829-840. 1979. Disponível: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/510527>>. Acesso em: 05 de julho de 2018.

VERPOORTE, R.; COLLIN, A.; MEMELINK, J. Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. **Biochemical Review**, v.1. 2002. p. 13-25.

VERPOORTE, R.; MEMELINK, J. Biotechnology for the production of plant secondary metabolite in plants. **Current Opinion in Biotechnology**, v.13. 2002. p.181-187.

WEBER L. D. et al Antimicrobial activity and phytochemical prospection of vegetal extracts of *Ocotea silvestris* Vattimo-Gil and *Ocotea diospyrifolia* (Meisn.) against serotypes of *Salmonella* of poultry origin. **Rev. Bras. Saúde Prod. Anim.**, Salvador, v.19 , n.1 , p.116-124, 2018. Disponível: < <http://dx.doi.org/10.1590/S1519-99402018000100011>>. Acesso em: 05 de julho de 2018.

WOO, S.H.;SUN, N.J.; CASSIDY, J.M.; SNAPKA, R.M. Topoisomerase II by aporphine alkaloids. **Biochemical Pharmacology**. v.57, p.1141-1145. 1999.

YAMAGUCHI, K. K. de L.; ALCANTARA, J. M.; VEIGA JUNIOR, V. F. Investigação do potencial antioxidante e anticolinesterásico de 20 espécies da família Lauraceae. **Acta Amazonica**, vol.42, n.4, p. 541-546, 2012. Disponível: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0044-59672012000400012>. >. Acesso em: 05 de julho de 2018.

ZANIN, S. M. W.; LORDELLO, A. L. L. Alcalóides aporfinóides do gênero *Ocotea* (Lauraceae). **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 1, p. 92-98, 2001. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422007000100020>. Acesso em: 13 de julho de 2017.

ZANIN, S. M. W., et al. Mudanças de *Ocotea puberula* (LAURACEAE): identificação e monitoramento de alcalóides aporfinóides. **Química Nova**, v. 34, n. 5, p. 743-747, 2011. Disponível em : <http://www.scielo.br/pdf/qn/v34n5/03.pdf>. Acesso em 12 de junho de 2017.

ZHANG, Y.; CHEN, J.; LI, L.; YI, K.; YE, Y.; LIU G.; WANG, F.; HU, L.; ZOU, L.; WANG, G. Dynamic changes in antioxidant activity and biochemical composition of tartary buckwheat leaves during *Aspergillus niger* fermentation. **Journal of Functional Foods**, v. 32, p. 375-381, 2017.

ZHOU, B.N.; JOHNSON, R.K.; MATTERN, M.R.; WANG, X.; HECHT, S.M.; BECK, H.T.; ORTIZ, A. KINGSTON, D.G.J. Isolation and biochemical characterization of a new topoisomerase I inhibitor from *Ocotea leucosylon*. **Journal of Natural Products**, v.63, p.217-221. 2000. Disponível: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10691712>>. Acesso em: 13 de julho de 2018.

ANEXO 1 – AUTORIZAÇÃO DE ACESSO AO PATRIMÔNIO GENÉTICO



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso
Cadastro nº A0EB51A

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

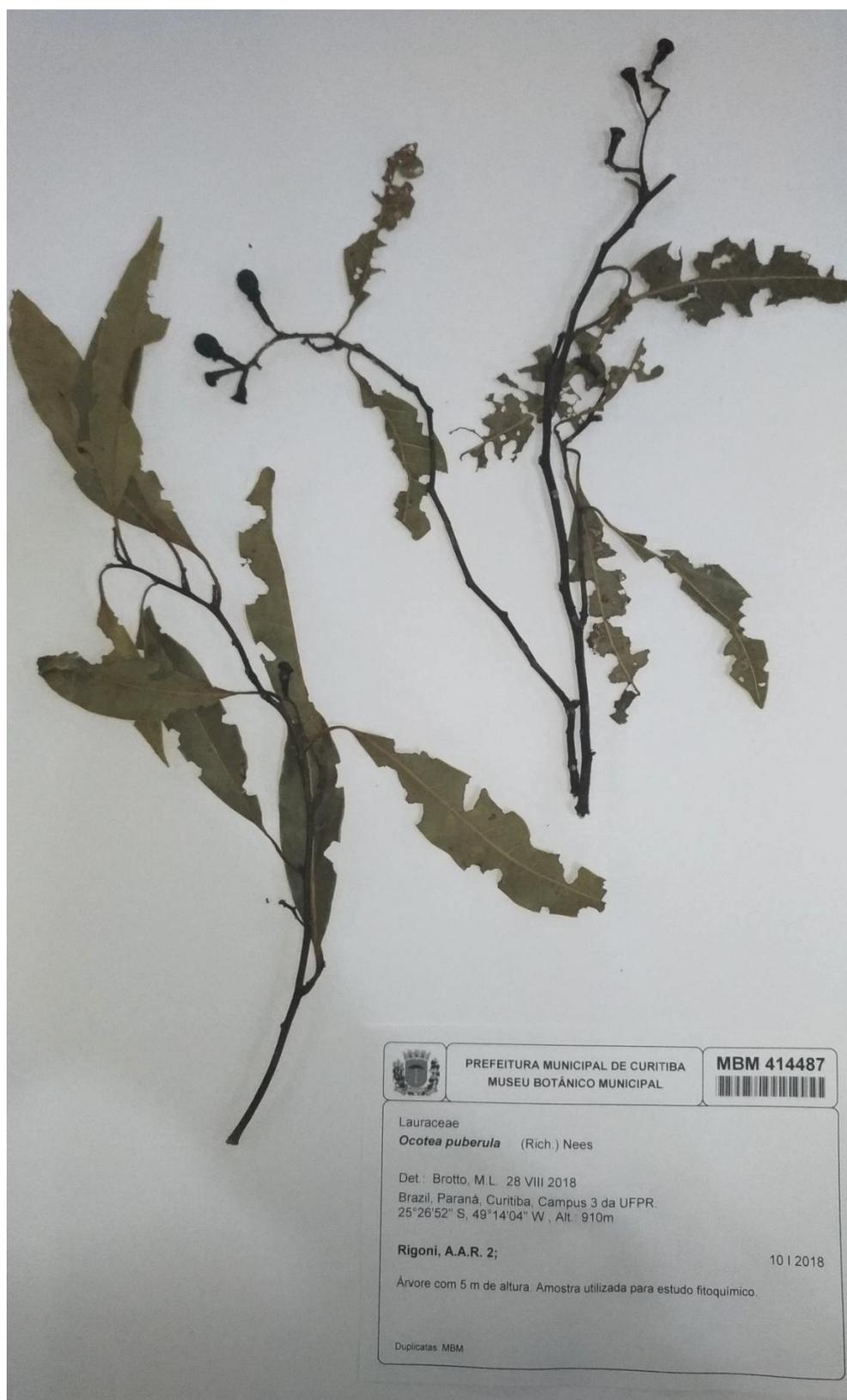
Número do cadastro: **A0EB51A**
Usuário: **Universidade Federal do Paraná**
CPF/CNPJ: **75.095.679/0001-49**
Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
Finalidade do Acesso:

Pesquisa Científica Bioprospecção Desenvolvimento Tecnológico

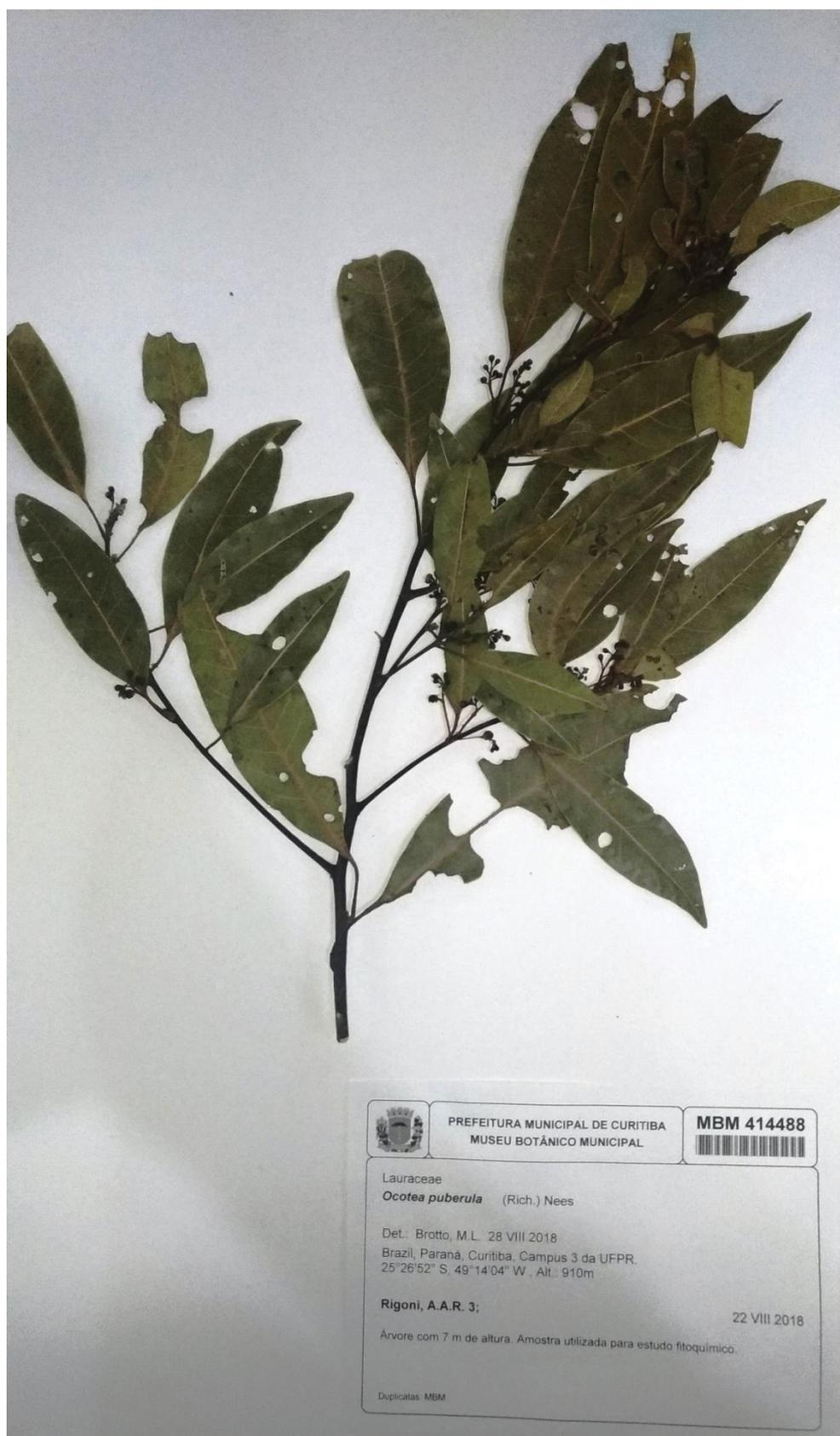
ANEXO 2 – FOTOGRAFIA DA EXSICATA DE *Ocotea puberula* (RICH.) Nees,
NÚMERO 309643



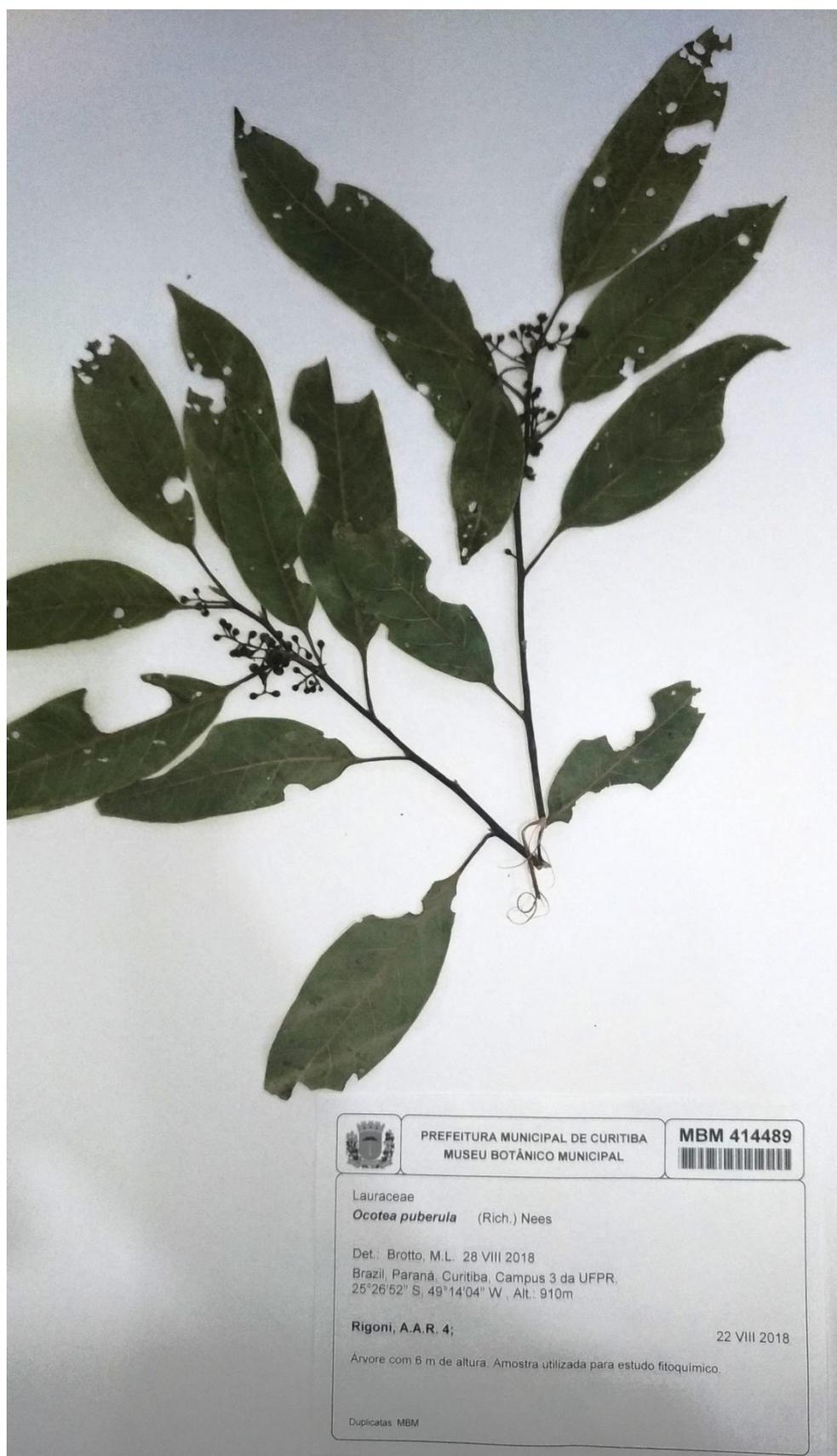
ANEXO 3 – FOTOGRAFIA DA EXSICATA DE *Ocotea puberula* (RICH.) Nees,
NÚMERO 414487



ANEXO 4 – FOTOGRAFIA DA EXSICATA DE *Ocotea puberula* (RICH.) Nees,
NÚMERO 414488



ANEXO 5 – FOTOGRAFIA DA EXSICATA DE *Ocotea puberula* (RICH.) Nees,
NÚMERO 414489



ANEXO 6 – FOTOGRAFIA DA EXSICATA DE *Ocotea puberula* (RICH.) Nees,
NÚMERO 414490

