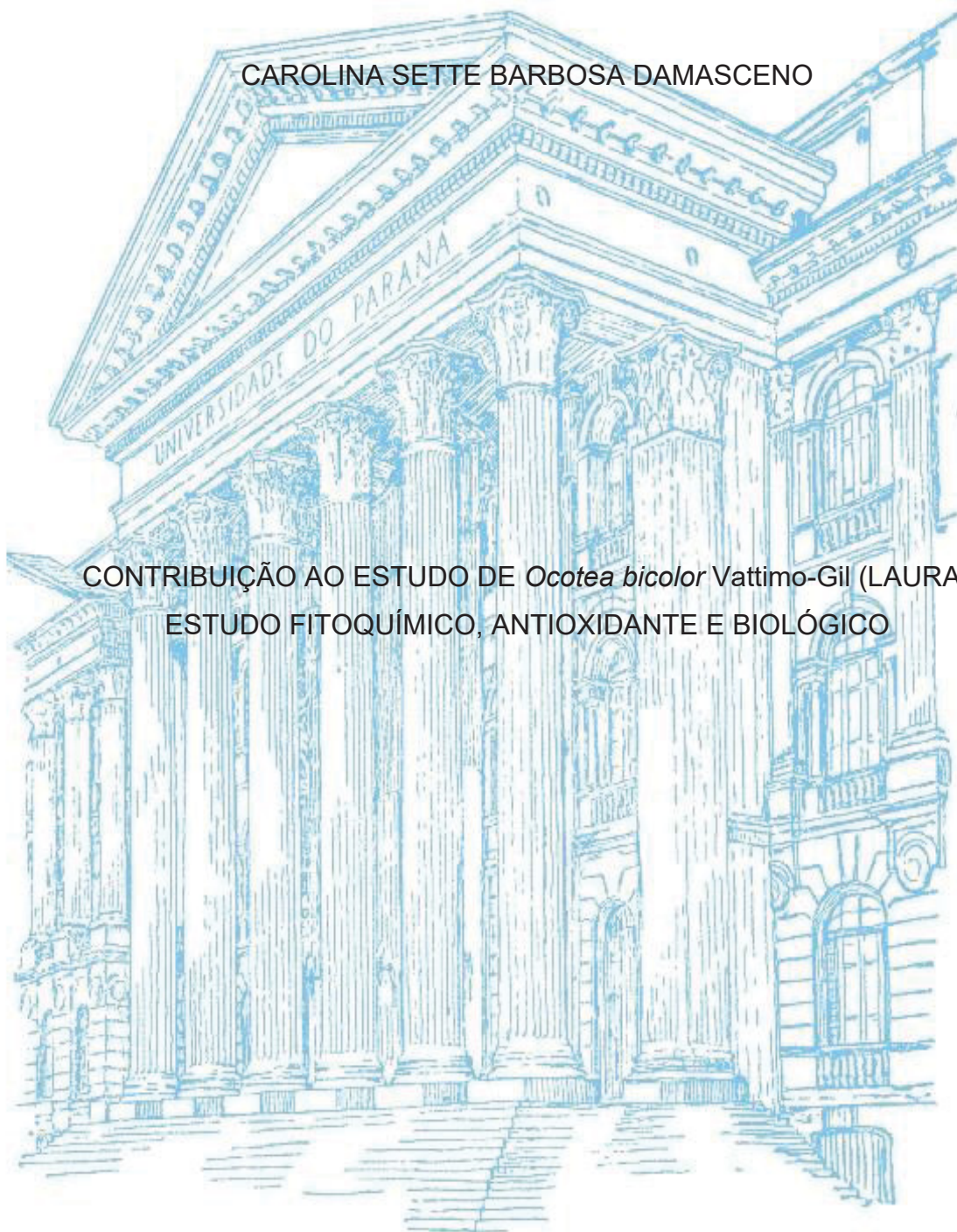


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CAROLINA SETTE BARBOSA DAMASCENO



CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DE *Ocotea bicolor* Vattimo-Gil (LAURACEAE):  
ESTUDO FITOQUÍMICO, ANTIOXIDANTE E BIOLÓGICO

CURITIBA

2021

CAROLINA SETTE BARBOSA DAMASCENO

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DE *Ocotea bicolor* Vattimo-Gil (LAURACEAE):  
ESTUDO FITOQUÍMICO, ANTIOXIDANTE E BIOLÓGICO

Tese apresentada como requisito parcial à  
obtenção do grau de Doutora em Ciências  
Farmacêuticas, no Programa de Pós-Graduação  
em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da  
Saúde, Universidade Federal do Paraná

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

CURITIBA

2021

Damasceno, Carolina Sette Barbosa

Contribuição ao estudo de *Ocotea bicolor* Vattimo-Gil (Lauraceae) [recurso eletrônico]: estudo fitoquímico, antioxidante e biológico / Carolina Sette Barbosa Damasceno – Curitiba, 2021.

Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2021.

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

1. *Ocotea*. 2. Óleo essencial. 3. Sesquiterpenos. 4. Antioxidante. 5. Alelopatia. 6. *Aedes aegypti*. I. Miguel, Obdulio Gomes. II. Miguel, Marilis Dallarmi. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 584.288



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

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **CAROLINA SETTE BARBOSA DAMASCENO** intitulada: **CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DE *Ocotea bicolor* Vattimo - Gil (LAURACEAE); ESTUDO FITOQUÍMICO, ANTIOXIDANTE E BIOLÓGICO**, sob orientação do Prof. Dr. OBDULIO GOMES MIGUEL, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor 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, 02 de Junho de 2021.

Assinatura Eletrônica  
14/06/2021 18:35:47.0  
OBDULIO GOMES MIGUEL  
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica  
10/06/2021 16:57:33.0  
DEISE PREHS MONTRUCCHIO  
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica  
14/06/2021 14:44:14.0  
CRISTIANE DA SILVA PAULA DE OLIVEIRA  
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica  
22/06/2021 13:37:37.0  
LIGIA MOURA BURCI  
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica  
14/06/2021 17:59:36.0  
SAMANTA DALIANA GOLIN PACHECO  
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Dedico esse trabalho a minha querida e insubstituível avó Laura Bauduco Sette (*in memoriam*). Uma mulher que me ensinou os grandiosos valores da vida, contribuindo de forma significativa para que eu chegasse até aqui. E também ao meu avô Guilherme Sette (*in memoriam*), por ter me inspirado a amar e apreciar as plantas. Saudade e gratidão eternas.

## AGRADECIMENTOS

As palavras descritas a seguir não refletem apenas um nível de reconhecimento ou de gratidão. Extrapolam esse sentido e me mostram que o maior nível do agradecimento é o vínculo. Nesse contexto expressar gratidão é muito pouco, por isso digo: OBRIGADA, que traduzido quer dizer: Fico obrigada a vós. Fico vinculada a vós.

O meu maior agradecimento é dirigido ao doador da vida e gerador de toda fonte de conhecimento. Agradeço pelas inúmeras preces atendidas e pelas grandes providências tomadas. Obrigada Deus por me proporcionar forças, sabedoria e paciência nesta jornada.

Obrigada de coração à minha família. Meu querido esposo e meu filho amado agradeço imensamente o apoio incondicional e compreensão em todos os momentos. Uma vez mais, vocês mostraram a verdadeira importância do amor e de ter um lar (meu porto seguro). De igual forma agradeço aos meus pais por sempre me apoiarem e me ensinarem o caminho da honestidade e perseverança.

Agradeço à Universidade Federal do Paraná e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade de realizar mais esse sonho.

Meu muitíssimo obrigada aos meus queridos orientadores, Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel e Profa. Dra. Marilis Dallarmi Miguel por ter acreditado em mim e me acolhido nesses anos de pós-graduação. Além dos grandes ensinamentos acadêmicos agradeço à amizade, compreensão e estímulo para galgar degraus mais altos. Sempre terei enorme admiração e respeito.

Aos demais professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em especial as Profas. Dra. Josiane de Fátima Gaspari Dias e Sandra Zanin pelo companheirismo, conselhos e ensinamentos.

Aos meus amigos e colegas do Grupo de Pesquisa em Produtos Naturais. Todos vocês desempenharam um papel importante para que esse trabalho fosse produzido, seja na ajuda direta em algum ensaio ou até mesmo com um sorriso, tornando essa árdua jornada mais leve e prazerosa.

Aos parceiros que me acompanharam nessa jornada, sendo que alguns compartilharam esse caminho desde o mestrado: Paula Moura, Fernando Betim, Kettlin Rech, Caroline Gribner, Larissa Gato e Natasha Fabri.

Aos alunos de iniciação científica, os quais contribuíram para realização de alguns ensaios.

Há amigos que se tornam mais chegados que um irmão. Letícia Freire você se tornou mais que uma amiga... companheira de todos os momentos, bons ou ruins. Muito obrigada por tudo. Luciane Gilbert foi muito bom ter uma amiga nutricionista no Programa de Ciências Farmacêuticas. Muito obrigada pela parceria e grande amizade, além da ajuda em alguns ensaios.

Aos técnicos da Central Analítica Graça e Maurício, pelo auxílio e prontidão em ajudar. Também ao técnico do Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais, Paulo Diniz e aos secretários Jean Godoi, Ednéia e Gustavo, pela pronta disposição nos atendimentos enquanto secretários da pós-graduação.

Ao Departamento de Química e Bioquímica da Universidade Federal do Paraná pelos espectros de cromatografia gasosa e ressonância magnética nuclear, respectivamente.

À prof. Dra. Graciele Campelo Borges e a Universidade Federal da Paraíba pela contribuição no ensaio de ORAC.

Ao Prof. Dr. Mario Navarro e Pós-doc Angela Palacio do LAMFIC no Departamento de Zoologia da Universidade Federal do Paraná pela contribuição para os ensaios com as larvas de *Aedes aegypti*.

À prof. Dra. Christiane de Queiroz do Departamento de Nutrição da UFPR pela amizade e acolhimento no estágio de docência.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro (Código de Financiamento 001).

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

“Aquele que mais profundamente estudar os mistérios da Natureza, mais plenamente se compenetrará de sua própria ignorância e fraqueza. Dispor-se-á a dizer como Newton: “Pareço-me com a criança na praia, procurando seixos e conchas, enquanto o grande oceano da verdade jaz por descobrir diante de mim”

Ellen White



## RESUMO

O gênero *Ocotea* (Lauraceae) apresenta o maior número de espécies medicinais em sua família, sendo fonte de alcaloides, lignanas e neolignanas, flavonoides e óleos essenciais. *Ocotea bicolor* Vattimo-Gil espécie nativa do Brasil ocorre na região Sul e Sudeste, com ampla distribuição no estado do Paraná. O objetivo deste trabalho foi aprofundar o estudo fitoquímico, antioxidante e biológico da espécie, dando continuidade aos estudos prévios. A partir do material coletado na cidade de Curitiba, Paraná, Brasil foi obtido o extrato bruto cetônico e posteriormente as frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e remanescente, com os quais as demais análises foram realizadas. O flavonoide astilbina (3-O- $\alpha$ -ramnosídeo de taxifolina ou diidroquercetina-3-O- $\alpha$ -ramnosídeo) foi isolado da Fração Acetato de Etila do Sólido (FAES) sendo identificada por técnicas de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . O óleo essencial obtido das folhas e galhos por hidrodestilação apresentaram predominância de sesquiterpenos e álcoois sesquiterpênicos, respectivamente. Os compostos majoritários em ambas as amostras foram o 5-hidroxicalameneno, trans – calameneno,  $\alpha$ -Copaeno e trans-Muurola-4(14),5-dieno. Verificou-se o teor de compostos fenólicos totais e a capacidade antioxidante total pelo método de redução do ferro – FRAP, e pelos métodos ABTS e ORAC. As frações acetato de etila do sólido (FAES), fração acetato de etila (FAE) e a fração remanescente do sólido (FRS) apresentaram os melhores resultados nesses ensaios. Na atividade alelopática, foi verificado que o extrato e frações influenciaram no processo de germinação e crescimento da *Lactuca sativa* e *Allium cepa*. O potencial hemolítico da espécie foi baixo quando comparado ao controle positivo e o isolado astilbina não foi considerado ativador de neutrófilos. Em relação a atividade larvicida sobre *Aedes aegypti* o óleo essencial das folhas e galhos foram efetivos, inclusive induzindo alterações morfológicas externas nas larvas expostas, sendo classificados como altamente tóxico aos organismos em questão. Os resultados obtidos nesse estudo evidenciam o potencial dessa espécie vegetal, podendo ser ampliado em estudos posteriores.

Palavras-chave: astilbina; óleo essencial; sesquiterpenos; antioxidante; alelopatia;  
*Aedes aegypti*.

## ABSTRAT

The genus *Ocotea* (Lauraceae) has the largest number of medicinal species in its family, being a source of alkaloids, lignans and neolignans, flavonoids and essential oils. *Ocotea bicolor* Vattimo-Gil species native to Brazil occurs in the South and Southeast, with wide distribution in the state of Paraná. The objective of this work was to deepen the phytochemical, antioxidant and biological study of the species, continuing the previous studies. From the material collected in the city of Curitiba, Paraná, Brazil, the crude ketone extract was obtained and, subsequently, the hexane, chloroform, ethyl acetate and remaining fractions, with which the other analyzes were performed. The flavonoid astilbine (3-O- $\alpha$ -ramnoside from taxifoline or dihydroquercetin-3-O- $\alpha$ -ramnoside) was isolated from the Solid Ethyl Acetate Fraction (FAES) and was identified by  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR techniques. The essential oil obtained from leaves and branches by hydrodistillation showed a predominance of sesquiterpenes and sesquiterpene alcohols, respectively. The major compounds in both samples were 5-hydroxycalamenene, trans-calamenene,  $\alpha$ -Copaene and trans-Muurolo-4 (14), 5-diene. The content of total phenolic compounds and the total antioxidant capacity were verified by the iron reduction method - FRAP, and by the ABTS and ORAC methods. The ethyl acetate fractions of the solid (FAES), ethyl acetate fraction (FAE) and the remaining fraction of the solid (FRS) showed the best results in these tests. In allelopathic activity, it was found that the extract and fractions influenced the germination and growth process of *Lactuca sativa* and *Allium cepa*. The hemolytic potential of the species it was low when compared to the positive control and the isolated astilbine was not considered a neutrophil activator. Regarding the larvicidal activity on *Aedes aegypti*, the essential oil of the leaves and branches were effective, including inducing external morphological changes in the exposed larvae, being classified as highly toxic to the organisms in question. The results obtained in this study show the potential of this plant species, which can be expanded in further studies.

Keywords: astilbina; essential oil; sesquiterpenes; antioxidante; allelopathy; *Aedes aegypti*.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - FORMAÇÃO DA ESTRUTURA BENZILISOQUINOLÍNICA A PARTIR DA L-TIROSINA .....	29
FIGURA 2 - ESQUELETOS BÁSICOS DE ALCALOIDES APORFÍNICOS EM <i>Ocotea</i> .....	29
FIGURA 3 - ESTRUTURA BÁSICA DE LIGNANA E NEOLIGNANAS .....	31
FIGURA 4 - FORMAÇÃO DE TERPENOS POR CONDENSAÇÃO DO IPP COM DMAPP .....	35
FIGURA 5 - FORMAÇÃO DE COMPOSTOS FENILPROPANOIDES .....	36
FIGURA 6 - ESQUELETO BÁSICO DE FLAVONOIDE .....	39
FIGURA 7 - OCORRÊNCIA DE <i>Ocotea bicolor</i> NO BRASIL .....	42
FIGURA 8 - FLUXOGRAMA DO ESTUDO DE <i>Ocotea bicolor</i> .....	55
FIGURA 9 - NUMERAÇÃO DOS ÁTOMOS DE CARBONO ADOTADA NA DISCUSSÃO DO ESPECTROS DE RMN DE <sup>1</sup> H E DE <sup>13</sup> C DA SUBSTÂNCIA ISOLADA.....	68
FIGURA 10 - ESPECTRO DE RMN DE <sup>1</sup> H DO COMPOSTO FAES 91.....	70
FIGURA 11 - ESPECTRO DE RMN DE <sup>13</sup> C DO COMPOSTO FAES 91 .....	71
FIGURA 12 - CROMATOGRAFIA GASOSA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE <i>Ocotea bicolor</i> . .....	76
FIGURA 13 - CROMATOGRAFIA GASOSA DO ÓLEO ESSENCIAL DOS GALHOS DE <i>Ocotea bicolor</i> . .....	76
FIGURA 14 - COMPONENTES MAJORITÁRIOS DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS E GALHOS DE <i>Ocotea bicolor</i> .....	80
FIGURA 15 - GERMINAÇÃO E ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG) DE <i>Lactuca sativa</i> FRENTE A FRAÇÕES DE <i>Ocotea bicolor</i> . .....	91
FIGURA 16 - GERMINAÇÃO E ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG) DE <i>Allium cepa</i> FRENTE A FRAÇÕES DE <i>Ocotea bicolor</i> .....	92
FIGURA 17 - ENSAIO DE CRESCIMENTO DA RADÍCULA DE <i>Lactuca sativa</i> SUBMETIDAS AO EXTRATO E FRAÇÕES DE <i>Ocotea bicolor</i> .....	97
FIGURA 18 - ENSAIO DE CRESCIMENTO DA RADÍCULA DE <i>Allium cepa</i> SUBMETIDAS AO EXTRATO E FRAÇÕES DE <i>Ocotea bicolor</i> .....	98
FIGURA 19 - ENSAIO DE CRESCIMENTO DO HIPOCÓTILO DE <i>Lactuca sativa</i> SUBMETIDAS AO EXTRATO E FRAÇÕES DE <i>Ocotea bicolor</i> .....	98
FIGURA 20 - ENSAIO DE CRESCIMENTO DO HIPOCÓTILO DE <i>Allium cepa</i> SUBMETIDAS AO EXTRATO E FRAÇÕES DE <i>Ocotea bicolor</i> .....	99
FIGURA 21 - COMPARAÇÃO DA PORCENTAGEM DE HEMÓLISE DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE <i>Ocotea bicolor</i> COM O CONTROLE POSITIVO .....	103
FIGURA 22 - ATIVAÇÃO QUALITATIVA DE NEUTRÓFILOS HUMANOS.....	105
FIGURA 23 - CURVAS DE CONCENTRAÇÃO-MORTALIDADE DAS LARVAS DE <i>Aedes aegypti</i> EXPOSTAS DURANTE 24H AO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS E GALHOS DE <i>Ocotea bicolor</i> .....	106

FIGURA 24 - COMPARAÇÃO DA CL <sub>50</sub> E CL <sub>95</sub> CONSIDERANDO OS INTERVALOS DE CONFIANÇA, MOSTRANDO A PRESENÇA DE SOBREPOSIÇÃO DOS INTERVALOS DE CONFIANÇA NAS CL <sub>95</sub> . .....	107
FIGURA 25 - MORFOLOGIA EXTERNA DA LARVA DE <i>Aedes aegypti</i> .....	108
FIGURA 26 - MORFOLOGIA EXTERNA DAS LARVAS DE <i>Aedes aegypti</i> EXPOSTAS AO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Ocotea bicolor</i> .....	109

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO DE <i>Ocotea bicolor</i> .....	41
QUADRO 2 - ESPÉCIES REATIVAS EM SISTEMAS BIOLÓGICOS .....	44

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - ATIVIDADES BIOLÓGICAS EM DIFERENTES ESPÉCIES DE <i>Ocotea</i> .....	26
TABELA 2 - ALCALOIDES ENCONTRADOS EM DIFERENTES ESPÉCIES DE <i>Ocotea</i> .....	30
TABELA 3 - LIGNANAS E NEOLIGNANAS PRESENTES EM DIFERENTES ESPÉCIES DE <i>Ocotea</i> .....	33
TABELA 4 - COMPOSTOS MAJORITÁRIOS PRESENTES EM ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Ocotea</i> .....	37
TABELA 5 - FLAVONOIDES PRESENTES EM DIFERENTES ESPÉCIES DE <i>Ocotea</i> .....	40
TABELA 6 - DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE RMN DE <sup>13</sup> C E <sup>1</sup> H DO COMPOSTO FAES91 EM COMPARAÇÃO COM DADOS DA LITERATURA PARA ASTILBINA .....	72
TABELA 7 - ATIVIDADES BIOLÓGICAS / FARMACOLÓGICAS DA ASTILBINA ISOLADA DE DIVERSAS ESPÉCIES .....	73
TABELA 8 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS E GALHOS DE <i>Ocotea bicolor</i> .....	77
TABELA 9 - TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DE <i>Ocotea bicolor</i> .....	81
TABELA 10 - CAPACIDADE ANTIOXIDANTE PELA REDUÇÃO DO FERRO (FRAP) DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DE <i>Ocotea bicolor</i> .....	82
TABELA 11 - CAPACIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO (ABTS) DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DE <i>Ocotea bicolor</i> .....	84
TABELA 12 - CAPACIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO (ORAC) DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DE <i>Ocotea bicolor</i> .....	85
TABELA 13 - CORRELAÇÃO DE PEARSON ENTRE CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS (TPC) DO EXTRATO E FRAÇÕES DE <i>Ocotea bicolor</i> .....	86
TABELA 14 - EFEITO DO EXTRATO E FRAÇÕES DE <i>Ocotea bicolor</i> SOBRE A GERMINAÇÃO E O ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG) DE <i>Lactuca sativa</i> E <i>Allium cepa</i> .....	88
TABELA 15 - ENSAIO DE CRESCIMENTO DA RADÍCULA E HIPOCÓTILO DE <i>Lactuca sativa</i> E <i>Allium cepa</i> SUBMETIDAS AO EXTRATO E FRAÇÕES DE <i>Ocotea bicolor</i> .....	93
TABELA 16 - ENSAIO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE <i>Ocotea bicolor</i> .....	101
TABELA 17 - CONCENTRAÇÃO-RESPOSTA DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS E GALHOS DE <i>Ocotea bicolor</i> EM LARVAS DE <i>Aedes aegypti</i> DE 4° ESTÁGIO LARVAL APÓS 24H DE EXPOSIÇÃO .....	105

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AAPH	– 2,2'-azobis(2-amidinopropano) dihidroclorado
Abs	– Absorbância
ABTS	– 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico
ANOVA	– Análise de variância
ASTM	– <i>American Society for Testing and Materials</i>
BHA	– hidroxianisol butilado
BHT	– hidroxitolueno butilado
BOD	– <i>Biochemical Oxygen Demand</i>
CCD	– Cromatografia em camada delgada
CDC	– Centro de controle de doenças
CG/EM	– Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
CIFLOMA	– Centro de Ciências Florestais da Madeira
CIM	– Concentração inibitória mínima
CL <sub>50</sub>	– Concentração letal 50%
DDT	– Diclorodifeniltricloroetano
DMAPP	– 3,3'-dimetilalil pirofosfato
DPPH	– 2,2-difenil-1-picrilhidrazila
EAG	– Equivalente de ácido gálico
EDTA	– Ácido etilenodiamino tetra-acético
EB	– Extrato bruto do caule
FAE	– Fração acetato de etila
FAES	– Fração acetato de etila do sólido
FCF	– Fração clorofórmio
FCS	– Fração clorofórmio do sólido
FH	– Fração hexano
FHS	– Fração hexano do sólido
FR	– Fração remanescente
FRAP	– <i>Ferric Reducing Anti-oxidant Power</i>
FRS	– Fração remanescente do sólido
GL	– Gay-Lussac
IA	– Índice aritmético
IBAMA	– Instituto Brasileiro do Meio Ambiente

IC <sub>50</sub>	– Concentração inibitória 50%
IPP	– 3-isopentenil pirofosfato
IRc	– Índice de retenção calculado
IRt	– Índice de retenção
IVG	– Índice de velocidade de germinação
MBM	– Museu Botânico Municipal
MET	– Metanol
NIST14	– <i>National Institute of Standards and Technology-14</i>
OE	– Óleo essencial
OMS	– Organização Mundial de Saúde
ORAC	– Capacidade de absorção de radicais de oxigênio
PMA	– Forbol-12-miristato-13-acetato
PBS	– Salina tamponada com fosfato
pH	– Potencial hidrogeniônico
ppm	– Partícula por milhão
RMN	– Ressonância magnética nuclear
ROS	– Espécies reativas de oxigênio
RNS	– Espécies reativas de nitrogênio
RSS	– Espécies reativas de enxofre
rpm	– Rotação por minuto
RUT	– Rutina
SE	– Semana Epidemiológica
SAP	– Saponina
SisGen	– Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado
SPSS	– <i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
TMS	– Tetrametilsilano
TPC	– Composto fenólicos totais
TPTZ	– 2,4,6-Tris(2-Piridil)-S-Triazina
TR	– Tempo de retenção
UFPR	– Universidade Federal do Paraná



## LISTA DE SÍMBOLOS

$\mu\text{g}$	– Micrograma
$\mu\text{L}$	– Microlitro
$\mu\text{M}$	– Micromolar
$\mu\text{mol}$	– Micromol
$^{13}\text{C}$	– Carbono 13
$^1\text{H}$	– Hidrogênio 1
$^{\circ}\text{C}$	– Grau Celsius
%	– Porcentagem
Fe	– Ferro
$\text{Fe}^{2+}$	– Íon ferroso
$\text{Fe}^{3+}$	– Íon férrico
$\text{FeCl}_3$	– Cloreto férrico
g	– Grama
h	– Hora
H	– Hidrogênio
$\text{H}_2\text{O}$	– Água
$\text{H}_2\text{O}_2$	– Peróxido de hidrogênio
HCl	– Ácido clorídrico
He	– Hélio
HOCl	– Ácido hipocloroso
$\text{HNO}_2$	– Ácido nitroso
Hz	– Hertz
KCl	– Cloreto de potássio
Kg	– Kilograma
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	– Fosfato Monopotássico
L	– Litros
mg	– Miligrama
MHz	– Megahertz
mL	– Microlitros
mM	– Milimolar
mm	– Milímetros

m/z	– Massa (m) sobre a carga
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	– Fosfato dissódico
NaCl	– Cloreto de sódio
nM	– Nanomolar
NO•	– Óxido nítrico
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	– Nitritos
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	– Nitratos
N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	– Óxido nitroso
O <sub>2</sub>	– Oxigênio molecular
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	– Radical superóxido
OH•	– Radical hidroxila
ONOO <sup>-</sup>	– Peroxinitritos
RO•	– Radical alcoxila
ROO•	– Radical peroxila
ROOH	– Peróxidos derivados de lipídeos
RS•	– Radical tiíla
v/v	– Volume por volume

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>21</b>
1.1	OBJETIVOS .....	23
1.1.1	Objetivo Geral.....	23
1.1.2	Objetivos Específicos .....	23
2	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>24</b>
2.1	FAMÍLIA LAURACEAE .....	24
2.2	GÊNERO <i>Ocotea</i> Aubl. ....	25
2.3	ATIVIDADES BIOLÓGICAS E FARMACOLÓGICAS DO GÊNERO <i>Ocotea</i> Aubl. ....	26
2.4	METABÓLITOS SECUNDÁRIOS NO GÊNERO <i>Ocotea</i> Aubl.....	27
2.4.1	Alcaloides .....	28
2.4.2	Lignanas e neolignanas.....	31
2.4.3	Óleos essenciais.....	34
2.4.4	Flavonoides .....	39
2.5	<i>Ocotea bicolor</i> Vattimo-Gil.....	41
2.5.1	Ocorrência e sinonímia.....	41
2.5.2	Dados fitoquímicos de <i>Ocotea bicolor</i> Vattimo-Gil.....	42
2.5.3	Capacidade antioxidante e atividades biológicas de <i>Ocotea bicolor</i> .....	43
2.6	ANTIOXIDANTES .....	43
2.6.1	Aspectos gerais .....	43
2.6.2	Métodos de avaliação da capacidade antioxidante .....	46
2.6.2.1	Método FRAP (poder antioxidante de redução do íon Fe <sup>3+</sup> ).....	46
2.6.2.2	Método ABTS <sup>•+</sup> [2,2-azono-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)].....	47
2.6.2.3	Método ORAC (Capacidade de Absorção de Radicais de Oxigênio) .....	47
2.7	ATIVIDADE ALELOPÁTICA .....	48
2.8	ATIVIDADE HEMOLÍTICA.....	50
2.9	ATIVAÇÃO DE NEUTRÓFILOS.....	50
2.10	<i>Aedes aegypti</i> L. ....	51
2.10.1	Aspectos gerais .....	51
2.10.2	Toxicidade .....	53
3	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>55</b>
3.1	OBTENÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO.....	55

3.2	ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS	56
3.2.1	Isolamento	56
3.2.2	Identificação	57
3.3	EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL	57
3.3.1	Caracterização química do óleo essencial	58
3.4	TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS	58
3.5	ESTUDOS DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE	59
3.5.1	Capacidade antioxidante total pelo método de redução do ferro - FRAP (capacidade antioxidante por meio da redução do ferro)	59
3.5.2	Capacidade antioxidante pelo método ABTS <sup>•+</sup>	60
3.5.3	Capacidade antioxidante pelo método ORAC (Capacidade de Absorção de Radicais de Oxigênio)	60
3.5.4	Análise estatística	61
3.6	ATIVIDADES BIOLÓGICAS	61
3.6.1	Atividade alelopática	61
3.6.1.1	Teste de Germinação	62
3.6.1.2	Teste de Crescimento	63
3.6.2	Atividade hemolítica	63
3.6.3	Ensaio de NBT sobre neutrófilos humanos	64
3.6.4	Atividade larvicida sobre <i>Aedes aegypti</i> (CULICIDAE)	65
4	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b>	<b>67</b>
4.2	ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS	67
4.2.1	Composto FAES 91	67
4.3	ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS E GALHOS DE <i>Ocotea bicolor</i> Vattimo-Gil	75
4.3.1	Rendimento do óleo essencial	75
4.3.2	Análise cromatográfica do óleo essencial	75
4.4	COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS	81
4.5	AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE	82
4.5.1	Capacidade antioxidante total pelo método de redução do ferro - FRAP	82
4.5.2	Capacidade antioxidante total pelo método ABTS	83
4.5.3	Capacidade antioxidante total pelo método ORAC	84
4.5.4	Correlação entre capacidade antioxidante e teor de compostos fenólicos	86
4.6	AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS	88

4.6.1	Atividade alelopática.....	88
4.6.1.1	Teste de Germinação .....	88
4.6.1.2	Teste de Crescimento.....	93
4.6.2	Avaliação da atividade hemolítica.....	100
4.6.3	Avaliação do ensaio de NBT sobre neutrófilos humanos .....	104
4.6.4	Avaliação da atividade larvicida sobre <i>Aedes aegypti</i> (CULICIDAE).....	105
4.6.4.1	Alterações morfológicas externas das larvas de <i>Aedes aegypti</i> submetidas ao tratamento do óleo essencial de folhas e galhos de <i>Ocotea bicolor</i> .....	108
5	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>112</b>
6	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>114</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>115</b>
	ANEXO 1 - AUTORIZAÇÃO DAS ATIVIDADES DE ACESSO AO PATRIMÔNIO GENÉTICO .....	139
	ANEXO 2 - APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA CEP/SD 1033.158.10.11.....	140
	ANEXO 3 - APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA 23075.027346/2013-18.....	141

## 1 INTRODUÇÃO

O emprego de plantas com fins medicinais, seja na cura, tratamento ou prevenção de enfermidades é tão antigo quanto a própria civilização humana (MACIEL et al., 2002; VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005; FOWLER, 2006). Esse uso tem em comum tanto bases históricas e culturais como químicas, sendo esta última fundamentada na obtenção de moléculas a serem utilizadas terapeuticamente (DEVIIENNE; RADDI; POZETTI, 2004).

O processo de descoberta de novos compostos bioativos advindos de plantas está em constante expansão. Um dos fatores que contribuem para essa expansão é o aperfeiçoamento das técnicas que permitem o isolamento e elucidação de suas estruturas moleculares (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998; FOGGIO et al., 2006; PILON et al., 2020). Uma vez estando os metabólitos secundários isolados e identificados, podem servir como fitofármacos ou como protótipo à indústria farmacêutica no desenvolvimento de novos medicamentos (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

No entanto, para que ocorra um melhor aproveitamento do potencial medicinal das plantas há necessidade de um enfoque multidisciplinar, onde o estudo fitoquímico esteja interligado com os aspectos agrotecnológico, microbiológico, farmacológico e biotecnológico, de tal forma que esta integração propicie uma ampliação das possibilidades na busca de novas moléculas ativas (FOGLIO et al., 2006).

A prospecção e os relatos científicos sobre as ações antioxidante, anti-inflamatória e inseticida das plantas, geralmente servem como parâmetros para eleger uma espécie vegetal a ser estudada (VIZZOTTO; KROLOW; WEBER, 2010). O interesse pela descoberta de antioxidantes novos e seguros de fontes naturais tem aumentado, representando uma nova abordagem na inibição dos danos provocados pelo excesso de radicais livres. O papel de antioxidantes obtidos pela dieta, especialmente aqueles extraídos de plantas, tem atraído a atenção dos pesquisadores (ZHENG; WANG, 2001; FORBES-HERNÁNDEZ et al., 2020; MATALLANA-GONZÁLEZ et al., 2020).

Levando-se em consideração que o estresse oxidativo é um desencadeador de muitas patologias, principalmente câncer e desordens cardiovasculares, como arteriosclerose, a procura de novos compostos que inibam esse processo é de

grande relevância (VALENTOVA, et. al., 2003; EBRAHIMI; REIISI; SHAREEF, 2020; SANTOS et al, 2020). Entre as substâncias com ação antioxidante de origem vegetal destacam-se os compostos fenólicos, sobretudo por inibirem a peroxidação lipídica e a lipooxigenase in vitro, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os flavonoides constituem o grupo mais importante dentro dos compostos fenólicos e com ação antioxidante comprovada pela ciência (SOARES, 2002; BEHLING et al., 2004).

A obtenção de compostos bioativos com ação larvicida e inseticida tem sido alvo de vários estudos. Os efeitos indesejáveis de inseticidas sintéticos sobre o ecossistema têm motivado a busca por novas substâncias no controle de pragas, que não acarretem danos ao ambiente, efeitos danosos em organismos não-alvo, resíduos em alimentos e que minimizem o surgimento de resistência, aspectos observados em substâncias sintéticas (VENDRAMIM; CASTIGLIONI, 2000; PINTO et al., 2002; LAKSHMI; SUDHIKUMAR; ANEESH, 2018; SENTHIL-NATHAN, 2020). Os compostos ativos provenientes do metabolismo secundário das plantas agem sinergicamente, apresentando características atraentes, desalojantes ou repelentes, podendo ser empregados em sistemas de manejo integrado de pragas, e também no controle e monitoramento das populações de insetos (ISMAN, 2006; NAVARRO-SILVA; MARQUES; DUQUE, 2009; YANKANCHI; YADAV; JADHAV, 2014).

Ainda nesse contexto, substâncias naturais que apresentem efeitos alelopáticos podem servir de instrumento em manejos ecológicos (CASIMIRO et al., 2017). Essa estratégia oportuniza a descoberta de novos bio-herbicidas, despertando a atenção de muitos pesquisadores ao redor do mundo (ABD EL-GAWAD; EL-AMIER; BONANOMI, 2018). Os aleloquímicos (substâncias com potencial alelopático) podem direcionar ou restringir a germinação e o desenvolvimento da planta. Isso representa um aumento da produtividade, aliado a um menor acúmulo de fitotóxicos na água e no solo (MACÍAS et al., 2003).

Neste cenário o Brasil figura-se como detentor de uma biodiversidade com inúmeras aplicabilidades, dentre as quais se podem encontrar plantas com potencial medicinal (BRASIL, 2006). A família Lauraceae compõe esse arsenal com representatividade de 24 gêneros no território brasileiro (QUINET et al., 2015), cujo gênero *Ocotea* Aubl. é o mais promissor em número de espécies medicinais nessa família (MARQUES, 2001) com atividades antioxidante, antimicrobiana, antifúngica,

anti-inflamatória, alelopática, entre outras, reportadas na literatura (BRUNI et al., 2004; SOUZA et al., 2004; CHAO et al., 2005; CANDIDO et al, 2016).

Uma das espécies desse gênero é a *Ocotea bicolor* Vattimo-Gil, planta nativa brasileira cuja escassez de estudos motivou essa pesquisa, sendo esta pioneira na busca e comprovação do potencial antioxidante e biológico além do estudo fitoquímico visando assegurar sua utilização e servir de parâmetros para o desenvolvimento de novos medicamentos.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo Geral

Aprofundar o estudo fitoquímico, antioxidante e biológico de *Ocotea bicolor* Vattimo-Gil pertencente a família Lauraceae.

### 1.1.2 Objetivos Específicos

- Isolar e identificar os componentes fitoquímicos nas frações;
- Caracterizar quimicamente o óleo essencial;
- Verificar a capacidade antioxidante do extrato e frações, por meio de técnicas colorimétricas;
- Avaliar a atividade hemolítica do extrato e frações;
- Avaliar a atividade alelopática do extrato e frações;
- Avaliar a atividade do composto isolado astilbina sobre neutrófilos humanos;
- Avaliar a atividade tóxica do óleo essencial sobre larvas de *Aedes aegypti*;



## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 FAMÍLIA LAURACEAE

A família Lauraceae possui distribuição pantropical, compreendendo 68 gêneros com 2.978 espécies (THE PLANT LIST, 2013). Prevalente nas regiões tropicais das Américas e da Ásia, apresenta também grande número de espécies na Austrália e Madagascar, porém com número insignificante de espécies na África (VAN DER WERFF, RITCHER, 1996; MADRIÑÁN, 2004). No Brasil, ocorrem 24 gêneros e cerca de 441 espécies com ocorrências confirmadas em todas as regiões do país, sendo seus domínios fitogeográficos na Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica e Pantanal (QUINET et al., 2015).

Esta família é composta essencialmente por árvores e arbustos, com exceção do gênero *Cassytha* cujas plantas são herbáceas parasitas (VAN DER WERFF, 1991). Pertencem à família espécies com grande interesse econômico como produtoras de madeira de lei, frutos comestíveis, além dos óleos aromáticos usados em cosmetologia, perfumaria e medicamentos (BAITELLO, 2016).

O estudo com espécies da família Lauraceae é afetado por diversos fatores, tais com: a grande variação morfológica dentro de uma mesma espécie, população e até mesmo em indivíduos; dificuldade na coleta e observação na natureza já que normalmente são árvores altas com flores pequenas e discretas; número reduzido de coleções disponíveis nos herbários, principalmente contendo flores e frutos; e, por fim, o grande número de espécies pertencentes a família (BAITELLO, 2016; BURGER, 1988).

No âmbito etnofarmacológico, Lauraceae apresenta utilização variada, desempenhando diferentes funções contra as mais diversas doenças (MARQUES 2001). A infusão das folhas de *Persea americana* Mill (abacateiro) é utilizada para reumatismo e artrite (ALBUQUERQUE, 2001) e o chá da semente para infecções dos rins (LIMA; PIRES; VIEIRA, 2014); *Cinnamomum zeylanicum* (canela) como anti-séptica e anti-inflamatória (CABRAL; MACIEL, 2011) e a casca para digestão (LIMA; PIRES; VIEIRA, 2014); infusão de folhas e frutos de *Laurus nobilis* L. utilizados contra reumatismo (LIMA; PIRES; VIEIRA, 2014); frutos e folhas de *Nectandra pichurim* (Kunth) Mez. são odoríferos e usados contra cólicas e

problemas gástricos e o lenho de *Nectandra rodiei* Schomb. é reconhecido como tônico, antipirético, relaxante vascular e antimalárico (MARQUES, 2001).

## 2.2 GÊNERO *Ocotea* Aubl.

*Ocotea* é o maior gênero no Neotrópico com pelo menos 300 espécies distribuídas do México e Sul da Flórida até a Argentina (VAN DER WERFF 1991; ROHWER 1993). No Brasil aproximadamente 172 espécies pertencem a este gênero, apresentando ampla distribuição, com ocorrências confirmadas em todo o território nacional (QUINET et al., 2015). No estado do Paraná foi confirmada a presença de 31 espécies, cuja maioria encontra-se na Floresta Atlântica (BROTTO; CERVI; SANTOS, 2013).

Este gênero é composto por árvores ou arbustos, monoicos ou dioicos, cujas características morfológicas são: folhas em geral alternas, raro opostas ou subopostas. Inflorescência panícula, tirso, tirsoide ou botrioide. Flores monoclinas ou diclinas, tépalas 6. Estames 9 férteis, filetes mais delgados que as anteras, anteras 4-locelos, locelos dispostos em pares sobrepostos; estaminódios da série IV filiformes ou ausentes. Ovário globoso, elipsoide, obovado ou ovado. Fruto bacáceo, sobre ou parcialmente envolvido pelo hipanto modificado em cúpula; tépalas decíduas ou persistentes (SANTOS; ALVES, 2013).

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

Em relação ao uso etnofarmacológico deste gênero, destacam-se as seguintes espécies: folhas de *O. aciphylla* utilizadas como tônico e estomáquico e sua casca como anti-reumática e depurativa; casca e as folhas de *O. pulchella* foram relatadas como sendo estomáquicas, emenagogas e tônicas do útero; *O. teleiandra*, contra “dores no peito”; *O. indecora* como sudorífica e anti-reumática e até

antisifilítica (MARQUES, 2001); *O. bullata* utilizada no tratamento de dor de cabeça, desordens urinárias e problemas estomacais (RAKOTONDRAIBE et al., 2015); *O. duckei* no tratamento de enfermidades como neuralgia, dispepsia e anorexia (VILLAMIZAR, 2010); *O. quixos* usada como desinfetante, anestésico local e a infusão como antidiarreico (BALLABENI et al., 2007) e *O. caparrapi* no tratamento de picadas de insetos e cobra, bronquite e como antitumoral (FOURNET et al., 2007).

### 2.3 ATIVIDADES BIOLÓGICAS E FARMACOLÓGICAS DO GÊNERO *Ocotea* Aubl.

O gênero *Ocotea* apresenta o maior número de espécies medicinais em sua família, exibindo capacidade antioxidante, antimicrobiana, antifúngica, anti-inflamatória, leishmanicida, atividade inibitória de agregação plaquetária entre outras (MORAIS; BARBOSA-FILHO; ALMEIDA, 1998; ZSCHOCKE et al., 2000; BRUNI et al., 2004; SOUZA et al., 2004; CHAO et al., 2005; MONTE NETO et al., 2007; FOURNET et al., 2007; VILLAMIZAR, 2010). A (TABELA 1) apresenta algumas atividades biológicas presentes neste gênero.

TABELA 1 - ATIVIDADES BIOLÓGICAS EM DIFERENTES ESPÉCIES DE *Ocotea*

(continua)

<b>Espécies</b>	<b>Atividades</b>	<b>Referências</b>
<i>O. floribunda</i>	Toxicidade em <i>Artemia salina</i>	WERKA; BOEHME; SETZER, 2007
<i>O. duckei</i>	Efeitos hipotensivos e bradicárdicos	BARBOSA FILHO et al., 2008
<i>O. duckei</i>	Atividade leishmanicida	MONTE NETO et al., 2007
<i>O. comoriensis</i>	Atividade antimalárica	MENUT et al., 2002
<i>O. caudata</i>	Atividade antimicrobiana e citotóxica	SILVA et al., 2017a
<i>O. cujumary</i>	Atividade antimicrobiana e citotóxica	SILVA et al., 2017a
<i>O. caniculata</i>	Atividade antimicrobiana e citotóxica	SILVA et al., 2017a
<i>O. odorifera</i>	Capacidade antioxidante e antimicrobiana	CANSIAN et al., 2010
<i>O. odorifera</i>	Capacidade antioxidante, antibacteriana e antimutagênica	GONTIJO et al, 2017

TABELA 1 - ATIVIDADES BIOLÓGICAS EM DIFERENTES ESPÉCIES DE *Ocotea*

(conclusão)

Espécies	Atividades	Referências
<i>O. odorifera</i>	Atividade alelopática	CARMO; LIMA-BORGES; TAKAKI, 2007
<i>O. pulchella</i>	Atividade alelopática	CANDIDO et al., 2016
<i>O. odorifera</i>	Atividade antifúngica	CASTRO; LIMA, 2011
<i>O. puberula</i>	Atividade antinociceptiva	MONTRUCHIO et al., 2012
<i>O. nigrescens</i>	Atividade anti-inflamatória	YAMAGUCHI et al., 2013
<i>O. splendens</i>	Atividade anti-inflamatória	YAMAGUCHI et al., 2013
<i>O. quixos</i>	Atividade anti-inflamatória e antitrombótica	BALLABENI et al., 2010

FONTE: A autora (2018).

#### 2.4 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS NO GÊNERO *Ocotea* Aubl.

Os metabólitos secundários também podem ser denominados de produtos secundários. São agrupados em quatro grandes grupos: terpenos, compostos fenólicos, glicosídeos e alcaloides. Os terpenos constituem o grupo mais numeroso e são sintetizados a partir do ácido mevalônico (no citoplasma) ou do piruvato e 3-fosfoglicerato (no cloroplasto). Os compostos fenólicos são originários do ácido chiquímico ou ácido mevalônico. Os glicosídeos são formados pela condensação de uma molécula de açúcar com outra que contém um grupamento hidroxila. Por fim, os alcaloides são derivados de aminoácidos aromáticos (triptofano, tirosina), os quais são derivados do ácido chiquímico e de aminoácidos alifáticos (ornitina, lisina) (CARRIL; GARCÍA; 2009).

Neste contexto o gênero *Ocotea* é conhecido por ser fonte de alcaloides, sobretudo os isoquinolínicos e aporfínicos (GOTTLIEB, 1972; TAKAKU; HABER; SETZER, 2007), de lignanas e neolignanas (SILVA; BRAZ-FILHO; GOTTLIEB, 1989) e óleos essenciais constituídos por monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanoides (BRUNI et al., 2004). Os flavonoides também estão presentes, embora menos descritos neste gênero se comparado aos alcaloides.

### 2.4.1 Alcaloides

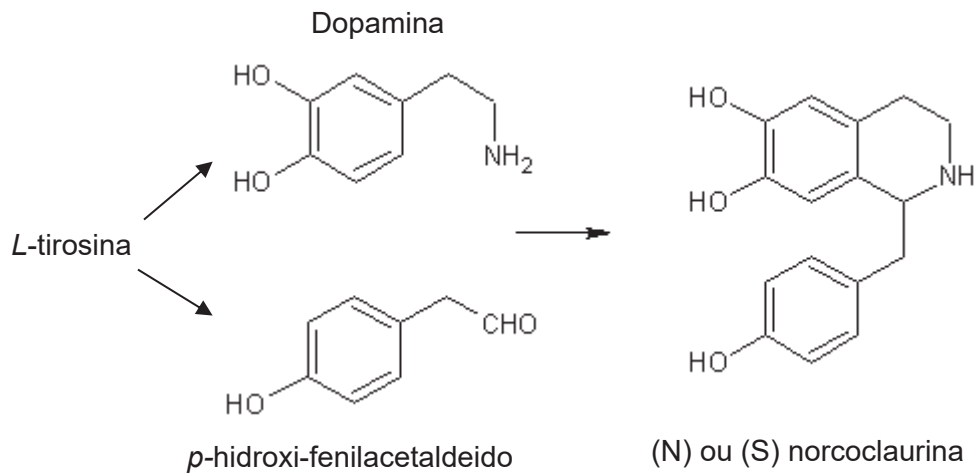
Os alcaloides compreendem um enorme grupo de produtos naturais, com uma grande diversidade de estruturas. São definidos como um composto orgânico, cíclico que contém nitrogênio em um estado de oxidação negativo, o qual é de distribuição limitada entre os organismos vivos (DOSTÁL, 2000). Esta classe de metabólitos apresenta grande importância em face das atividades farmacológicas a ela atribuídas, as quais se devem principalmente aos efeitos antagônicos da dopamina (KAMETANI; HONDA, 1985; OSCAR, 1987).

Os alcaloides podem ser classificados de acordo com sua origem biossintética, ou seja, de acordo com a estrutura que contém nitrogênio em pirrolidino, piperidino, quinolino, indol, entre outros (DEWICK, 2002). A família Lauraceae caracteriza-se quimicamente pela ocorrência frequente de alcaloides, sendo predominante a ocorrência de alcaloides indolizínico, benzilisoquinolínico, triptamínico e aporfínicos (CORDELL; QUIRN-BEATTIE; FARNSWORTH, 2001). No gênero *Ocotea* os alcaloides isoquinolínicos apresentam predominância, dentre os quais os aporfínicos representam um grupo grande e ainda em expansão (TAKAKU; HABER; SETZER, 2007).

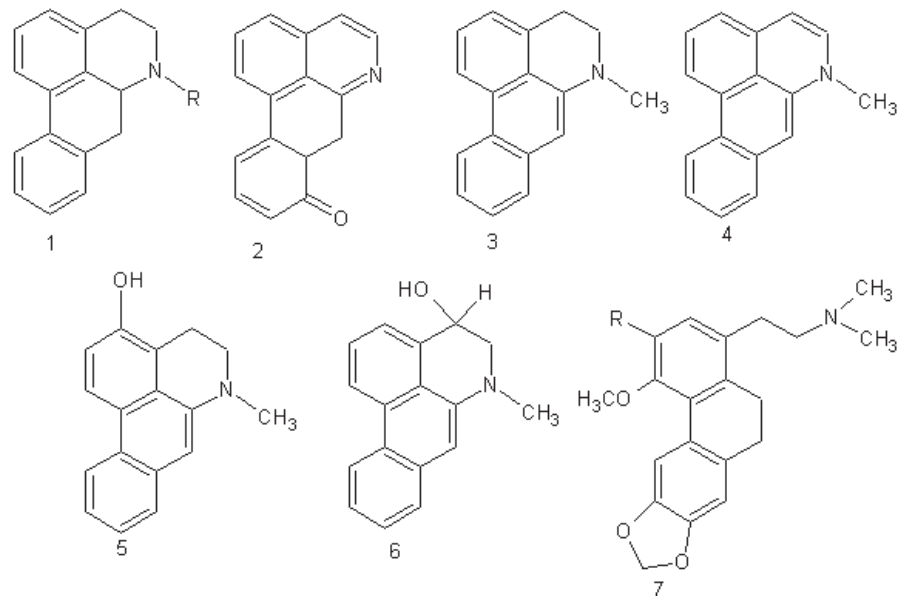
Os alcaloides isoquinolínicos tem sua origem biossintética pela rota do ácido chiquímico, o qual é responsável pela formação dos aminoácidos como a *L*-fenilalanina e *L*-tirosina, precursores dessa classe de alcaloides. A maioria dos alcaloides isoquinolínicos resulta da condensação de duas unidades fenólicas derivadas do aminoácido *L*-tirosina, a dopamina e o *p*-hidroxi-fenilacetaldeído, o qual está presente junto com a dopamina nas plantas. A ciclização com este aldeído leva a 1- benziltetraidroisoquinolina também conhecida como (N) ou (S) norcoclaurina conforme mostra a (FIGURA 1), a qual é a unidade básica para a formação de uma série variada e extremamente extensa de alcaloides (GUINAUDEAU; LEBOEUF; CAVÉ, 1994).

Os alcaloides aporfínicos são derivados dos isoquinolínicos, sendo que em *Ocotea* já foram encontrados os aporfínicos *sensu stricto*, oxoaporfínicos, diidroaporfínicos, dideidroaporfínico, C-3-O-aporfínico, C-4-O-aporfínico e fenantrenos, dos quais os aporfínicos *sensu stricto* são os mais comuns no gênero (FIGURA 2) (ZANIN; LORDELLO, 2007).

FIGURA 1 - FORMAÇÃO DA ESTRUTURA BENZILISOQUINOLÍNICA A PARTIR DA L-TIROSINA



FONTE: Adaptado de DEWICK, 1997.

FIGURA 2 - ESQUELETOS BÁSICOS DE ALCALOIDES APORFÍNICOS EM *Ocotea*

FONTE: Adaptado de GUINAUDEAU; LEBOEUF; CAVÉ, 1994

NOTA: 1-Aporfínico *strictu sensu*; 2-Oxoaporfínico; 3-Dihidroaporfínico, 4-Dideidroaporfínico; 5- C-3-aporfínico; 6- C-4-aporfínico; 7-Fenantreno

Várias atividades de alcaloides isolados de *Ocotea* foram comprovadas, tais como bloqueador de contração muscular e translocação de  $\text{Ca}^{2+}$  (nantenina) (RIBEIRO et al., 2003), antagonista  $\alpha$  1- adrenoreceptor (derivados da nantenina) (INDRA et al., 2002), atividade antituberculosa (ocoteína) (ALBARRACIN et al., 2017), atividade antinociceptiva (dicentrina) (MONTRUCCHIO; CÓRDOVA; SANTOS, 2013), propriedades tranquilizantes e ansiolíticas (glaziovina) (PÉREZ;

SÁEZ; CASSELS, 2005), atividade depressora do sistema nervoso central (reticulina) (MORAIS; BARBOSA-FILHO; ALMEIDA, 1998) entre outras.

Várias espécies de *Ocotea* são reportadas na literatura como fonte de alcaloides dos quais alguns estão listados na (TABELA 2).

TABELA 2 - ALCALOIDES ENCONTRADOS EM DIFERENTES ESPÉCIES DE *Ocotea*

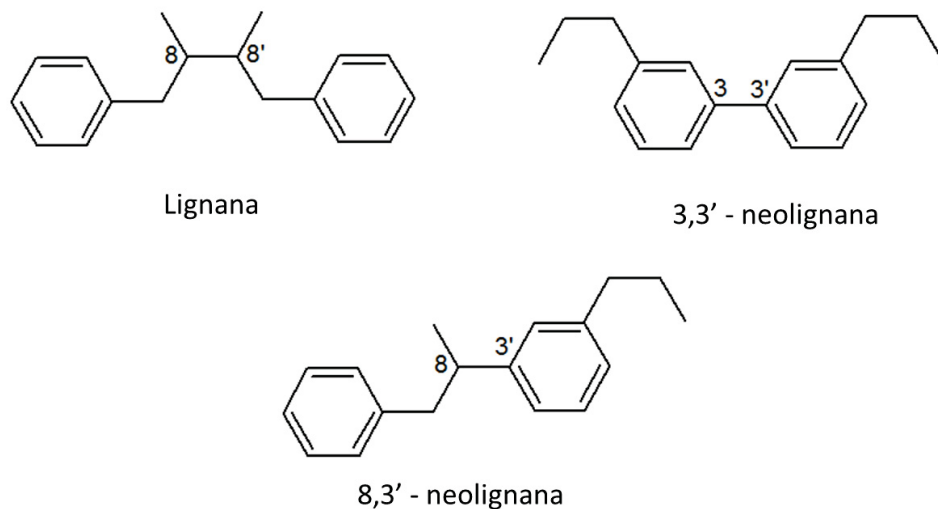
Espécies	Alcaloides	Classe	Referências
<i>O. discolor</i>	Ocoxilonina Ocoteina Dicentrina 1,2-metilendioxi-3 10,11-trimetoxiaporfina	aporfínico stricto sensu aporfínico stricto sensu aporfínico stricto sensu aporfínico stricto sensu aporfínico stricto sensu	ALBARRACIN et al., 2017
<i>O. duckei</i>	Coclaurina Coclaurina + N-metilcoclaurina	Isoquinolínicos Isoquinolínicos Isoquinolínicos	DIAS et al., 2003
<i>O. lancifolia</i>	(-)-N-Metilcoclaurina Crostoparine Glaziovina (-)-Caaverina (+)-Laurotetanina (+)-Nordomesticina (+)-Norisoboldina (+)-Norantenina (+)-Domesticina (+)-Isoboldina (S)-Palidina (+)-Norjuzifina (+)-Reticulina	Isoquinolínicos Isoquinolínicos Isoquinolínicos Isoquinolínicos Isoquinolínicos Isoquinolínicos Isoquinolínicos Isoquinolínicos Isoquinolínicos Isoquinolínicos isoquinolínicos isoquinolínicos isoquinolínicos	FOURNET et al., 2007
<i>O. acutifolia</i>	Talicminina (+)-dicentrina (+)-ocoteina (+)-6S-ocoteina N-óxido (+)-leucoxina	oxoaporfínico aporfínico stricto sensu aporfínico stricto sensu aporfínico stricto sensu aporfínico stricto sensu	GUTERRES et al., 2013
<i>O. puberula</i>	(+)-Dicentrina	aporfínico stricto sensu	MONTRUCCHIO et al., 2012
<i>O. puberula</i>	Boldina Isodomesticina Dicentrina Leucoxina	aporfínico stricto sensu aporfínico stricto sensu aporfínico stricto sensu aporfínico stricto sensu	ZANIN et al., 2011
<i>O. glaziovii</i>	Glaziovina Assimilobina Caaverina Liridinina	Isoquinolínicos Isoquinolínicos Isoquinolínicos Isoquinolínicos	SILVA et al., 2002

FONTE: A autora (2018).

## 2.4.2 Lignanas e neolignanas

As lignanas são metabólitos secundários localizados em todas as partes das plantas e se depositam nas paredes das células vegetais, conferindo a estas, notável rigidez (BARBOSA FILHO, 2004). Assumem muitas vezes a função de fitoalexinas e agem na proteção das plantas contra doenças e pestes, também podem participar no controle do crescimento da planta (RAFFAELLI et al., 2002). São derivados de fenólicos cuja estrutura básica é formada pelo acoplamento oxidativo de duas unidades fenilpropanoídicas (do tipo  $C_6C_3$ ) nas posições 8 e 8'. Quando este acoplamento ocorre entre outros carbonos destas unidades, estes compostos recebem o nome de neolignanas (FIGURA 3) (GOTTLIEB, 1972; MOSS, 2000).

FIGURA 3 - ESTRUTURA BÁSICA DE LIGNANA E NEOLIGNANAS



FONTE: Adaptado de MOSS, 2000.

Lignanas e neolignanas tem ampla ocorrência na natureza e extensa gama de atividades biológicas (AGRAWAL; THAKUR, 1985), destacando-se atividade inseticida, antibacteriana, antitumoral e antiviral (GREEN; GALINIS; WIEMER, 1991; LEE et al., 1998; SOLIS et al., 2005; LI et al., 2007; BOZINIS et al., 2010).

Uma das lignanas com pronunciada finalidade terapêutica é a podofilotoxina cuja ação antitumoral tem despertado o interesse de grupos de pesquisa e de indústrias farmacêuticas, sendo utilizada como composto inicial para produção do etoposídeo (VEPESID®), o etopofos (ETOPOPHOS®) e o teniposídeo (VUMON®),



medicamentos utilizados no tratamento de alguns tipos de câncer. Esses resultados colocaram essa substância em posição de destaque na pesquisa em produtos naturais (KOULMAN, 2003; SELLARS; STEEL, 2007; DE LUCA et al., 2012).

Os benefícios da ingestão de lignanas na dieta humana também é muito relatada, destacando-se a linhaça (*Linum usitatissimum*) como fonte desse metabólito. A ação da linhaça sobre o metabolismo do tecido adiposo e diminuição de gordura visceral são atribuídos à presença das lignanas nesta espécie (CARDOSO-CARRARO et al., 2012).

A rota biossintética das lignanas e neolignanas origina-se pela via do ácido chiquímico que utiliza como precursores o fosfoenolpiruvato (PEP), oriundo da glicólise, e a eritrose 4-P proveniente da rota das pentoses monofosfatadas e do ciclo de Calvin, resultando na biossíntese dos aminoácidos fenilalanina, tirosina e triptofano (DEWICK, 2002). Os aminoácidos fenilalanina ou a tirosina, uma vez formados, podem entrar na chamada rota geral dos fenilpropanoides, que darão origem a diversos tipos de compostos fenólicos entre os quais estão as lignanas. A rota dos fenilpropanoides inicia com a *trans*-desaminação da fenilalanina ou tirosina ao ácido *trans*-cinâmico ou *p*-cumárico, respectivamente, numa reação catalisada pela fenilalanina amônia liase (PAL) em dicotiledôneas, e pela tirosina amônia liase (TAL) em monocotiledôneas (DIAS et al., 2001).

Etapas posteriores de redução resultam finalmente em alil - e fenilpropanóis, os quais, por acoplamentos oxidativos iniciados pelas peroxidases ou lacases, formam os chamados intermediários quinona-metídeos que, posteriormente, entram em ressonância. *In vitro*, os radicais livres se dimerizam para produzir uma mistura racêmica. No entanto, na planta, a dimerização é controlada e a formação de um estereoisômero é favorecida. Esses radicais sofrerão então acoplamentos oxidativos posteriores e darão origem aos diferentes esqueletos básicos das lignanas e neolignanas (DAVIN; LEWIS, 2000).

As lignanas e neolignanas constituem um grupo de substâncias bastante frequente em espécies de *Ocotea* (SEHLAPELO; DREWES; SANDOR, 1993). A (TABELA 3) sumariza alguns desse compostos isolados no gênero *Ocotea*.

TABELA 3 - LIGNANAS E NEOLIGNANAS PRESENTES EM DIFERENTES ESPÉCIES DE *Ocotea*

Espécies	Lignanas/neolignanas	Referências
<i>O. cymosa</i>	Cymosalignan A	RAKOTONDRAIBE et al., 2015
	Cymosalignan B	
	Cymosalignan C	
	3',4'-Methylenedioxy-3,4,5-trimethoxy- $\Delta^8$ -8.O.6'-neolignan	
	Ococyosin	
	Didymochlaenone B	
	Didymochlaenone C	
<i>O. duckei</i>	3,4,5,3',5'-Pentamethoxy-1'-allyl-8.O.4'-neolignan	MORAIS et al, 1999
	3,4,5,3'-Tetramethoxy-1'-allyl-8.O.4'-neolignan	
	Virolongin B Ocobullenone	
<i>O. duckei</i>	Yangambin Epiyangambin Episesartemin	BARBOSA-FILHO et al., 1999
	Yangambin Epiyangambin 4'-O-demethylepiyangambin Sesartemin episesartemin 4''-O-demethylepimagnolin	
<i>O. foetens</i>	2-(2',5'-dimetoxifenil 1) - 3,4-dimetil1 - 5 - (3'', 4'', 5' ltrimetoxifenil1)-tetrahydrofurano 2-(2',5'- dimetoxifenil) - 3,4-dimetil- 5-(3'', 4''- dimetoxifenil)-tetrahydrofurano 3',4'- ácido- dimetoxibenzoico-( 3'', 4''- dimetoxifenil 2- metil-3-oxobutil éster	LOPÉZ; VALERA, 1995
<i>O. catharinensis</i>	Ferrearin E Ferrearin G Armenin B 5'-Methoxyporosin (7S,8S,1'R,3'R)-3,4,5,3',5'-Pentamethoxy-4'-oxo- $\Delta^1,3,5,5',8'-8.1',7.O.6'$ -neolignan rel- (7S,8S,1'R,2'S)-2'-Hydroxy-3,4-dimethoxy-3'-oxo- $\Delta^1,3,5,4',8'-8.1',7.O.2'$ -neolignan rel- (7R,8S,1'R,2'S)-2'-Hydroxy-3,4,5'-trimethoxy-3'-oxo- $\Delta^1,3,5,4',8'-8.1',7.O.2'$ -neolignan rel- (8S,1'R,5'R)-3,4,3',5'-Tetramethoxy-7,2'-dioxo- $\Delta^1,3,5,3',8'-8.1'$ -neolignan rel- (7R,8S,1'R,2'S)-2'- Hydroxy-3,4-methylenedioxy-5,3',5'-trimethoxy- $\Delta^1,3,5,3',8'-8.1',7.O.2'$ -neolignan rel- (7S,8R,1'R,3'R)-4'-Hydroxy-3,4-methylenedioxy- 3',5'-dimethoxy-2',4'-dioxo- $\Delta^1,3,5,5',8'-8.1',7.3'$ - neolignan (7S,8R,1'R,3'R)-4'-Hydroxy-3,4-methylenedioxy-3',5',5'- trimethoxy-2',4'-dioxo- $\Delta^1,3,5,5',8'-8.1',7.3'$ -neolignan rel- (7S,8R,1'R,3'R)-4'-Hydroxy-3,4-methylenedioxy- 3',5'-dimethoxy-2',4'-dioxo- $\Delta^1,3,5,5',8'-8.1',7.3'$ - neolignan dimer	FUNASAKI et al., 2009

FONTE: A autora (2018).

### 2.4.3 Óleos essenciais

Os óleos essenciais, também denominados de óleos voláteis, constituem-se de uma mistura complexa de substâncias voláteis de viscosidade semelhante à dos óleos, insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos. São extraídos de espécies vegetais por meio de destilação por vapor de água. De acordo com sua origem biossintética os óleos essenciais podem ser divididos em duas grandes classes: derivados de terpenoides (unidades de isopreno), formados pela via ácido mevalônico e os fenilpropanoides (aromáticos) formados na via do ácido chiquímico (SIMÕES; SPITZER, 2004).

O interesse no estudo de óleos essenciais está relacionado à sua importância econômica. Devido às suas ações terapêuticas, flavorizantes e aromatizantes eles podem ser utilizados na indústria para a produção de perfumes, cosméticos, produtos alimentares, farmacêuticos e de higiene (SILVA et al., 2003).

Entre as aplicações industriais de óleos essenciais destaca-se a antimicrobiana, fator que torna seu uso viável tanto na indústria farmacêutica quanto na alimentícia, como aditivos nos alimentos e na ração animal (WALACE, 2004). Essa ação representa uma extensão do próprio papel que exercem nas plantas, defendendo-as das bactérias e fungos fitopatogênicos (SIANI et al., 2000). Também estão relacionadas aos óleos essenciais as atividades inseticidas (SAMARASEKERA; KALHARI; WEERASINGHE, 2006), anti-inflamatória e analgésica (SILVA et al., 2003), antioxidante (SACCHETTI, 2005), entre outras.

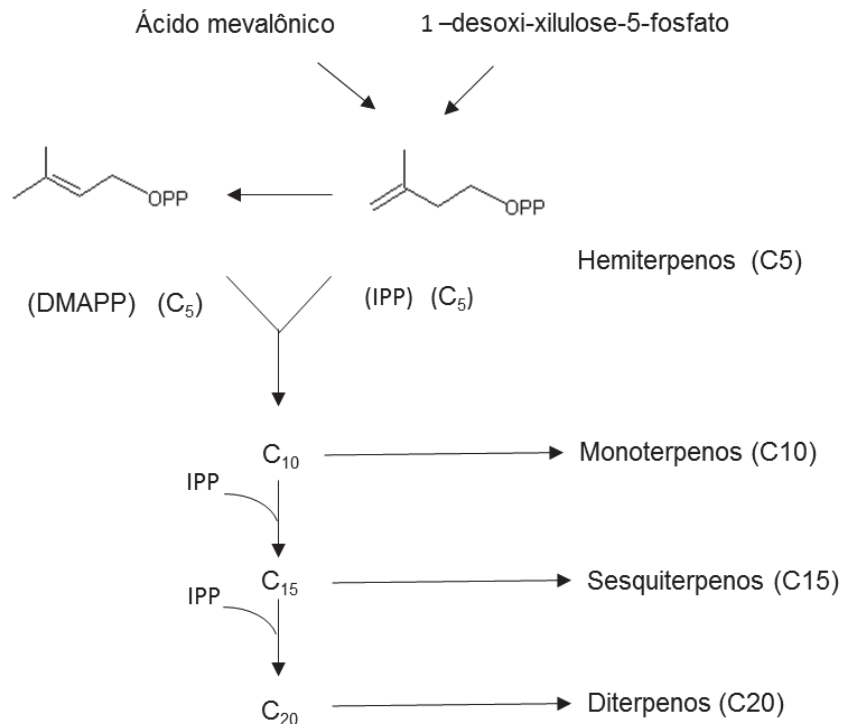
A família Lauraceae tem muitas espécies aromáticas cujos óleos essenciais têm sido usados em diversas aplicações industriais, como é o caso do óleo de pau-rosa, obtido a partir de *Aniba rosaeodora*, que tem o álcool terpênico linalol como constituinte majoritário, amplamente utilizado em fragrâncias de perfumes. Da mesma forma a cânfora, extraída de *Cinnamomum camphora*, e o safrol, extraído de *Ocotea pretiosa* e *Sassafras albidum*, são amplamente utilizados na indústria de cosméticos (RIZZINI; MORS, 1995; SHARMEEN et al., 2021).

Os terpenoides constituem uma grande variedade de moléculas, sendo esse termo empregado para designar todas as substâncias cuja origem biossintética deriva de unidades do isopreno (SIMÕES; SPITZER, 2004). São classificados conforme o número de unidades de isopreno em sua estrutura em: isoprenos ou hemiterpenos (5C), monoterpenos (10C), sesquiterpenos (15C), diterpenos (20C),

sesterpenos (25C), triterpenos (30C), tetraterpenos (35C) e polisoprenoides quando possuem mais de 35 carbonos (BAKKALI et al., 2008).

O grupo dos terpenoides é derivado do 3-isopentenil pirofosfato (IPP), conhecido como isopreno, que pode ser originado por duas rotas biossintéticas distintas: via do ácido mevalônico e rota da desoxi-xilulose fosfato, ambas oriundas da glicose (DEWICK, 2002). A polimerização dessa unidade vai originar moléculas de cadeias carbonadas múltiplas de cinco em cinco átomos de carbono por meio da união cabeça-cauda. A molécula do 3-isopentenil pirofosfato (IPP) e seu isômero 3,3'-dimetilalil pirofosfato (DMAPP) formam trans-geranilpirofosfato, a partir do qual se formam os demais terpenos. Novas ligações cabeça-cauda entre trans-geranilpirofosfato e isopentenilpirofosfato resultarão em sesquiterpenos (C15), e diterpenos (C20) (FIGURA 4). Já a ligação cabeça-cauda entre duas moléculas de farnesilpirofosfato (C15) dará origem ao esqualeno. As diferentes formas de ciclização do esqualeno e rearranjos de metilas originam os diferentes esqueletos triterpênicos e esteroides (DEWICK, 2002; SIMÕES; SPITZER, 2004; DUDAREVA; PICHERSKY; GERSHENZON, 2004).

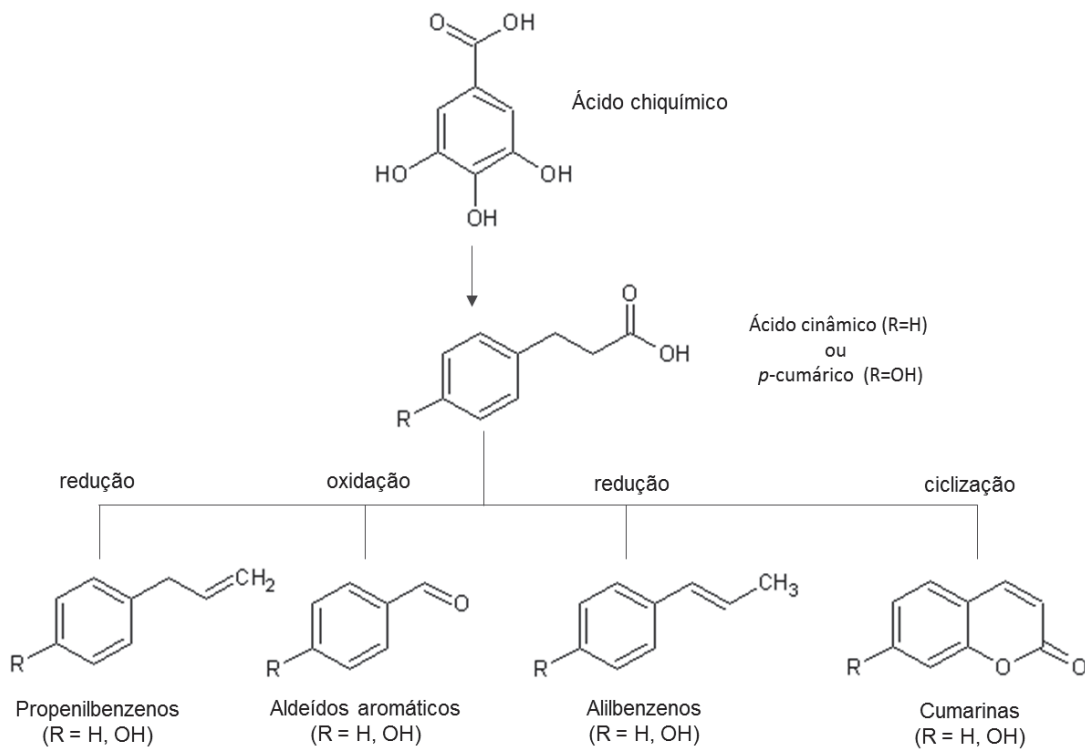
FIGURA 4 - FORMAÇÃO DE TERPENOS POR CONDENSAÇÃO DO IPP COM DMAPP



FONTE: Adaptado de DEWICK, 2002.

Os fenilpropanoides se formam pela via do ácido chiquímico que reage com o ácido fosfoenolpirúvico, produzindo o ácido prefênico. A descarboxilação deste, seguida de aromatização e aminação redutiva produz a fenilalanina, que pela ação da enzima fenilalanina amoliase (PAL) perde uma molécula de amônia originando unidades básicas dos ácidos cinâmico e *p*-cumárico. Estes últimos por redução enzimática produzem propenilbenzenos ou alilbenzenos; por meio de oxidação com degradação de cadeias laterais, aldeídos aromáticos; e por meio das ciclizações enzimáticas produzem cumarinas (SIMÕES; SPITZER, 2004) conforme a (FIGURA 5).

FIGURA 5 - FORMAÇÃO DE COMPOSTOS FENILPROPANOIDES



FONTE: Adaptado de SIMÕES; SPITZER, 2004

Estudos demonstram que os óleos essenciais do gênero *Ocotea* possuem atividades biológicas diversas entre elas atividade larvicida, antimalárica (MENUT et al, 2002), antitrombótica, anticoagulante, vasodilatadora (BALLABENI et al, 2007), antioxidante, antibacteriana e antifúngica (BRUNI et al, 2004), antitripanossômica (SETZER et al, 2006) e efeitos hipotensores e bradicárdicos (BARBOSA FILHO et al., 2008).

Na (TABELA 4) estão descritas algumas espécies de *Ocotea* e seus componentes majoritários identificados no óleo essencial.

TABELA 4 - COMPOSTOS MAJORITÁRIOS PRESENTES EM ÓLEO ESSENCIAL DE *Ocotea*

(continua)

Espécies	Componentes majoritários	Referências
<i>O. caniculata</i> (folhas)	$\beta$ -selineno (20,3%) $\beta$ - cariofileno (18,9%) 7- <i>epi</i> - $\alpha$ -selineno (14,3%) Biciclogermacreno (10,4%)	SILVA et al., 2017a
<i>O. caniculata</i> (galho)	Selin-11-en-4- $\alpha$ -ol (20,6%) $\beta$ -selineno (12,1%) 7- <i>epi</i> - $\alpha$ -selineno (9%) $\beta$ - cariofileno (7,1%) Biciclogermacreno (29,6%)	SILVA et al., 2017a
<i>O. caudata</i> (folhas)	Germacreno D(19,9%) $\alpha$ -pineno (9,8%) $\beta$ -pineno (9,7%) $\beta$ -cariofileno (9,6%)	SILVA et al., 2017a
<i>O. caudata</i> (galho)	$\delta$ -Cadineno (13,8%) Germacreno D(8,9%) $\alpha$ -muurulol (7,8%)	SILVA et al., 2017a
<i>O. comoriensis</i> (casca)	Canfeno (18,1%) Bornilacetato (13,8%) $\alpha$ -pineno (13,7%)	MENUT et al., 2002
<i>O. cujumary</i> (folhas)	$\beta$ - cariofileno (22,2%) óxido de cariofileno (12,4%) 2-tridecanono (7,3%) $\delta$ -Cadineno (6,6%)	SILVA et al., 2017a
<i>O. cujumary</i> (galho)	2-tridecanono (30%) Limoneno (20,5%) $\beta$ - cariofileno (8,1%)	SILVA et al., 2017a
<i>O. diospyrifolia</i> (folhas)	$\delta$ -elemeno (25,93%) $\beta$ -atlantol (15,35%) espatulenol (11,4%) dl-limoneno (30,12%)	FABRI et al., 2019
<i>O. duckey</i> (fruto)	$\alpha$ -pineno (12,25%) $\beta$ -pineno (9,89%)	BARBOSA FILHO et al., 2008
<i>O. duckey</i> (folha)	<i>trans</i> - cariofileno (60,54%)	BARBOSA FILHO et al., 2008
<i>O. duckey</i> (casca)	$\beta$ -Eudesmol (27,51%)	BARBOSA-FILHO et al., 1999

TABELA 4 - COMPOSTOS MAJORITÁRIOS PRESENTES EM ÓLEO ESSENCIAL DE *Ocotea*

(conclusão)

<b>Espécies</b>	<b>Componentes majoritários</b>	<b>Referências</b>
<i>O. duckey</i> (raízes)	Elemol (24,31%) $\beta$ -elemeno (16,69%) $\beta$ -Eudesmol (13,44%)	BARBOSA-FILHO et al., 1999
<i>O. gomezii</i> (folhas)	Pentan-2-ol (12,5%) epi- $\alpha$ -cadinol (9,8%) $\delta$ -cadineno (7,7%) 1,8-cineol (6,0%)	CHAVERRI et al., 2011
<i>O. gomezii</i> (casca)	$\delta$ -Cadineno (14,5%) 1,10-diepi-cubenol (7,7%) $\alpha$ -muuroleno (6,9%)	CHAVERRI et al., 2011
<i>O. gomezii</i> (madeira)	epi- $\alpha$ -Muurolol (15,0%) epi- $\alpha$ -cadinol (10,0%) $\delta$ -cadineno (7,7%)	CHAVERRI et al., 2011
<i>O. morae</i> (folhas)	$\beta$ -pineno (17,5%) $\alpha$ -pineno (10,4%) biciclogermacreno (8,8%) germacreno D (7,5%) 1,8-cineol (7,3%) $\beta$ - cariofileno (7,1%)	CHAVERRI et al., 2011
<i>O. morae</i> (madeira)	1,8-cineol (12,8%) $\beta$ - cariofileno (6,1%)	CHAVERRI et al., 2011
<i>O. morae</i> (madeira)	E)-Nerolidol (11,4%) 1,8-cineol (7,1%) epi- $\alpha$ -muurolol (6,3%) $\delta$ -cadineno (6,2%) $\alpha$ -cadinol (6,0%)	CHAVERRI et al., 2011
<i>O. nutans</i> (folhas)	biciclogermacreno(11,41%) germacreno-D (4,89%) bisabolol11-ol(3,73%) espatulenol (3,71%)	BETIM et al., 2019
<i>O. paranaensis</i> (galhos)	Z-nerolidol (19,16%) germacreno D (12,92%) a-bulneseno (8,47%)	GRIBNER et al., 2020a
<i>O. quixos</i> (cálices dos frutos)	trans-cinnamaldeído (27,9%) metilcinamato (21,7%) 1, 8-cineole (8,0%)	BRUNI et al., 2004

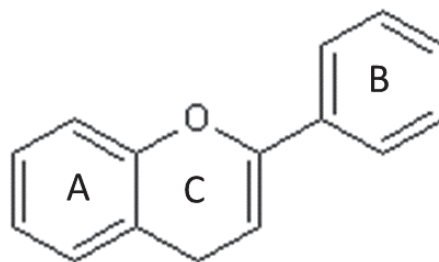
FONTE: A autora (2020).

#### 2.4.4 Flavonoides

Os flavonoides são compostos polifenólicos amplamente distribuídos no reino vegetal. Estão presentes em todas as partes das plantas, desde raízes até as flores e frutos. Ocorrem de forma livre (aglicona) ou ligados a açúcares (glicosídeos) (YAO et al., 2004).

Os compostos fenólicos apresentam como característica comum a presença do anel aromático ligado a um componente hidroxila, podem ser classificados segundo suas cadeias carbônicas, magnitude de suas massas moleculares, distribuição na natureza, entre outras formas, das quais os flavonoides são a mais numerosa (HERNÁNDEZ; PRIETO GONZÁLES, 1999; ANGELO; JORGE, 2007; DAI; MUMPER, 2010). Estruturalmente os flavonoides caracterizam-se por um núcleo flavânico e um esqueleto carbonado de configuração C6-C3-C6. Sua estrutura básica consiste em dois anéis de benzeno (A e B) sendo o anel aromático A derivado do ciclo acetato-polimalato, e o anel B derivado da fenilalanina, ambos ligados por um anel pirano que contém oxigênio (anel C). A (FIGURA 6) traz a representação do esqueleto básico de flavonoide (MARTENS; MITHÖFER, 2005; BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006).

FIGURA 6 - ESQUELETO BÁSICO DE FLAVONOIDE



FONTE: BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006

Grande número de estudos atestam as ações que flavonoides exibem sobre sistemas biológicos demonstrando efeitos antimicrobiano (CUSHNIE; LAMB, 2005), antiviral (CARVALHO et al, 2013), antitumoral (BRITO et al. 2015; CHEN et al., 2018 a), antioxidante (MISHRA; KUMAR; PANDEY, 2013; XU et al., 2013), hepatoprotetores (ZHU et al., 2012), anti-hipertensivo (LARSON; SYMONS; JALILI,



2012), cardioprotetores (PATEL et al., 2018), neuroprotetores (WANG et al., 2016) entre outros.

Entre as classes de metabólitos secundários presentes em *Ocotea* os flavonoides são os que apresentam menor número de registros. Na (TABELA 5) estão descritos alguns dos flavonoides encontrados nesse gênero.

TABELA 5 - FLAVONOIDES PRESENTES EM DIFERENTES ESPÉCIES DE *Ocotea*

(continua)

<b>Espécies</b>	<b>Flavonoides</b>	<b>Referências</b>
<i>O. acutifolia</i>	kaempferol	GARCEZ et al., 2011
<i>O. corymbosa</i>	Quercetina-3-O-β-D-glicose Quercetina-3-O-β-D-galactose Quercetina-3-O-β-D-xilose	BATISTA et al., 2010
<i>O. elegans</i>	rel- (2R,3R) - diidroquercetina-3-O-α-ramnosídeo (astilbina)	BATISTA et al., 2010
<i>O. minarum</i>	Taxifolina Quercetina-7-O-β-D-glucopiranosídeo Eriodictyol-3'-O-β-D-glucopiranosídeo Naringenina-7-O-β-D-glucopiranosídeo	GARCEZ et al., 2005
<i>O. notata</i>	Afzelina Isoquercitrina	COSTA et al., 2015
<i>O. notata</i>	Proantocianidina Isoquercitrina Quercitrina Afzelina Catequina Epicatequina kaempferol quercetina-3-O-β-D-xilose quercetina O-β-D-glicopiranosídeo	GARRET et al., 2012
<i>O. notata</i>	Miquelianina Isoquercitrina Quercitrina Kaempferol- 3-O-pentose Afzelina Isoramnetina-glicuronídeo	PEREIRA et al., 2019
<i>O. odorifera</i>	Apigenina 6,8-di- C-glucosídeo (vicenina-2) Apigenina 7-O-rutinosídeo Apigenina 6-C-pentosídeo-8-C-hexosídeo Apigenina 6-C-hexosídeo-8-C-pentosídeo. Epicatequina	GONTIJO et al., 2017

TABELA 5 – FLAVONOIDES PRESENTES EM DIFERENTES ESPÉCIES DE *Ocotea*

(conclusão)		
Espécies	Flavonoides	Referências
<i>O. porosa</i>	(-) - epicatequina 4β e 4α da epicatequina (7,8-bc) + hidroxifenila) di-hidro-2 (3H) -piranona.	DAVID; YOSHIDA; GOTTLIEB, 1994

FONTE: A autora (2019).

## 2.5 *Ocotea bicolor* Vattimo-Gil

*Ocotea bicolor* Vattimo-Gil é uma espécie nativa do Brasil cujo níveis hierárquicos de organização taxonômica estão descritos no (QUADRO 1).

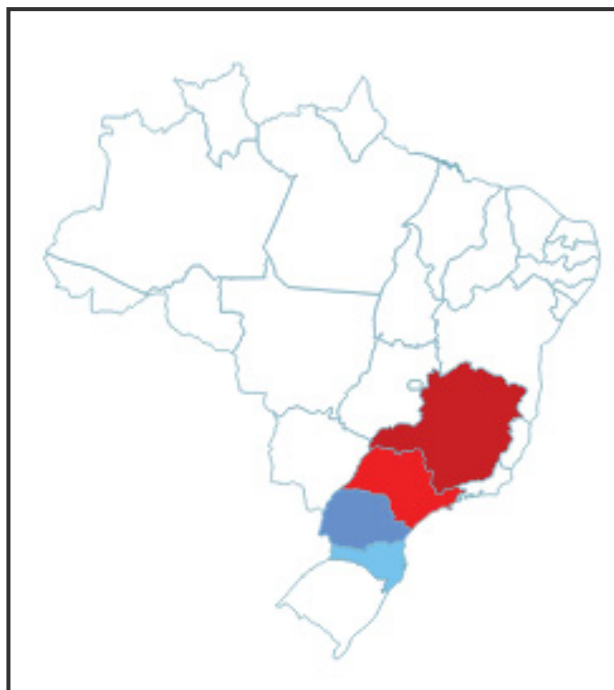
QUADRO 1 - ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO DE *Ocotea bicolor*

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

FONTE: TROPICOS (2018).

### 2.5.1 Ocorrência e sinonímia

Ocorre na região Sudeste, nos estados de Minas Gerais e São Paulo e na região Sul, nos estados do Paraná e Santa Catarina, sendo a Floresta Atlântica seu domínio fitogeográfico conforme apresentado na (FIGURA 7) (QUINET et al., 2015). De acordo com Brotto e colaboradores (2013) a espécie é amplamente distribuída no estado do Paraná com exceção do terceiro planalto, sendo frequente na Floresta Ombrófila Densa e Floresta Ombrófila Mista e rara na Floresta Estacional Semidecidual.

FIGURA 7 - OCORRÊNCIA DE *Ocotea bicolor* NO BRASIL

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

Tem como sinonímia *O. gurgelii* (VATTIMO-GIL, 1956), *O. paulensis* (VATTIMO-GIL, 1962) e *O. camanducaiensis* (COE-TEIXEIRA, 1980). Popularmente esta espécie é conhecida como canela-merda ou canela-fedida, justificado pelo odor desagradável que a madeira apresenta (BROTTO, CERVI; SANTOS, 2013).

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

#### 2.5.2 Dados fitoquímicos de *Ocotea bicolor* Vattimo-Gil

Por meio do estudo de Damasceno (2017) com *O. bicolor* foi possível a detecção em pesquisa preliminar por cromatografia em camada delgada (CCD) das seguintes classes de metabólitos secundários na espécie: alcaloides, flavonoides,

esteroides, terpenos e cumarinas. Na fração remanescente do sólido (FRS) foi identificada o flavonoide astilbina por técnicas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).

O óleo essencial de *O. bicolor* revelou a predominância de sesquiterpenos (48,21%) e os constituintes majoritários:  $\delta$ -cadineno (7,39%),  $\beta$ -sesquifelandreno (6,67%),  $\beta$ -elemeno (5,41%) e o álcool  $\alpha$ -cadinol (5,23%) (DAMASCENO, 2017).

### 2.5.3 Capacidade antioxidante e atividades biológicas de *Ocotea bicolor*

A fração remanescente do sólido (FRS) e fração hexano do sólido (FHS) de *O. bicolor* foram as que apresentaram os melhores resultados de capacidade antioxidante respectivamente para os ensaios de Redução do Radical DPPH e formação do complexo fosfomolibdênio (DAMASCENO, 2017).

Com relação à bioatividade em *Artemia salina* o óleo essencial de *O. bicolor* foi classificado como altamente tóxico aos organismos em questão com  $CL_{50}$  de 40,10  $\mu\text{g/mL}$ . Na atividade antibacteriana a espécie *O. bicolor* apresentou-se com fraca atividade ou inativa sobre os microrganismos *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis* e *Salmonella typhimurium* (DAMASCENO, 2017).

## 2.6 ANTIOXIDANTES

### 2.6.1 Aspectos gerais

O conceito de antioxidante proposto por Halliwell e Gutteridge (1995) o descreve como substâncias que presentes em baixas concentrações, quando comparadas ao substrato oxidável (proteínas, lipídios, DNA e carboidratos), retardam de forma significativa ou inibem a oxidação desse substrato. Posteriormente essa definição foi redefinida para "qualquer substância que atrasa, previne ou remove o dano oxidativo de uma molécula alvo" (HALLIWELL, 2007).

Em condições fisiológicas normais, como resultado do metabolismo oxidativo, o organismo humano produz constantemente radicais livres. Fatores endógenos como produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular,

sinalização intercelular, síntese de substâncias biológicas importantes e exposição a fatores exógenos, tais como: ozônio, radiação gama e ultravioleta, dieta, uso de medicamentos e tabagismo são responsáveis por essa formação (HALLIWELL, 1996; BARROS; CAMPOS; MOREIRA, 2010). Nos sistemas biológicos, os radicais livres são frequentemente derivados de moléculas de oxigênio, nitrogênio e enxofre e fazem parte do grupo de moléculas conhecidas como espécies reativas de oxigênio (ROS), espécies reativas de nitrogênio (RNS) e espécies reativas de enxofre (RSS) (QUADRO 2) (LÜ ET AL., 2010).

Fisiologicamente há um equilíbrio entre a produção de radicais livres e sua neutralização pelos sistemas antioxidantes. No entanto, quando ocorre um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes em favor dos oxidantes, surge a condição de estresse oxidativo, acarretando potenciais danos celulares e ao organismo como um todo (CAROCHO; FERREIRA, 2013).

QUADRO 2 - ESPÉCIES REATIVAS EM SISTEMAS BIOLÓGICOS

Espécies reativas de oxigênio
$O_2^{\cdot-}$ (radical superóxido) $RO^{\cdot}$ (radical alcóxila) $ROO^{\cdot}$ (radical peróxila) $OH^{\cdot}$ (radical hidroxila) $ROOH$ (peróxidos derivados de lipídeos) $HOCl$ (ácido hipocloroso) $O_2$ singleto $H_2O_2$ (peróxido de hidrogênio)
Espécies reativas de nitrogênio
$NO^{\cdot}$ (óxido nítrico) $N_2O_3$ (óxido nitroso) $HNO_2$ (ácido nitroso) $NO_2^-$ (nitritos) $NO_3^-$ (nitratos) $ONOO^-$ (peroxinitritos)
Espécies reativas de enxofre
$RS^{\cdot}$ (Radical tiíla)

FONTE: A autora (2018).

Os principais meios de defesa antioxidante no organismo podem ser divididos em dois grupos: enzimáticos e não-enzimáticos. Os sistemas enzimáticos envolvem as enzimas do ciclo redox da glutathione, particularmente a glutathione redutase e a glutathione peroxidase. Outros sistemas enzimáticos incluem a superóxido dismutase, que catalisa conversão do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio, bem como a catalase, que converte o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (JÚNIOR et al., 2001). Entre as defesas antioxidantes não enzimáticas destacam-se compostos como a glutathione, o  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), o ácido ascórbico (vitamina C), o ácido lipóico, os carotenoides, os flavonoides, entre outros (FERREIRA; ABREU, 2007; BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

A defesa inata do corpo humano pode não ser suficiente para neutralizar os danos oxidativos, sendo bem estabelecido que antioxidantes obtidos da dieta são indispensáveis para a defesa apropriada contra oxidação e, portanto, têm importante papel na manutenção da saúde. Compostos antioxidantes exógenos, sejam de origem natural ou sintética, podem promover maior síntese de defesas antioxidantes endógenas ou agir diretamente como antioxidantes (LUXIMON-RAMMA et al, 2002; REYNERTSON et al., 2008).

Estudos clínicos e epidemiológicos têm atestado que os antioxidantes são eficazes na prevenção de doenças crônicas associadas ao estresse oxidativo quando administrados a grupos que apresentem concentrações plasmáticas inadequadas destas substâncias. Vale lembrar que os antioxidantes não atuam sozinhos, agem em sinergia, sendo reciclados por outros antioxidantes. Daí a importância da presença de várias classes de antioxidantes no plasma, na bicamada lipídica e no meio intracelular (CERQUEIRA; MEDEIROS; AUGUSTO, 2007).

No entanto existem controvérsias sobre a eficácia de antioxidantes exógenos contra danos celulares, sobretudo quando administrados em doses elevadas por meio de suplementos (HALLIWELL, 2012). Alguns autores defendem a teoria de que o consumo excessivo de antioxidantes poderá, ao longo da evolução, remover a pressão que modela sistemas endógenos, levando a uma sub-regulação ou não expressão de genes envolvidos com a defesa antioxidante endógena. Outros atestam que um excesso de antioxidantes redutores pode acarretar inibição da proliferação celular, por prevenir o estado transitório de oxidação e diminuir a adaptação ao estresse oxidativo (AUGUSTO, 2006; FENECH, 2002).

## 2.6.2 Métodos de avaliação da capacidade antioxidante

A viabilidade de um extrato ou composto exercer efeitos antioxidantes pode ser avaliada por testes *in vitro* que investigam como o antioxidante pode ou não reagir com radicais livres (LUXIMON-RAMMA et al, 2002). No entanto, devido a complexidade da composição dos extratos de plantas e aos diversos tipos de radicais e aos diferentes sítios de ação, a atividade e mecanismo dos compostos antioxidantes ali presentes, dependem em grande parte de sua composição e das condições do sistema de teste. Deste modo, a capacidade antioxidante não pode ser totalmente descrita com um único método, justificando assim o emprego de duas ou mais técnicas para essa avaliação (WONG; LEONG; KOH, 2006; SUCUPIRA et al., 2012).

### 2.6.2.1 Método FRAP (poder antioxidante de redução do íon Fe<sup>3+</sup>)

O ensaio FRAP (poder antioxidante de redução do íon Fe<sup>3+</sup>) é caracterizado pela redução do complexo férrico-tripiridiltriazina [Fe (III)-TPTZ], ao complexo ferroso [Fe(II)-TPTZ], na presença de um antioxidante e em meio ácido. O aumento da absorvância é proporcional ao conteúdo antioxidante, provocando uma mudança da coloração verde para a coloração azul intensa e pode ser monitorado, a 593 nm, em espectrofotômetro (BENZIE; STRAIN, 1996; STRATIL; KLEJDUS; KUBÁŇ, 2006).

Quantitativamente o poder redutor é determinado comparando-se a absorvância da solução, com a absorvância de uma solução padrão de íons ferrosos ou com soluções padrão de antioxidantes, como o Trolox (ALAM; BRISTI; RAFIQUZZAMAN, 2013).

Apesar de ser um método barato, reagentes de fácil preparo e o procedimento relativamente simples e rápido (LI et al., 2008), a medida da capacidade de redução do ferro não reflete necessariamente a capacidade antioxidante. Isso ocorre porque nem toda substância redutora do ferro é antioxidante, assim como nem todo antioxidante é capaz de reduzir o ferro, como por exemplo a glutatona (PRIOR et al., 2003).

### 2.6.2.2 Método ABTS<sup>•+</sup> [2,2-azono-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)]

Este método pode ser aplicado no estudo de antioxidantes hidrossolúveis e lipossolúveis entre os quais se destacam os compostos fenólicos, carotenoides e antioxidantes plasmáticos. Este teste avalia a capacidade antioxidante total de substâncias, compostos puros e extratos (RE et al., 1999; PRIOR; WU; SCHAICH, 2005).

Essencialmente, esta metodologia baseia-se na capacidade dos compostos antioxidantes para captar o ABTS<sup>•+</sup> [2,2-azono-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)]. Esse radical monocatiônico pode ser gerado por reação enzimática ou química, neste último caso é utilizado o persulfato de potássio (K<sub>2</sub>SO<sub>5</sub>) para promover a oxidação. É um composto cromóforo quimicamente estável, apresenta alta solubilidade em água e um máximo de absorvância a 414 nm, e de medidas secundárias de absorvância a 645, 734 e 815 nm. O ABTS<sup>•+</sup> de coloração azul esverdeado é reduzido a ABTS na presença de um antioxidante o que provoca a descoloração da mistura, cujo decréscimo é monitorado espectrofotometricamente, sendo que as medidas de 415 e 734 nm são comumente mais adotadas para o acompanhamento espectrofotométrico da reação. Quanto menor for a absorvância, maior é a quantidade de ABTS<sup>•+</sup> reduzidos pelos compostos antioxidantes (MILLER et al, 1993; RE et al., 1999; PRIOR; WU; SCHAICH, 2005).

Em termos quantitativos, o percentual de inibição de ABTS<sup>•+</sup> é determinado em função da concentração e do tempo. Quando a medida é relativa à reatividade do trolox, como padrão, sob as mesmas condições, o teste é denominado TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) expresso como unidades equivalentes de trolox (RE et al., 1999).

### 2.6.2.3 Método ORAC (Capacidade de Absorção de Radicais de Oxigênio)

Este método é amplamente aplicado para avaliar a atividade antioxidante de diversas amostras como o plasma humano, proteínas, DNA, substâncias isoladas, extratos de plantas e alimentos (DÁVALOS; GÓMEZ-CORDOVÉS; BARTOLOMÉ, 2004).

Originalmente desenvolvido por Cao, Alessio e Cutler (1993) este método, relativamente simples e sensível, consiste em medir a diminuição da fluorescência



de uma proteína como resultado da perda de sua conformação quando sofre dano oxidativo causado por uma fonte de radicais peroxil (ROO). Estes radicais são gerados por uma fonte radicalar, AAPH (2,2'-azobis(2-amidinopropano) dihidroclorado) (ALARCÓN et al., 2008).

A proteína usada no método original era a  $\beta$ -ficoeritrina, mas por apresentar várias desvantagens, tais como: inconsistência entre lotes, fotossensibilidade e interação com compostos fenólicos devido à ligação proteica não específica, foi substituída. Ou, Hampsch-Woodill e Prior (2001) propuseram o uso de fluoresceína como proteína alvo. Em comparação com a  $\beta$ -ficoeritrina a fluoresceína não interage com antioxidantes, mostra uma excelente fotoestabilidade, e reduz o custo dos experimentos.

Por meio desse método é possível medir a capacidade antioxidante dos componentes hidrofílicos e lipofílicos de uma amostra, usando ciclodextrina metilada, como potencializador da solubilidade em água (OU; HAMPSCH-WOODILL; PRIOR, 2001).

Os valores gerados por esse teste são mais comumente relatados como equivalentes de Trolox. Uma curva padrão utilizando trolox como padrão é gerada, e os equivalentes da amostra são calculados usando regressão linear entre a concentração de Trolox e a área sob a curva de decaimento da fluoresceína (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005).

## 2.7 ATIVIDADE ALELOPÁTICA

Alelopatia, definida por Molisch (1937), é a interação química entre plantas, incluindo efeitos estimulatórias ou inibitórios de uma planta sobre outras presentes no ecossistema. Molisch (1937) foi o primeiro a utilizar este termo sob uma perspectiva fisiológica, para descrever o efeito do etileno na maturação dos frutos (INDERJIT; STEPHEN, 2005).

A alelopatia desempenha um papel importante nos ecossistemas naturais e agro-ecossistemas. As substâncias com efeito alelopático são produzidas em especial pelo metabolismo secundário de espécies vegetais. Este fenômeno natural tem ganhado atenção proeminente no intuito de descobrir novos agroquímicos baseados em produtos naturais capazes de controlar a presença de plantas daninhas e, posteriormente, reduzir e/ou substituir o uso de herbicidas, inseticidas e

nematicidas (defensivos agrícolas) por herbicidas naturais (*eco-friendly*) (CHON; KIM; LEE, 2005).

Os aleloquímicos estão presentes em diversas partes da planta. Podem ser encontrados em folhas, caules, raízes, flores, frutos, sementes, pólen, rizomas e caule. Eles também podem estar presentes no solo circundante, uma vez que a dispersão desses aleloquímicos para a rizosfera costuma ocorrer por meio da lixiviação foliar, volatilização, exsudação de raiz, decomposição de resíduos vegetais e incorporação dos compostos no solo (WEIR; PARK; VIVANCO, 2004; BHAMINI; KUMAR., 2019).

Quando liberadas no ambiente estas substâncias podem interferir na germinação, crescimento e desenvolvimento de plantas vizinhas por ações em processos fisiológicos (CHON; KIM; LEE, 2005). O modo de ação de um aleloquímico pode ser agrupado em ação direta e indireta. A ação indireta representa os efeitos por meio da alternância das propriedades do solo, estado nutricional e alteração na população ou atividade de microrganismos e nematoides. A ação direta do composto alelopático envolve a bioquímica e os efeitos fisiológicos em vários tipos de processos importantes no crescimento e metabolismo das plantas (BHAMINI; KUMAR., 2019).

Nos bioensaios para avaliação da ação dos aleloquímicos é freqüente o uso de sementes sensíveis, com destaque para a *Lactuca sativa* (alface) e *Allium cepa* (cebola) (GATTI et al., 2004; ALVES et al., 2004; KNOLL et al., 2006; MARASCHIN-SILVA; AQUILA, 2006). Entre as vantagens do uso de *Lactuca sativa* em estudos alelopáticos está a sensibilidade das sementes da espécie, pois mesmo em baixas concentrações de aleloquímicos o processo de germinação pode ser comprometido. Aliado a isso, a germinação é rápida, em aproximadamente 24 h, o crescimento é linear, e há baixa sensibilidade às diferenças de pH em ampla faixa de variação e aos potenciais osmóticos do meio (COELHO et al., 2011).

A inibição ou o estímulo da germinação ou o crescimento de plântulas são evidências da atividade alelopática. A germinação é menos sensível aos aleloquímicos quando comparada ao crescimento da plântula, haja visto que substâncias alelopáticas podem induzir o aparecimento de plântulas anormais, sendo a necrose da radícula um dos sintomas mais comuns. Dessa forma, um instrumento valioso nesse ensaio é a avaliação da normalidade das plântulas (FERREIRA; AQUILA, 2000).

## 2.8 ATIVIDADE HEMOLÍTICA

A estabilidade mecânica da membrana eritrocitária é um bom indicador dos efeitos produzidos por vários compostos para a triagem da citotoxicidade e bioatividade geral (SHARMA, SHARMA, 2001). Na investigação da ação dos extratos vegetais, o teste de hemólise *in vitro* tem sido empregado como *screening* na avaliação toxicológica de diferentes plantas (PEQUENO; SOTO-BLANCO, 2006; OLIVEIRA et al., 2009).

Ensaio hemolítico *in vitro* por método espectroscópico constituem-se em um método fácil e eficaz para a verificação quantitativa da hemólise. Por intermédio desse método pode-se avaliar o efeito de diferentes concentrações de biomoléculas nos eritrócitos humanos (KUMAR; KARTHIK; RAO, 2011).

O efeito hemolítico dos diferentes agentes tóxicos se deve a vários mecanismos inespecíficos. Geralmente, as saponinas (um grupo de fitoquímicos) presentes nas plantas apresentam atividade hemolítica criando mudanças na membrana eritrocitária (KUMAR; KARTHIK; RAO, 2011). Kaiser e colaboradores (2010), em um estudo onde relacionou estrutura-atividade de saponinas hemolíticas chegaram à conclusão de que a presença de açúcares na posição C-3 é importante para a atividade hemolítica. No entanto o efeito causado pela presença de uma hidroxila em C-16, de CH<sub>2</sub>OH em C-17, de uma acetila em C-22 e de um grupamento acila em C-21 parece acentuar essa atividade.

## 2.9 ATIVAÇÃO DE NEUTRÓFILOS

Os neutrófilos são os primeiros componentes celulares a migrarem para o local de inflamação e se apresentam com um vasto armamento de defesa contra os patógenos (KRUGER et al., 2015).

A ação fagocítica dos neutrófilos ocorre por meio de mecanismos microbicidas, liberação de enzimas proteolíticas dos grânulos citosólicos, das chamadas redes extracelulares de neutrófilos (NETs) e pela produção de espécies reativas de Oxigênio (EROs) (LELIEFELD et al., 2017).

A produção de EROs como o ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), peróxido de Hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e ácido hipocloroso (HClO) é característica do processo denominado

explosão respiratória ou *burst* oxidativo, um dos mecanismos microbicidas e inflamatórios mais conhecido (WINTERBOURN; ANTHONY; MARK, 2016).

A importância desse sistema é evidente na doença granulomatosa crônica (DGC), na qual a produção do  $O_2^-$  é ausente ou reduzida. Portadores dessa doença são mais susceptíveis a infecções, reforçando a importância dos EROs como mecanismo de eliminação de patógenos (TSUJI; KANEKO, 2014).

No ensaio qualitativo de ativação de neutrófilos a redução do NBT (Cloro de tetrazólio-nitroazul) é utilizada como marcador indireto da produção de EROs pelos neutrófilos, a qual pode ser visualizada por meio de precipitados insolúveis de coloração azulada ou enegrecida, conhecidos como depósitos de formazan. Essa avaliação é realizada por meio de microscopia óptica, sendo que, a localização do formazan é muito heterogênea, podendo estar presente na membrana da célula ou no interior dos fagócitos (FONTEQUE et al., 2015).

O PMA (Forbol-12-miristato-13-acetato), um éster de forbol conhecido também como TPA (O-tetradeconoilforbol-13-acetato), é utilizado como controle positivo por estimular neutrófilos. Essa ativação não é realizada pelas vias clássicas de receptores de membrana, pois o PMA atua na bicamada lipídica da célula, como intermediário para a proteína cinase C (PCK) (YOUSEFI et al., 2009).

## 2.10 *Aedes aegypti* L.

### 2.10.1 Aspectos gerais

O *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) é uma espécie de mosquito pertencente à família Culicidae. No Brasil a dengue, uma doença viral, transmitida por esse mosquito configura-se em um problema de saúde pública. Este também é vetor para zika, febre amarela e chikungunya (SOUZA, 2016).

De acordo com Boletim Epidemiológico emitido pela Secretaria de Vigilância em Saúde até a Semana Epidemiológica (SE) 38 do ano de 2020, foram notificados 931.903 casos prováveis (o que representa uma taxa de incidência de 443,5 casos por 100 mil habitantes) de dengue no país. Até a SE11, o número de casos prováveis no ano de 2020 superou o do ano de 2019 no mesmo período (BRASIL, 2020a).

Percebe-se um aumento de quase 19% nos casos de dengue quando comparado o início de 2019 e 2020, passando de 79.131 entre 29 de dezembro e 01 de fevereiro de 2019 para 94.149 no mesmo período de 2020 (LORENS; AZEVEDO; CHIARAVALLOTTI-NETO, 2020).

No entanto, a partir da SE12, observa-se uma diminuição dos casos prováveis em relação ao ano de 2019. Esta redução coincide com o período de enfrentamento da pandemia do coronavírus (COVID -19). Dessa forma, essa mudança nos dados epidemiológicos da dengue a partir da SE12 sustenta a hipótese de um possível atraso ou subnotificação das arboviroses no país, decorrente da pandemia da COVID-19. Aliado a esse fator o contexto da pandemia impõe o receio da população de procurar atendimento em uma unidade de saúde, o que acarreta um maior descréscimo na notificação dos casos (BRASIL, 2020a).

Vale lembrar que a sobreposição da COVID - 19 a outras doenças endêmicas em nosso país, como é o caso das arboviroses ocasionados pelo vetor *A. aegypti*, não pode ser ignorada. No caso da dengue, o desfecho clínico também pode levar a resultados fatais, principalmente em pacientes com doenças crônicas (CARDONA-OSPINA et al., 2021).

A distribuição espacial, facilidade de proliferação do mosquito em ambientes criados pelos humanos, aliado ao aumento da temperatura, variações na pluviosidade e na umidade relativa do ar contribuem para o aumento da incidência desse vetor (VIENNET et al., 2014). Nesse contexto, embora a utilização da vacina contra a dengue tenha sido estudada atualmente (DANS et al., 2018), o controle vetorial ainda é o instrumento mais utilizado no combate a essa doença.

Devido ao distanciamento social imposto pelo cenário da pandemia da COVID-19, novas recomendações aos Agentes de Combate a Endemias (ACE) para o controle de zoonoses foram elaboradas, conforme nota informativa nº 08/2020 do Ministério da Saúde, culminando com a redução das ações de controle do *A. aegypti*. Visitas intradomiciliares e em domicílios onde o responsável tenha mais que 60 anos de idade, realizadas por esses profissionais, foram interrompidas temporariamente (BRASIL, 2020b).

### 2.10.2 Toxicidade

Entre os métodos utilizados no controle de vetores, a utilização de inseticidas é uma ferramenta importante que interrompe a transmissão da doença. As principais classes de inseticidas sintéticos utilizados nesse controle são os organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretroides (BISSET, 2002).

Os organoclorados são inseticidas que em sua composição apresentam carbono, hidrogênio e cloro. A essa classe pertence o diclorodifeniltricloroetano (DDT), provavelmente a substância química mais notória do século XX (BRAGA; VALLE, 2007). O DDT é um composto altamente estável e que persiste no ambiente, resistindo à degradação, é classificado pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) no grupo 2A, ou seja, grupo de substâncias provavelmente cancerígenas para humanos (IARC, 2015). No Brasil, essa substância foi proibida em 1985, sendo que, seu uso foi permitido apenas em campanhas de saúde pública como no combate a vetores de agentes etiológicos até o ano de 1997 quando teve restrição de uso também para este propósito. No ano de 2009, o DDT teve seu banimento definitivo em todo território nacional (TORRES et al., 2009; FERREIRA; OLIVEIRA; PAUMGARTTEN, 2011).

De forma geral os organofosforados são aqueles que contém fósforo em sua composição. A atividade inseticida dessa classe ocorre pela inibição da acetilcolinesterase (AChE), importante enzima do sistema nervoso central. A ação neurotóxica ocorre mediante a inibição irreversível dessa enzima resultando no acúmulo de acetilcolina nas junções nervosas (ou sinapses), o que impede a interrupção da propagação do impulso elétrico. Dessa forma, como o sistema nervoso central continuará sendo estimulado, ocasionará o processo de paralisia que pode culminar com a morte do inseto. O temefós é o único desse grupo com uso generalizado no controle de larvas de mosquitos (BRAGA; VALLE, 2007; BARBOZA et al., 2018).

Os carbamatos são inseticidas derivados do ácido carbâmico e entre os mais utilizados, está o carbaril. Os piretróides sintéticos, são produzidos a partir do piretro, uma substância natural extraída de crisântemos. Apresentam mecanismo de ação similar ao do DDT, ao manter abertos os canais de sódio das membranas dos neurônios, entretanto o efeito estimulante dos piretroides é muito mais pronunciado que o do DDT (BRAGA; VALLE, 2007).

Embora o controle vetorial por substâncias químicas ainda seja bastante utilizado, a resistência do vetor a inseticidas como organoclorados, organofosforados e início de resistência aos piretroides aliado a um amplo espectro de ação e um efeito residual prolongado desses compostos, ocasiona uma série de problemas ambientais e toxicológicos (TAUIL, 2006; MACORIS et al., 2014).

A OMS define resistência como a habilidade de uma linhagem de algum organismo tolerar uma dose de inseticida que é letal para a maioria dos indivíduos em uma população normal da mesma espécie. Quando utilizamos um mesmo produto por diversas gerações no controle de uma determinada espécie, pode ocorrer uma resposta a essa intensa pressão seletiva, ocasionando a sobrevivência dos indivíduos que possuem alelos que conferem resistência. O próprio inseticida não produz uma mudança genética. No entanto, seu uso contínuo pode selecionar indivíduos resistentes (BRAGA; VALLE, 2007).

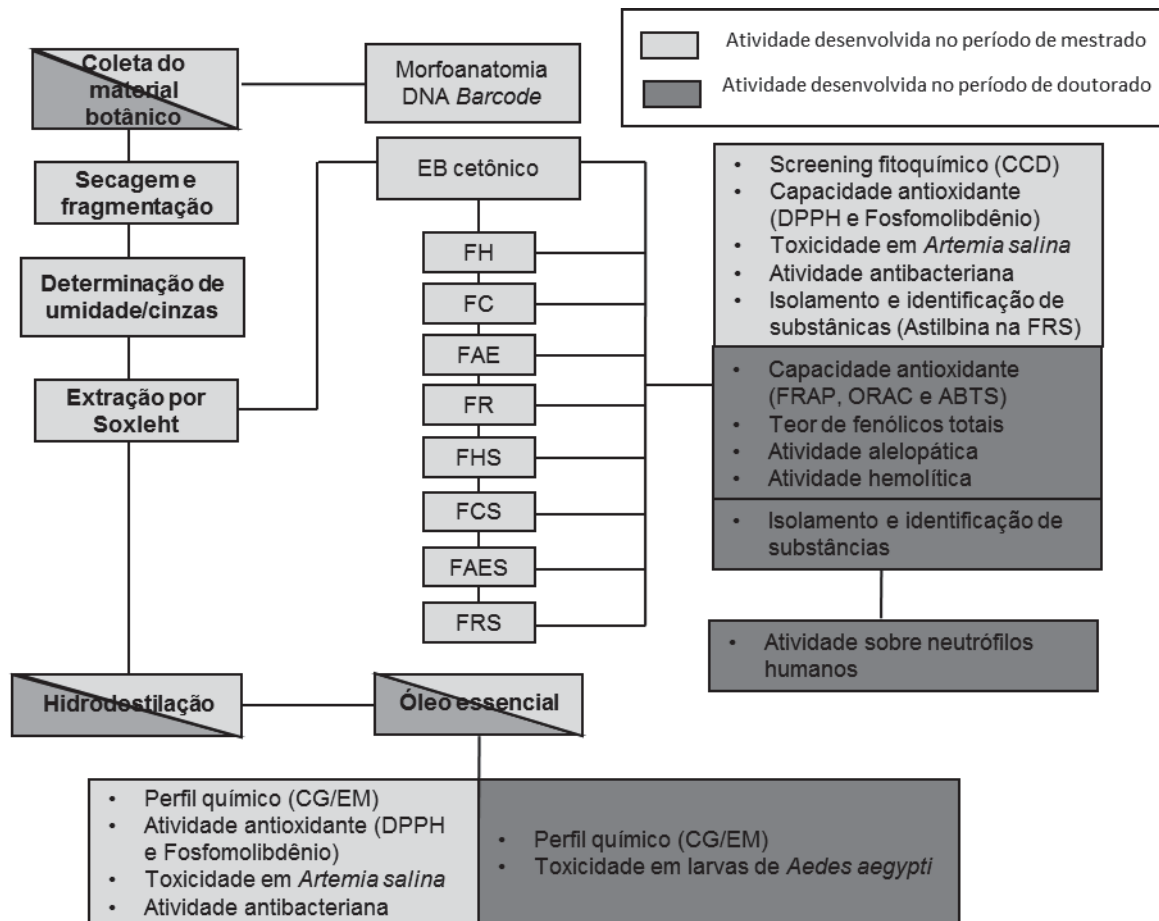
Dessa forma, com vistas a redução do desenvolvimento de resistência aos inseticidas disponíveis, a recomendação da OMS é que, seja viabilizado a combinação de produtos com diferentes mecanismos de ação, e que possuam, como alvo, diferentes fases de desenvolvimento do mosquito (MAGALHÃES; SILVA; ESPINDOLA, 2020).

Nesse contexto, estudos de compostos de origem vegetal, incluindo óleos essenciais, com propriedades inseticidas e larvicidas são viáveis e se tornam promissores no combate a doenças transmitidas por vetores (SANTANA et al., 2015).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

As etapas da pesquisa com *O. bicolor* estão representadas no fluxograma apresentado na (FIGURA 8).

FIGURA 8 - FLUXOGRAMA DO ESTUDO DE *Ocotea bicolor*



FONTE: A autora (2019)

NOTA: extrato bruto (EB); fração hexano (FH), fração clorofórmio (FC), fração acetato de etila (FAE), fração remanescente (FR), fração hexano do sólido (FHS), fração clorofórmio do sólido (FCS), fração acetato de etila do sólido (FAES), fração remanescente do sólido (FRS); cromatografia em camada delgada (CCD); cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa (CG/EM); 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH); capacidade antioxidante por meio da redução do ferro (FRAP); Capacidade de Absorção de Radicais de Oxigênio (ORAC); 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico (ABTS).

#### 3.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO

A coleta do material botânico foi realizada em 12 de agosto de 2015 no capão do CIFLOMA no Campus Botânico da Universidade Federal do Paraná,



município de Curitiba, estado do Paraná, Brasil, nas coordenadas aproximadas de 25°26'50.0"S 49°14'24.4"W. Uma segunda coleta, no mesmo local e da mesma espécie, a fim de obter material para extração de óleo essencial, foi realizada em 11 de julho de 2019.

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

O estudo com esta espécie possui autorização do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (IBAMA) para o acesso de amostras do patrimônio genético para fins de pesquisa científica sem potencial de uso econômico, constantes no Processo 02001.001165/2013-47 (ANEXO 1) e autorização do Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) n° A80029B.

O material coletado, após separação das folhas foi seco em temperatura ambiente, em local fresco, arejado e protegido de umidade. Após esse material foi submetido à fragmentação em moinho de facas e martelos. O extrato bruto cêtonico (EB) foi obtido por meio do aparato de Soxhlet, e o particionamento pelo sistema de partição líquido-líquido. No momento da ressuspensão do extrato bruto (EB) para o particionamento, uma parcela não foi solúvel em solvente orgânico metanol e água, formando uma massa sólida a qual foi separada da parcela que foi solúvel. Deste modo o particionamento foi realizado a partir dessas duas parcelas separadamente, obtendo-se ao todo oito frações: fração hexano (FH), fração clorofórmio (FC), fração acetato de etila (FAE), fração remanescente (FR), fração hexano do sólido (FHS), fração clorofórmio do sólido (FCS), fração acetato de etila do sólido (FAES), fração remanescente do sólido (FRS)

## 3.2 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS

### 3.2.1 Isolamento

A purificação da fração foi efetuada por meio de cromatografia em coluna. A fração acetato de etila do sólido (FAES) foi solubilizada em metanol e após

incorporada a sílica-gel 60 (0,063-0,200 mm / 70-230 mesh ASTM), formando a pastilha de sílica a qual foi submetida à evaporação até secura, sob constante homogeneização. A coluna foi empacotada com a sílica, sobre a qual foi colocada a pastilha, sendo que esta foi isolada entre camadas de papel de filtro. Para eluição da amostra utilizou-se um sistema de passagem de solventes com gradientes de polaridades crescentes.

Foi utilizada 100 mL de cada fase móvel, com uma vazão de aproximadamente 1 mL/minuto iniciando com hexano 50% e 50% de acetato de etila, com acréscimo de 5% de acetato de etila, num gradiente de polaridade crescente, aumentando-se a proporção de acetato de etila até 100% e acrescentando metanol na ordem de 5% até metanol 100%. Foram recolhidos 215 frascos de vidro com capacidade média de 18 mL.

Os eluatos coletados foram submetidos à secura, em temperatura ambiente para a cristalização dos compostos.

### 3.2.2 Identificação

A substância isolada foi submetida a análise espectrométrica para determinação da estrutura, para isso foi realizada Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$ , utilizando o aparelho, Bruker AVANCE III 400 RMN, operando a 9,5 T e observando  $^1\text{H}$  a 400,13 MHz e  $^{13}\text{C}$  a 100,61 MHz, equipado com uma sonda de detecção inversa multinuclear de 5 mm com gradiente z. Esse procedimento foi realizado no departamento de Bioquímica (UFPR).

### 3.3 EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

A técnica utilizada para extração do óleo essencial foi a hidrodestilação, por meio de aparelho de Clevenger modificado por WASICKY (1963), baseando-se na metodologia apontada pela Farmacopeia Brasileira - 6ª edição (BRASIL, 2019).

A extração foi realizada com as folhas e galhos de *O. bicolor* separadamente, coletadas em 11 de julho de 2019. Em um balão volumétrico foi colocado 100g do material vegetal, juntamente com pedaços de porcelana para evitar uma superebulição. Acrescentou-se água destilada até 20 vezes o volume do

material seco. O balão foi acoplado ao aparelho de Clevenger e mantido sobre uma manta térmica a 95°C, aproximadamente por um período de 6 horas.

Decorrido o tempo da extração, foi realizada a leitura do volume do óleo essencial diretamente na escala volumétrica do tubo separador do aparelho de Clevenger e, posteriormente calculado o resultado em mililitros (mL/%) de óleo essencial por 100 g da droga. O óleo resultante foi coletado e acondicionado em frasco de vidro âmbar sendo armazenado a -18 °C para uso posterior.

### 3.3.1 Caracterização química do óleo essencial

A caracterização dos constituintes químicos presentes no óleo essencial das folhas e galhos de *O. bicolor* foi realizada no laboratório do Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná, cujo sistema empregado foi composto de cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massa Shimadzu® CG/EM – QP 2010 Plus equipado com coluna capilar Rtx-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). Injetor em modo splitless a 250 °C, interface e fonte de íons a 300°C. A janela de massas analisada foi entre m/z 40 e m/z 350, utilizando Hélio como gás de arraste. Rampa de injeção para análise com temperatura do injetor em 250° C, pressão da coluna de 20 psi, iniciando-se com temperatura de 50° C por 5 minutos elevando-se para 200°C a uma razão de 5° C/minutos. Para o cálculo do Índice Aritmético foi utilizado o padrão de alcanos saturados (C6-C30). Os componentes químicos do óleo foram identificados comparando o IA (Índice Aritmético) com a bibliografia (ADAMS, 2017) e Biblioteca NIST14.

### 3.4 TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS

A determinação do teor de fenólicos totais foi realizada pelo método de Folin-Ciocalteu descrito por Zielinski e Kozłowska (2000) com algumas adaptações.

A solução estoque das amostras foi preparada na concentração de 1mg/mL utilizando-se metanol como solvente cujas diluições variaram de 5 - 350 µg/mL. O ácido gálico foi utilizado para compor a curva padrão sendo solubilizado em água e nas diluições de 2 – 90 µg/mL. Em eppendorfs de 2 mL adicionou-se 600 µL de água destilada, 200 µL da amostra, padrão ou branco (água/metanol), 100 µL de reagente

Folin 1N e 100  $\mu$ L de Carbonato de sódio 25%. Deixou-se em repouso por 30 minutos. no escuro e posteriormente, uma alíquota de 200  $\mu$ L foi transferida para microplaca de fundo chato de 96 poços e a leitura realizada em espectrofotômetro Multiskan FC, Thermo Scientific® a 700 nm. O conteúdo de fenóis totais foi determinado por interpolação da absorbância das amostras frente à curva de calibração construída com o padrão ácido gálico e os resultados expressos em equivalente de ácido gálico (mg EAG/g). Todas as determinações foram realizadas em triplicata.

### 3.5 ESTUDOS DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

#### 3.5.1 Capacidade antioxidante total pelo método de redução do ferro - FRAP (capacidade antioxidante por meio da redução do ferro)

Para a determinação da capacidade antioxidante por meio da redução do ferro (FRAP) foi utilizado procedimento descrito por Benzie e Strain (1996), modificado por Pulido; Bravo; Saura-Calixto (2000), e adaptado para microplacas. O reagente FRAP foi preparado no momento da análise, por meio da mistura de 50 mL de tampão acetato (0,3 M, pH 3,6), 5 mL de solução 2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina (TPTZ) (10 mM TPTZ em 40 mM HCl) e 2,5 mL de  $\text{FeCl}_3$  (20 mM) em solução aquosa.

Para preparo das amostras foi utilizado soluções estoques em metanol (1mg/mL), e as diluições variaram de 20-1400  $\mu$ g/mL. Em ambiente escuro, foi colocado 30  $\mu$ L de água destilada, 10  $\mu$ L de amostra e 300  $\mu$ L do reagente FRAP, em microplacas de fundo chato, de 96 poços. O mesmo procedimento foi realizado para o branco (água/metanol) e o padrão fitoquímico (rutina e vitamina C) e sulfato ferroso. A microplaca foi incubada por 30 minutos em leitor de microplaca em espectrofotômetro Multiskan FC, Thermo Scientific®, em uma temperatura de 37°C. A leitura foi realizada em comprimento de onda de 595 nm. A curva padrão foi realizada com sulfato ferroso (100-1800 $\mu$ g/mL) cujos resultados de absorbâncias foram plotados para obtenção da equação da reta. A confecção da curva padrão das amostras foi confeccionada plotando as concentrações x absorbâncias. Os resultados foram expressos em capacidade antioxidante equivalente ao  $\mu$ M de

sulfato ferroso por g de amostra ( $\mu\text{M}$  sulfato ferroso/g). Todo o ensaio foi realizado em triplicata.

### 3.5.2 Capacidade antioxidante pelo método ABTS<sup>•+</sup>

A capacidade antioxidante pelo método ABTS<sup>•+</sup> [2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico] foi realizada conforme descrição de Re e colaboradores (1999), modificado por Payet e colaboradores (2005), com adaptações. O radical ABTS foi formado pela reação da solução ABTS 7 mM com a solução de persulfato de potássio 140 mM, ao abrigo de luz e temperatura ambiente por 16 horas. Uma vez formado o radical, pipetou-se 1 mL da solução diluído em álcool etílico P.A., para ajustar a leitura da absorbância a 0,700 no comprimento de onda de 734 nm. A diluição foi realizada em local com abrigo de luz, e utilizada em seguida. Para realização da curva padrão foi preparada a solução estoque de trolox 2000  $\mu\text{M}$ , (0,025 g de trolox em 40 mL de álcool etílico, completando o volume em balão volumétrico de 50 mL) o qual foi testado nas concentrações de 100 – 500  $\mu\text{M}$ . As concentrações das amostras testadas variaram de 10 – 800  $\mu\text{g/mL}$ . Em ambiente escuro foi transferida uma alíquota de 20  $\mu\text{L}$  de amostra ou trolox, padrão fitoquímico (rutina) e branco (metanol) para microplaca de fundo chato, de 96 poços, e acrescentado 280  $\mu\text{L}$  de do reagente de ABTS. A microplaca foi incubada em leitor de microplaca em espectrofotômetro Multiskan FC, Thermo Scientific®, por 5 minutos a 30 °C, onde a leitura foi realizada em comprimento de onda de 734 nm.

Após a leitura, foi plotada as concentrações e absorbâncias do Trolox para obtenção da equação da reta, da curva padrão. Para confecção da curva padrão das amostras, foi plotada as concentrações x absorbâncias. Os resultados foram expressos em capacidade antioxidante equivalente ao  $\mu\text{M}$  de Trolox por g de amostra ( $\mu\text{M}$  Trolox/g).

### 3.5.3 Capacidade antioxidante pelo método ORAC (Capacidade de Absorção de Radicais de Oxigênio)

O teste por ORAC foi realizado conforme metodologia proposta por Zulueta; Esteve; Frigola (2009). Em microplacas foram adicionados 20  $\mu\text{L}$  de amostra e homogeneizados com 120  $\mu\text{L}$  de fluoresceína (61,2 nM). O extrato e frações foram

testados nas concentrações de 50 a 500 µg/mL. O trolox foi utilizado como padrão e PBS (Salina tamponada com fosfato) como branco. Após a microplaca foi incubada por 10 minutos a 37°C com 3 minutos de agitação. Decorrido 10 minutos, foram adicionados às microplacas 60 µL de solução AAPH (19 mM) para dar início à reação. A intensidade de fluorescência (excitação = 485 nm/20 nm e emissão= 528/20 nm) foi verificada em modo cinético, com leitura em intervalos de 1 minuto, até que o valor da fluorescência atingisse valor igual ou inferior a 0,5% da fluorescência inicial. Todos os reagentes foram preparados em tampão fosfato 75 mM, pH 7,4. A capacidade antioxidante foi expressa em µmol de equivalente trolox por 100g de extrato (µmol TE 100g<sup>-1</sup> de amostra).

#### 3.5.4 Análise estatística

Em todos os ensaios de capacidade antioxidante foi utilizado o teste ANOVA para a verificação das diferenças entre as médias, seguido de Tukey  $p < 0,05$ , utilizando-se o programa estatístico Sisvar versão 5.6 (FERREIRA, 2011). A fim de investigar as relações entre as variáveis capacidade antioxidante e o teor de compostos fenólicos foi adotado o teste de correlação de Pearson, o qual indica a existência positiva ou negativa entre duas variáveis. Para tanto, foi utilizado o programa estatístico SPSS versão 23.0.

### 3.6 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

#### 3.6.1 Atividade alelopática

Este teste foi realizado conforme Macias, Castelhana e Molinillo (2000), Chon e colaboradores (2005) e Dias e colaboradores (2005), utilizando-se sementes de *Lactuca sativa* (alface - variedade babá de verão, da empresa Isla<sup>®</sup>) e *Allium cepa* (Isla<sup>®</sup>). Em caixas gerbox previamente higienizada com hipoclorito de sódio 10% e posteriormente com álcool 70° GL, foi colocado papéis de filtro Whatman n° 6 previamente autoclavados a 120 °C por 20 minutos sobre os quais foi adicionado 6,0 mL de cada amostra (EB e frações), preparadas nas concentrações de 100, 250, 500, 750 e 1000 µg/mL.

As caixas foram mantidas em temperatura ambiente, por 24 horas para evaporação do solvente. Após esse período foi acrescentado 6,0 mL de água destilada para ressuspensão da amostra e cada caixa foi dividida em 4 quadrantes que representaram a quadruplicata do teste. Foram depositadas 5 sementes em cada quadrante, totalizando 20 por caixa. As caixas foram envolvidas em sacos de polietileno e colocadas em uma Câmara Climática/Incubadora M.S. Mistura<sup>®</sup>, com temperatura controlada em 20 °C. Como controle do solvente foi utilizado 6,0 mL de metanol e como controle positivo 6,0 mL de água destilada, sob as mesmas condições acima descritas para as amostras.

Para análise estatística foi utilizado o programa estatístico Sisvar versão 5.6 (FERREIRA, 2011), utilizando-se ANOVA e o teste de Scott-Knott em nível de 5% de probabilidade para a verificação das diferenças das médias estatisticamente significativas.

#### 3.6.1.1 Teste de Germinação

Esta análise foi realizada conforme preconizado por Macias e colaboradores (2000), na qual foram realizadas contagens diárias (em um período de 7 dias para *Lactuca sativa* e 14 dias para *Allium cepa*) e no mesmo horário do número de sementes germinadas, tendo como critério a protrusão radicular com no mínimo 2,0 mm de comprimento. A germinação foi avaliada por meio do IVG (Índice de velocidade de germinação) (MAGUIRE, 1962) cujo cálculo foi levado em consideração a quantidade de sementes germinadas em cada repetição de cada tratamento, dividindo-a pelo dia da germinação e somando-se até o último dia de germinação, de acordo com equação (1):

$$IVG = (G1 / N1 ) + (G2 / N2 ) + \dots + (Gn / Nn )$$

onde:

G = número de sementes germinadas

N = número de dias da sementeira.

As médias dos IVGs foram submetidas à análise estatística.

### 3.6.1.2 Teste de Crescimento

Este ensaio foi realizado segundo metodologia descrita por Barnes e Putnam (1987) e Macias e colaboradores (2000). As caixas destinadas ao teste de crescimento foram mantidas em Câmara Climática / Incubadora M.S. Mistura<sup>®</sup> por 7 dias quando testadas as sementes de *Lactuca sativa* e por 14 dias para *Allium cepa*. Após esse período foi medido o alongamento da raiz (radícula) e do hipocótilo com auxílio de paquímetro digital. Os resultados das leituras de crescimento foram submetidos à análise estatística.

### 3.6.2 Atividade hemolítica

O ensaio da atividade hemolítica foi realizado conforme descrito por Aslam et al (2011), com algumas adaptações. Foi utilizado sangue de carneiro desfibrilado (Newprov<sup>®</sup>), do qual 3 mL foi transferido para um tubo de falcon e centrifugado durante 5 minutos a 3000 rpm. O sobrenadante foi desprezado e a solução de hemácias ressuspensa em 5 mL de PBS (NaCl 8,0 g/L, KCl 0,2 g/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,15 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2 g/L, H<sub>2</sub>O 1000 mL, Ph 7,4) a 4°C e centrifugado por 5 minutos a 3000 rpm. Esse processo foi repetido por 3 vezes. A papa de hemácias resultante foi diluída em PBS (4 °C) até a concentração de 2,5%. As amostras foram preparadas nas concentrações de 100, 250, 500, 750 e 1000 µg/mL solubilizadas em 1% de metanol, Triton 0,1% como controle positivo, PBS como controle negativo e metanol 1% como controle do solvente. Em microtubos de centrifugação (Eppendorf<sup>®</sup>), adicionou-se 20 µL da amostra ou controles e 180 µL da solução de hemácia (2,5%), os quais foram incubados em estufa com temperatura controlada de 37 °C ±0,5, por 30 minutos. Após resfriamento em banho de gelo por 5 minutos os tubos foram centrifugados por 5 minutos em 3000 rpm. Após centrifugação, foi retirado 100 µL do sobrenadante e diluído em 900 µL de PBS gelado. Posteriormente foi transferido 200 µL dessa diluição para uma placa de 96 poços e feita a leitura da absorbância a 576 nm em espectrofotômetro Multiskan FC, Thermo Scientific<sup>®</sup>.

Os resultados foram expressos como porcentagem de hemólise em relação ao controle, sendo calculada de acordo com equação (2):

$$\% \text{ hemólise} = (Abs_A / Abs_T) * 100$$



onde:

$Abs_A$  = Absorbância da amostra

$Abs_T$  = absorbância do triton.

A diferença entre as médias foi verificada por meio do teste ANOVA, seguido de *Scott-Knott*  $p < 0,05$ , utilizando-se o programa estatístico Sisvar versão 5.6 (FERREIRA, 2011).

### 3.6.3 Ensaio de NBT sobre neutrófilos humanos

Este estudo foi submetido e realizado após aprovação do Comitê de Ética para Pesquisas em Humanos da UFPR (Número de registro CEP/SD: 1033.158.10.11) (ANEXO 2). Para a análise de ativação dos neutrófilos, foi utilizada a técnica adaptada e modificada de Park, Fikrig e Smithwick (1968), Park e Good (1970), Levinsky e colaboradores (1983), Markert, Andrews e Babior (1984) e Abreu e colaboradores (2009).

Para a separação dos neutrófilos a partir de sangue de indivíduos saudáveis, foram utilizados tubos de falcon, onde foi adicionado 36 mL de água destilada e 3 mL de sangue, homogeneizando delicadamente por 30 segundos. Em seguida, foi adicionado 12 mL de tampão PBS (4 vezes mais concentrado) homogeneizando por 15 segundos, seguido de centrifugação a 2000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e ao sedimento foi adicionado 3 mL de PBS na concentração normal, ressuspendendo, delicadamente, com auxílio de uma pipeta de pasteur.

Em outro tubo de falcon, foi colocado 3 mL de ficol Histopaque®-1077 (Ficoll PM400, diatrizoato de sódio e de cálcio dissódico de EDTA). A suspensão de células foi adicionada pela parede do tubo, formando uma solução bifásica. Essa solução foi centrifugada por 25 minutos a 1500 rpm e ressuspendida em 3 mL de PBS normal. A suspensão foi novamente centrifugada por 10 minutos a 2000 rpm. Por fim, o sobrenadante foi retirado e o sedimento foi ressuspendido com 200  $\mu$ L de PBS normal.

A suspensão de células (50  $\mu$ L) foi adicionada às lâminas limpas e secas previamente tratadas com 20  $\mu$ L de astilbina (10  $\mu$ g/mL) ou 20  $\mu$ L de PMA (Forbol-12-miristato-13-acetato) como controle positivo (10  $\mu$ g/mL). O PMA tem a capacidade

de ativação de neutrófilos. Como controle negativo foram preparadas duas lâminas contendo somente neutrófilos humanos.

Após adição das células as lâminas foram incubadas à 36,8 °C, em câmara úmida por 20 minutos. Após a incubação, as lâminas foram lavadas com PBS delicadamente por três vezes, com o auxílio de pipeta de pasteur. Foi adicionado NBT (Cloreto de tetrazólio-nitrozul) nas lâminas com astilbina, PMA e em uma das lâminas com neutrófilos humanos.

As lâminas foram levadas à estufa por mais 15 minutos. Em seguida, procedeu-se a lavagem das lâminas conforme procedimento acima descrito. Foram adicionadas 2 gotas de safranina 0,25% e, decorridos 10 minutos, as lâminas foram lavadas novamente e analisadas microscopicamente com lentes de imersão (aumento de 100x). As lâminas que apresentaram a presença de grânulos azuis no interior dos neutrófilos foram considerada como ativadas.

#### 3.6.4 Atividade larvívica sobre *Aedes aegypti* (CULICIDAE)

As larvas utilizadas nesse experimento pertencem a linhagem “Rockfeller” de *Aedes aegypti* Linneaus 1762 (Diptera: Culicidae), cedido pelo Instituto Oswaldo Cruz (Estado do Rio de Janeiro, Brasil) da coleção original no CDC (Centro de Controle de Doenças, Porto Rico, EUA), conforme metodologia descrita pela WHO (2009) e por Grzybowski, et al. (2012). As colônias do mosquito foram mantidas em sala isolada no Laboratório de Morfologia e Fisiologia de Culicidae e Chironomidaenos (LAMFIC) do Departamento de Zoologia da Universidade Federal do Paraná – UFPR. O teste foi aprovado pelo comitê de ética em experimentação animal do setor de Ciências biológicas, sob o número 719 (ANEXO 3).

Para estimular a oviposição, as fêmeas adultas dos mosquitos foram alimentadas com sangue de ratos; os ovos depositados em pedaços de papel de filtro, foram colocados em recipiente de plástico com água desclorada. As larvas foram criadas em bandejas plásticas com aproximadamente 3.000 mL de água desclorada em câmara (BOD) com temperatura de 26 °C ( $\pm 2$  °C), umidade relativa de 80% ( $\pm 5$ %) e fotoperíodo de 12:12 h (claro-escuro). As larvas foram alimentadas com ração para peixe (Tetramin®), finamente triturada, desde a eclosão até atingirem o 3º estágio larval.

Para cada tratamento foram utilizadas 15 larvas em 100 mL de água mineral (Ouro fino®). em copos de plástico descartáveis de 300 mL. Uma vez colocadas as larvas em cada recipiente, foi adicionado a amostra (óleo essencial solubilizado em metanol e diluído em água desclorada nas concentrações de 4-30 µg/mL) e completado com água mineral para um volume final de 200 mL por tratamento. Um grupo controle de larvas foi exposto a uma solução aquosa de metanol nas mesmas concentrações da amostra, enquanto outro grupo controle foi exposto apenas a água desclorada. Os copos com as larvas foram mantidos nas condições descritas para a criação das larvas, durante 24 horas. Todo o ensaio foi realizado em quadruplicata.

Após esse período foi realizada a contagem das larvas, considerando como larvas mortas as que estavam paralisadas totalmente ou com dificuldade de subir à superfície quando tocadas. A determinação dos valores de CL<sub>50</sub> e CL<sub>95</sub> e 95% de intervalos de confiança foram calculadas por meio da regressão Probit, utilizando o programa R (v.3.0.1) (R Core Team, 2017) e o pacote “ecotoxicologia” (GAMA, 2015). As larvas foram analisadas e fotografadas por meio do Estereomicroscópio Discovery.V12 (Zeiss) câmera Axiocam 503 (Zeiss) software Zen pro 2.6 (Zeiss).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO

A partir da coleta realizada em 11 de julho de 2019 houve um rendimento de 413,9g (folhas secas) e 618,1g (galhos secos) após fragmentação em moinho de facas e martelos. Esse material foi utilizado para obtenção do óleo essencial.

### 4.2 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS CONTITUENTES QUÍMICOS

#### 4.2.1 Composto FAES 91

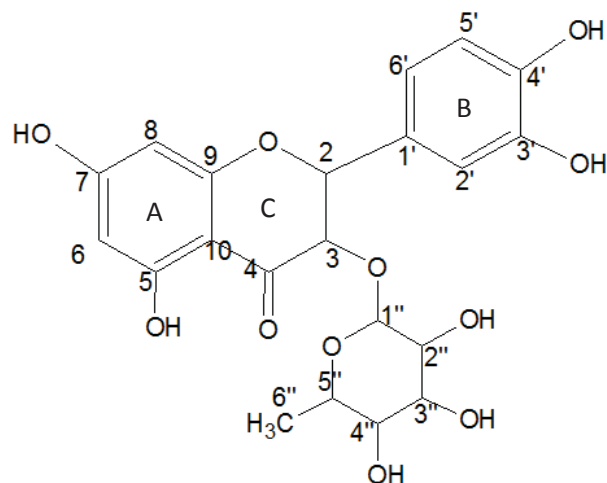
Dos 215 frascos dos eluatos obtidos por meio de cromatografia em coluna, o frasco 91 após evaporação do solvente apresentou uma substância cristalizada de cor amarelo claro, a qual após análise em RMN permitiu a elucidação estrutural de um composto denominado astilbina.

Para melhor entendimento a (FIGURA 9) demonstra a numeração dos átomos adotada na discussão dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  da referida substância.

Conforme pode ser visualizado na (FIGURA 10), no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  percebe-se a presença de cinco dubletos, com integral para 1H cada, nas regiões de  $\delta$  4,58 ppm ( $J = 10,7$  Hz; H-3),  $\delta$  5,08 ppm ( $J = 10,8$  Hz; H-2),  $\delta$  5,89 ppm ( $J = 2,1$  Hz; H-6),  $\delta$  5,92 ppm ( $J = 2,1$  Hz; H-8) e  $\delta$  6,96 ppm ( $J = 1,6$  H-2'). Os dubletos presentes em  $\delta$  5,08 ppm e 4,58  $\delta$  ppm são referentes a uma ligação trans que é comprovada pela constante de acoplamento. A presença do dubleto  $\delta$  6,96 juntamente com  $\delta$  6,85 ppm ( $J = m$ , H-5') e  $\delta$  6,85 ppm ( $J = m$ , H-6'), caracterizam o anel B presente na estrutura do composto, comprovando assim a presença de OH nas posições 3' e 4' para formar o padrão de substituição 1,3,4 – tri-substituído para esse anel.

Sinais na região de  $\delta$  3,31 a 4,26 ppm são característicos de açúcares, sendo que o dubleto em  $\delta$  4,06 ppm ( $J = 1,3$  Hz) foi atribuído ao carbono anomérico (H 1"), sugerindo uma conformação em  $\alpha$ , confirmando assim ser um flavonoide  $\alpha$  glicosídico.

FIGURA 9 - NUMERAÇÃO DOS ÁTOMOS DE CARBONO ADOTADA NA DISCUSSÃO DO ESPECTROS DE RMN DE  $^1\text{H}$  E DE  $^{13}\text{C}$  DA SUBSTÂNCIA ISOLADA.



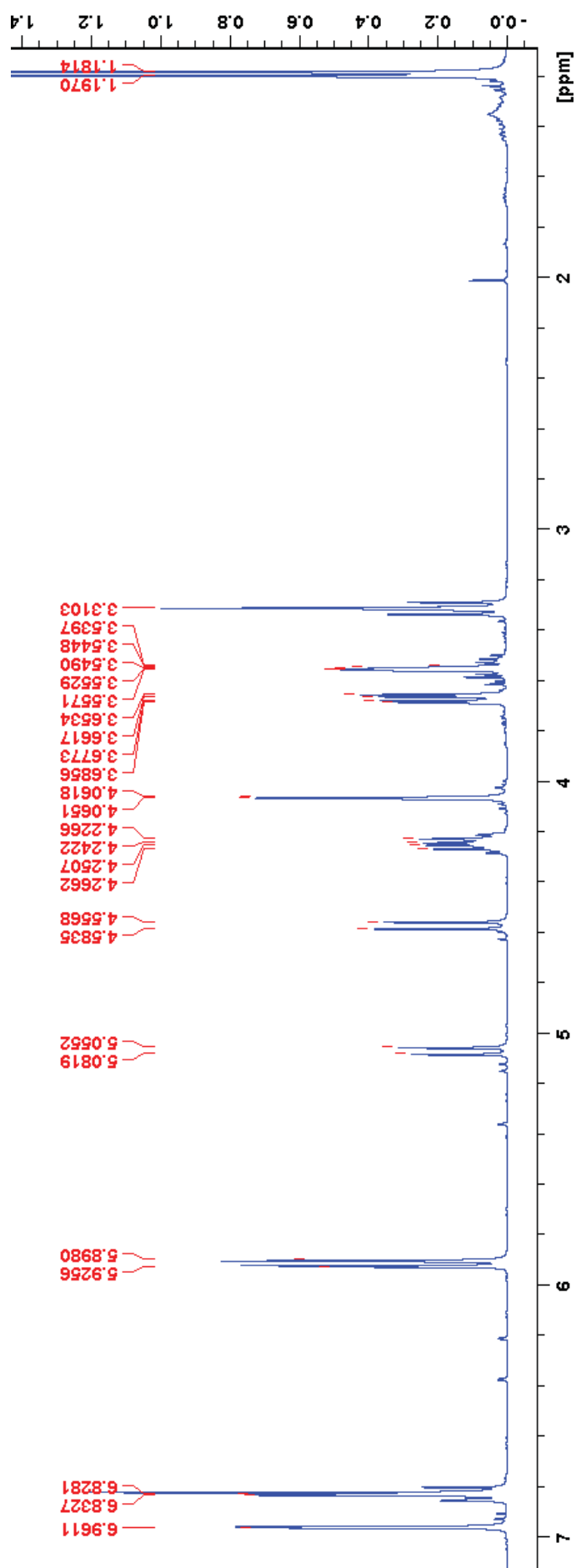
FONTE: A autora (2019).

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (FIGURA 11) apresentou sinais correspondentes a 21 átomos de carbono, confirmando ser um flavonoide monoglicosilado. Foi observada a presença do sinal da carbonila em C-4 em  $\delta$  195,9 que juntamente com os sinais  $\delta$  83,9 em C-2 e 78,6 em C-3, demonstram que a substância possui a estrutura de um diidroflavonol. Além disso, os sinais em  $\delta$  17,9 (C-6''), e  $\delta$  102,1 (C-1'') que correspondem respectivamente ao grupo metílico e ao carbono anomérico do açúcar, aliado ao conjunto de sinais na região de  $\delta\text{C}$  71,8 (C-2''), 72,2 (C-3''), 73,8 (C-4'') e 70,6 (C-5''), permitem caracterizar que a unidade monossídica trata-se de uma ramnose (REGASINI *et al.*, 2008).

Após atribuição dos sinais de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , os valores de deslocamento químico obtidos foram comparados com dados da literatura para a astilbina e apresentaram grande similaridade, conforme pode ser observado na (TABELA 6).

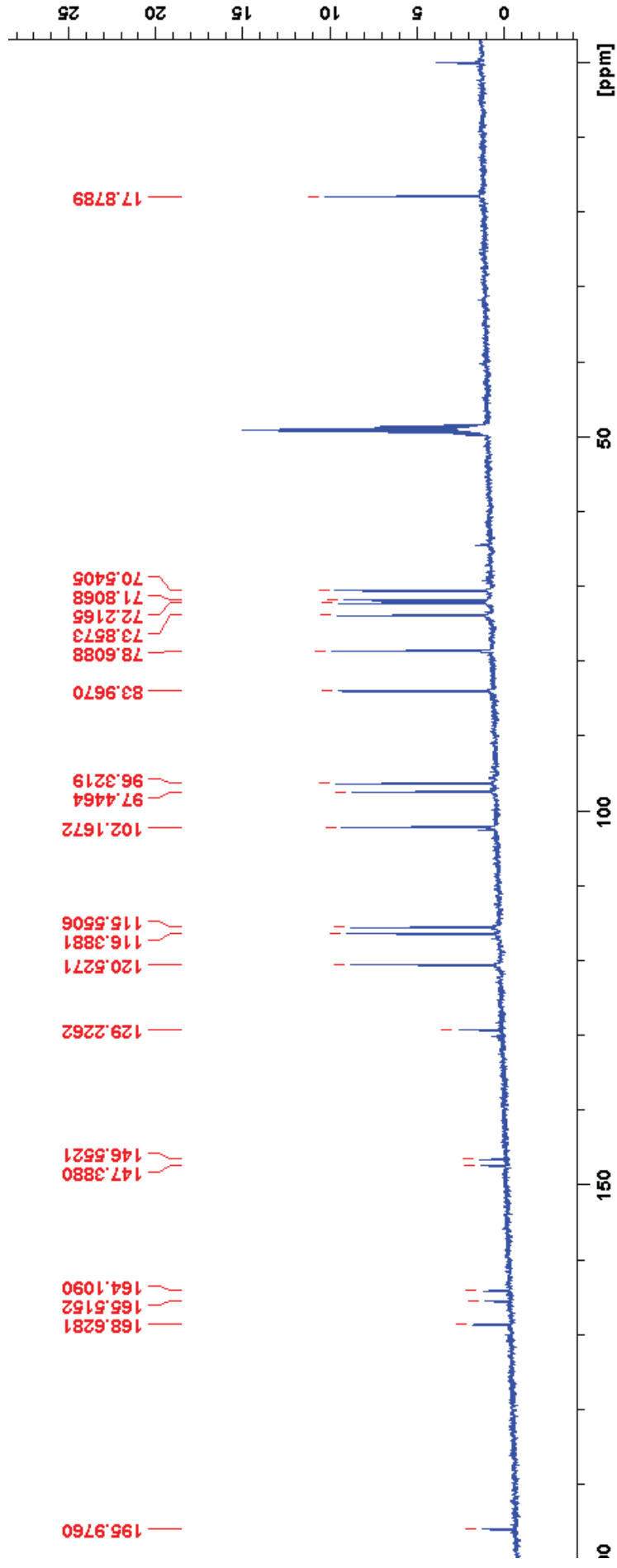
Essa substância já foi identificada no estudo com *O. bicolor* na Fração Remanescente do Sólido (FRS) (DAMASCENO, 2017). A astilbina (3-O- $\alpha$ -ramnosídeo de taxifolina ou diidroquercetina-3-O- $\alpha$ -ramnosídeo) é um flavonoide glicosilado da classe dos diidroflavonóis, sendo que a aglicona deste é a taxifolina. Os diidroflavonóis tem como característica uma ligação simples entre os carbonos 2 e 3 do anel C, e por isso, apresentam centro de assimetria em suas moléculas. São biossintetizados a partir da via dos fenilpropanoides (ZUANAZZI, 2001).

Essa substância muito utilizada na medicina tradicional chinesa no tratamento de doenças inflamatórias e autoimunes (THUAN et al., 2017; ZHANG et al., 2017a) tem sido amplamente estudada por apresentar potencial anti-inflamatório (RUANGNOO et al., 2012; DIAO et al., 2014; KONG et al., 2016); antioxidante (PETACCI et al., 2010; XU et al., 2013); antibacteriano (MOULARI et al., 2007) entre outras. No gênero *Ocotea* a astilbina já foi identificada nas espécies *O. elegans* e *O. corymbosa* (BATISTA et al, 2010) e em *O. minarum* foi detectada a presença de taxifolina (GARCEZ et al., 2005).

FIGURA 10 - ESPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$  DO COMPOSTO FAES 91

FONTE: A autora (2019).

FIGURA 11 - ESPECTRO DE RMN DE <sup>13</sup>C DO COMPOSTO FAES 91



FONTE: A autora (2019)



TABELA 6 - DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  E  $^1\text{H}$  DO COMPOSTO FAES91 EM COMPARAÇÃO COM DADOS DA LITERATURA PARA ASTILBINA

Posição	RMN de $^{13}\text{C}$ experimental	RMN de $^{13}\text{C}$ da literatura*	RMN de $^1\text{H}$ experimental	RMN de $^1\text{H}$ da literatura*
2	83,9	83,9	5,08d (10,6)	5,08d (10,8)
3	78,6	78,5	4,58d (10,7)	4,58d (10,4)
4	195,9	196,0		
5	165,5	165,5		
6	97,4	97,3	5,89d (2,1)	5,89d (2,0)
7	168,6	168,6		
8	96,3	96,2	5,92d (2,1)	5,91d (2,0)
9	164,1	164,1		
10	102,1	102,4		
1'	129,2	129,1		
2'	116,3	116,3	6,96d (1,6)	6,95d (1,6)
3'	146,5	146,5		
4'	147,3	147,3		
5'	115,5	115,4	6,83m	6,85m
6'	120,5	120,4	6,83m	6,85m
1''	102,1	102,1	4,06d (1,3)	4,04d (1,6)
2''	71,8	71,7	4,26m	4,28m
3''	72,2	72,1	3,68dd (9,5; 3,3)	3,67dd (9,6; 3,2)
4''	73,8	73,7	3,55dd (3,2; 1,6)	3,53dd (3,2; 1,6)
5''	70,5	70,5	3,31sl	3,32sl
6''	17,8	17,8	1,19d (6,1)	1,18d (6,0)

FONTE: A autora (2019)

NOTA:\* HUANG *et al.* (2011).  $\text{CD}^3\text{OD}$ . Valores são dados em ppm relativos ao sinal doTMS como padrão interno. Números em parêntese demonstram constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz). Sinais: sl=simpleto, d=dublete, dd=duplo dublete, m=multiplero

Na (TABELA 7) estão demonstrados os estudos mais recentes evidenciando as diversas bioatividades exercidas pela astilbina.

TABELA 7 - ATIVIDADES BIOLÓGICAS / FARMACOLÓGICAS DA ASTILBINA ISOLADA DE DIVERSAS ESPÉCIES

		(continua)
Atividades	Ação	Referências
Anti nociceptiva	Suprimiu os sintomas de contorção induzida por ácido acético, prolongou o período de latência em placa quente e reduziu a resposta de lamber e morder em camundongos injetados com formalina, sugerindo sua eficácia analgésica no sistema nervoso central.	BI et al., 2019
Anti-inflamatória	Diminuição da inflamação e acumulação de matriz extracelular em células mesangiais glomerulares de ratos induzidas por glicose inibindo a via TLR4 / MyD88 / NF-κB, sugerindo potencial na terapia de nefropatia diabética.	CHEN et al., 2018 b
Anti-inflamatória	Modulação da produção de citocinas pró-inflamatórias e inibição da expressão de elementos-chave na via de sinalização NF-κB mediada por receptores do tipo Toll (TLR) na atenuação da resposta inflamatória de artrite rematoide induzida por CFA em ratos.	DONG et al., 2017
Anti-inflamatória	A terapia combinada de astilbina e metotrexato contribuíram para uma eficácia sinérgica onde baixas doses de metotrexato foram eficazes na terapia de Artrite reumatoide por intermédio do aumento do sistema A2AAR / adenosina e diminuição dos sinais ERK / NFκB / STATs.	MA et al., 2018
Anti-inflamatória	Efeito protetor contra lesão pulmonar aguda induzida por sepse, atuando na expressão e produção de fator inibidor de macrófagos (MIF), que inibe a resposta inflamatória.	ZHANG et al., 2017b
Anti-inflamatória e antioxidante	Reduz o estresse oxidativo e a inflamação na nefrotoxicidade induzida por cisplatina. Isso ocorre pela ativação dependente de ERO da p53, MAPKs e cascatas de sinalização AKT e inibição da expressão de TNF-α e a ativação da via NF-κB	WANG et al., 2018
Toxicidade in vivo	Toxicidade oral em ratos superior a 500 mg / kg de peso corporal / dia, independentemente do sexo. Ausência de genotoxicidade quando testadas em ensaio de anomalia cromossômica (usando células de ovário de <i>hamster</i> chinês) e teste de micronúcleo de mamíferos (em camundongos).	GAO et al., 2017
Interação com albumina	Interação da astilbina com a albumina sérica bovina por meio de ligações espontâneas mediante forças de van der Waals e ligações de hidrogênio. Os resultados apresentam benefícios para pesquisas sobre transporte, distribuição e algumas bioatividades importantes dessa substância no corpo humano.	LIU et al., 2018
Neuroprotetora	Efeitos neuroprotetores em camundongos com doença de Parkinson induzidos por MPTP suprimindo gliose, super expressão da α-sinucleína e estresse oxidativo. Isso sugere que a astilbina pode servir como uma droga terapêutica para doença de Parkinson.	ZHU et al., 2019

TABELA 7 - ATIVIDADES BIOLÓGICAS / FARMACOLÓGICAS DA ASTILBINA ISOLADAS DE DIVERSAS ESPÉCIES

		(conclusão)
Atividades	Ação	Referências
Inibição enzimática	Inibição da atividade da $\alpha$ -glucosidase com um valor de IC <sub>50</sub> de 12,30 $\mu$ g / mL, de maneira não competitiva.	PÉREZ-NÁJERA et al., 2018
Pró-angiogênica	Atividade pró-angiogênica em células endoteliais de veia umbilical humana e em modelo de insuficiência vascular induzida por VRI em <i>zebra fish</i> , possivelmente por meio da ativação da sinalização dependente de PI3K / Akt e MAPK / ERK. Esses achados sugerem que a astilbina pode ser desenvolvida como um potencial agente na prevenção ou tratamento de doenças relacionadas à angiogênese.	LV et al., 2019
Regulação da barreira intestinal	Melhora das expressões de moléculas relacionadas a junção comunicante, levando a regulação positiva das funções de barreira nas células intestinais. Por meio do aumento do valor de resistência elétrica transepitelial nas células Caco-2 co-estimuladas com TNF- $\alpha$ mais IFN- $\gamma$ , e regulação positiva da expressão proteica de moléculas relacionadas a junção comunicante em células Caco-2 tratadas com TNF- $\alpha$ plus IFN- $\gamma$ .	NAKAHARA et al., 2017
Regulação celular	Inibe o crescimento de queratinócitos HaCaT por paralisar a fase S do ciclo celular por indução de p53 e p21 e ativação AMPK e regular a expressão do Fator de Crescimento do Endotélio Vascular. Esses achados sugerem que a astilbina pode ser um agente promissor para o tratamento da psoríase.	ZHANG et al., 2017a

FONTE: A autora (2019)

Além das atividades farmacológicas que a astilbina vem apresentando em diversos estudos, sua aplicação utilizando nanotecnologia tem sido investigada. Wang e colaboradores (2019) pesquisaram o impacto do tamanho da partícula no comportamento *in vitro* e *in vivo* de nanossuspensões, sendo que, em relação a dissolução, farmacocinética e distribuição tecidual de nanossuspensões de astilbina o tamanho ideal de partícula foi de 496,51 nm para a administração oral.

Um outro estudo avaliou a eficiência de encapsulamento de astilbina em nanopartículas de zeína-caseinato realizado pelo método anti-solvente. Uma melhora discreta da estabilidade foi obtida pelo nanoencapsulamento de astilbina e também um aumento da biodisponibilidade absoluta dessa substância de 0,32 para 4,40% em ratos, atestada pelo ensaio farmacocinético (ZHENG; ZHANG, 2019).

### 4.3 ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS E GALHOS DE *Ocotea bicolor* Vattimo-Gil

#### 4.3.1 Rendimento do óleo essencial

O rendimento obtido a partir de 100g de folhas secas e galhos secos de *O. bicolor* foram respectivamente de 1,7% e 0,7%.

Conforme resultados obtidos observa-se que o rendimento do OE das folhas é maior que o dos galhos. Quando comparado, o rendimento do OE de *O. bicolor* foi maior que outras espécies do mesmo gênero: *O. indecora* 0,09% nas folhas e 0,2% nos galhos (SILVA et al., 2019); *O. nutans* 0,54% nas folhas (BETIM et al., 2019); *O. paranaenses* 0,1% nas folhas (GRIBNER et al., 2020a); *O. porosa* 1,03% nas folhas (BRUSTULIM et al., 2020).

Em estudo prévio (DAMASCENO, 2017), o rendimento do OE das folhas secas de *O. bicolor* foi de 3,2%. Em comparação ao rendimento apresentado no presente estudo, houve uma diminuição de 46,9%. Essa variação no rendimento do OE também foi encontrada em estudos com *O. odorífera* onde houve um menor rendimento (1,2%) (CANSIAN et al., 2010), em comparação ao estudo de SILVA e colaboradores (2019) onde o rendimento foi de 2,79%. Em outro estudo com *O. odorífera* foi observado uma acentuada queda nos teores de óleo nas folhas coletadas no outono em relação às demais estações sugerindo que essa queda pode estar associada à radiação luminosa e a pluviosidade (CASTELLANI et al., 2006).

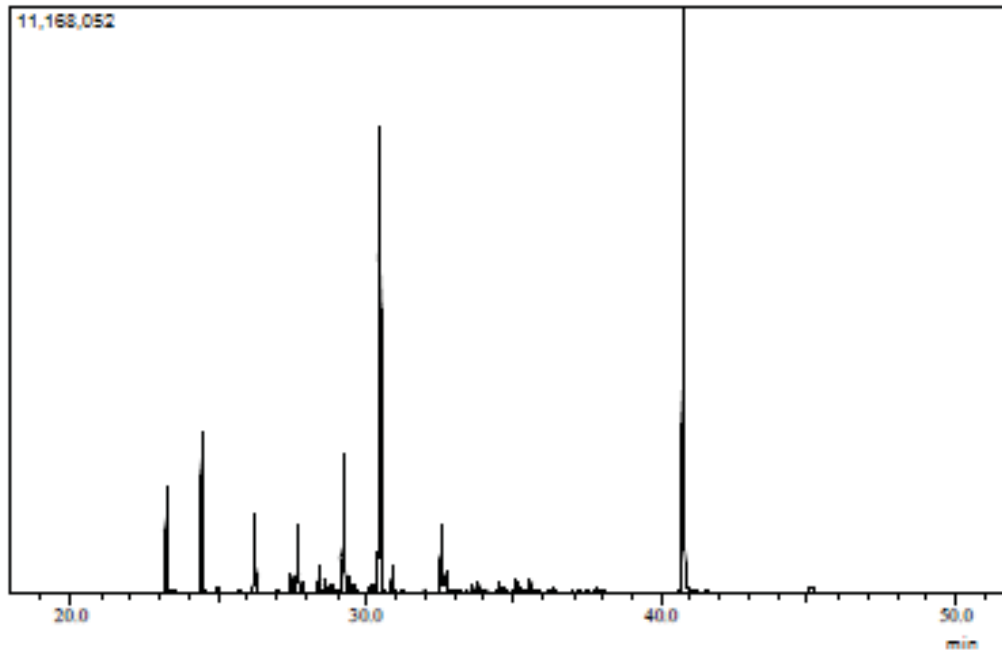
A justificativa para esses achados é decorrente dos fatores ambientais sobre as espécies vegetais tais como a localização geográfica, época da coleta, forma de cultivo, condições climáticas, idade do material vegetal, período e condições de armazenamento, o que pode interferir no rendimento e composição química de óleos essenciais (SIMÕES; SPITZER, 2004).

#### 4.3.2 Análise cromatográfica do óleo essencial

Representados nas (FIGURAS 12 e 13) se encontram os gráficos dos espectros, resultantes da análise por CG/EM da amostra do óleo essencial das folhas e galhos de *O. bicolor*. Os componentes químicos identificados incluindo seus

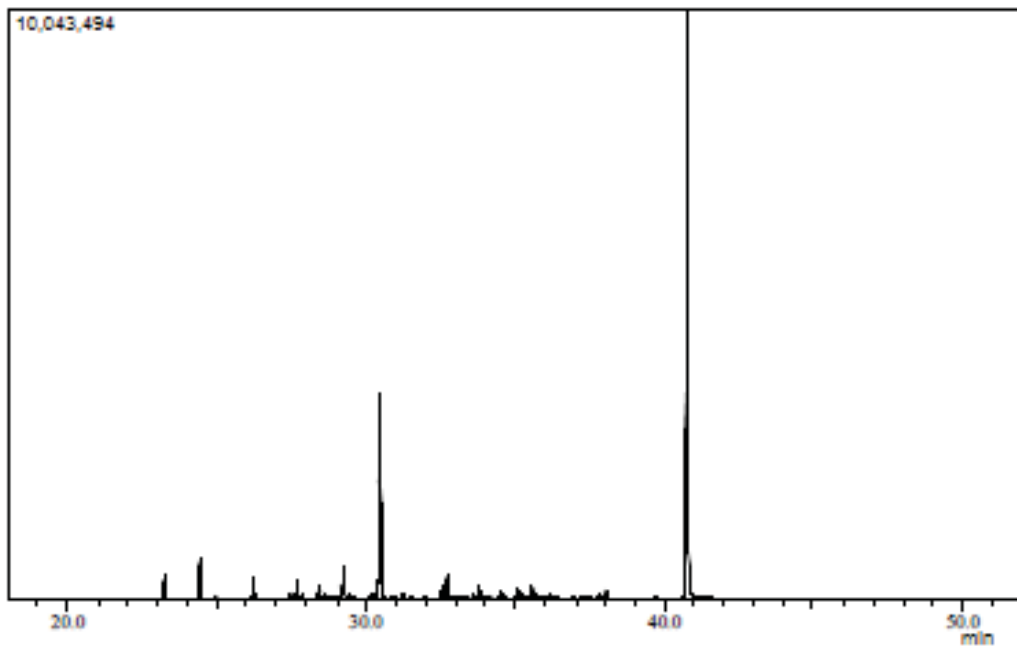
respectivos tempos de retenção, índices de retenção e porcentagens, estão sumarizados na (TABELA 8).

FIGURA 12 - CROMATOGRAFIA GASOSA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Ocotea bicolor*.



FONTE: A autora (2019)

FIGURA 13 - CROMATOGRAFIA GASOSA DO ÓLEO ESSENCIAL DOS GALHOS DE *Ocotea bicolor*.



FONTE: A autora (2019)

TABELA 8 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS E GALHOS DE *Ocotea bicolor*

(continua)

Grupos químicos	Compostos	Folhas				Galhos			
		TR	IRc	IRt	%	TR	IRc	IRt	%
Sesquiterpenos	$\alpha$ -Cubebeno	23,245	1343	1348	4,76	23,240	1343	1348	1,79
	<b><math>\alpha</math>-Copaeno</b>	24,445	1371	1374	<b>7,25</b>	24,440	1371	1374	<b>3,17</b>
	$\alpha$ -Gurjuneno	25,760	1401	1409	0,11				
	$\beta$ -Cubebeno	24,980	1383	1387	0,22	24,980	1383	1387	0,09
	(E)-Cariofileno	26,250	1413	1417	3,63	26,250	1413	1417	1,70
	$\beta$ -Copaeno	26,695	1424	1430	0,03	-	-	-	-
	$\alpha$ -Guaieno	27,020	1432	1437	0,08	-	-	-	-
	$\alpha$ -trans-Bergamoteno	-	-	-	-	26,910	1429	1432	0,09
	cis-Muurolo-3,5-dieno	27,490	1443	1448	0,84	27,490	1443	1448	0,43
	$\alpha$ -Humuleno	27,735	1449	1452	3,10	27,730	1449	1452	1,45
	allo-Aromadendreno	27,910	1453	1458	0,57	27,910	1453	1458	0,39
	Dauca-5,8-dieno	28,460	1467	1471	1,36	-	-	-	-
	$\gamma$ -Muurolo	28,585	1470	1478	0,62	-	-	-	-
	Germacreno D	28,795	1475	1480	0,47	-	-	-	-
	$\gamma$ -Himachaleno	28,865	1476	1477	0,31	-	-	-	-
	$\beta$ -Selineno	29,125	1483	1489	0,07	-	-	-	-
	trans-Cadina-1(6),4-dieno	-	-	-	-	28,455	1467	1475	1,10
	trans-Muurolo	-	-	-	-	28,580	1470	1478	0,44
	<b>trans- Muurolo-4(14),5-dieno</b>	29,22	1485	1493	<b>6,54</b>	29,215	1485	1493	<b>2,65</b>
	$\alpha$ -Bulneseno	29,665	1496	1509	0,08	-	-	-	-
$\alpha$ -Muurolo	29,560	1493	1500	0,45	29,555	1493	1500	0,36	
$\gamma$ -Cadineno	30,115	1507	1513	0,23	30,110	1507	1513	0,15	
$\delta$ -Cadineno	30,360	1513	1522	1,86					
trans - Cadina - 1,4 - dieno	-	-	-	-	30,885	1527	1533	0,31	
$\delta$ -Amorfenol	-	-	-	-	30,350	1513	1511	1,48	
<b>trans-Calameneno</b>	30,460	1516	1521	<b>23,56</b>	30,455	1516	1521	<b>17,53</b>	
trans-Cadina-1,4-dieno	30,880	1526	1533	1,41	30,885	1527	1533	0,31	
$\alpha$ -Calacoreno	31,200	1535	1544	0,18	31,195	1534	1544	0,64	
$\beta$ -Calacoreno	32,000	1555	1564	0,09	32,005	1555	1564	0,15	
Sesquiterpenos oxigenados	Óxido de Cariofileno	32,735	1574	1582	1,17	32,735	1574	1582	2,34
	Epóxido de Humuleno II	33,805	1601	1608	0,58	33,810	1601	1608	1,19
Álcoois Sesquiterpênicos	Globulol	32,900	1578	1590	0,14	-	-	-	-
	1,10-di-epi-Cubenol	34,540	1621	1627	0,53	33,965	1605	1618	0,19
	1-epi-cubenol	-	-	-	-	34,545	1621	1627	0,79
	Cubenol	35,140	1637	1645	0,33	35,100	1636	1645	1,28
	$\alpha$ -Muurolol	35,100	1636	1644	0,72	35,270	1640	1644	0,72

TABELA 8 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS E GALHOS DE *Ocotea bicolor*

(continuação)

Grupos químicos	Compostos	Folhas				Galhos			
		TR	IRc	IRt	%	TR	IRc	IRt	%
Álcoois Sesquiterpênicos	Eudesma-4(15),7-dien-1 $\beta$ -ol	-	-	-	-	36,835	1682	-	0,08
	5-hidroxi-cis-calameneno	37,770	1708	1713	0,22	37,770	1708	1713	0,30
	<b>5-hidroxicalameneno</b>	40,765	1792	-	<b>28,98</b>	40,765	1792	1801	<b>49,19</b>
	cis-Calamenen-10-ol	35,920	1658	1660	0,06	-	-	-	-
	epi-Cubebol	-	-	-	-	29,410	1490	1493	0,48
	Cubebol	30,195	1509	1514	0,38	30,195	1509	1514	0,44
	Espatulenol	32,555	1569	1577	3,22	32,555	1569	1577	1,15
	Ledol	33,615	1596	1602	0,39	33,615	1596	1602	0,48
Não identificados		23,505	1349	-	0,08	25,695	1400	-	0,06
		25,045	1385	-	0,04	25,755	1401	-	0,05
		28,985	1479	-	0,04	28,860	1476	-	0,21
		29,395	1489	-	1,01	28,975	1479	-	0,07
		32,655	1572	-	0,31	29,095	1482	-	0,13
		33,025	1581	-	0,19	29,670	1496	-	0,05
		33,060	1582	-	0,13	30,975	1529	-	0,18
		33,225	1586	-	0,11	31,510	1542	-	0,18
		33,405	1591	-	0,06	32,905	1578	-	0,12
		34,205	1612	-	0,03	33,025	1581	-	0,25
		33,975	1605	-	0,15	33,055	1582	-	0,23
		34,100	1609	-	0,07	33,210	1586	-	0,17
		34,715	1625	-	0,26	33,400	1591	-	0,16
		35,255	1640	-	0,37	34,095	1609	-	0,15
		35,465	1645	-	0,10	34,200	1612	-	0,07
		35,575	1648	-	0,79	34,700	1625	-	0,15
		35,675	1651	-	0,12	35,460	1645	-	0,15
		36,240	1666	-	0,15	35,575	1648	-	1,36
		36,380	1670	-	0,22	35,690	1651	-	0,45
		36,940	1685	-	0,07	35,915	1658	-	0,26
		37,185	1692	-	0,09	36,210	1665	-	0,55
		37,395	1697	-	0,06	36,380	1670	-	0,28
		37,490	1700	-	0,09	36,945	1685	-	0,05
		37,885	1711	-	0,12	37,190	1692	-	0,19
		38,040	1715	-	0,17	37,400	1697	-	0,11
		38,590	1731	-	0,04	37,495	1700	-	0,18
		39,700	1762	-	0,04	37,880	1711	-	0,16
		40,620	1788	-	0,12	38,040	1715	-	0,62
	41,565	1815	-	0,09	39,695	1762	-	0,11	
	45,100	1920	-	0,29	39,910	1768	-	0,07	
	48,565	2029	-	0,05	40,040	1772	-	0,09	

TABELA 8 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS E GALHOS DE *Ocotea bicolor*

						(conclusão)			
Grupos químicos	Compostos	Folhas				Galhos			
		TR	IRc	IRt	%	TR	IRc	IRt	%
Não identificados						40,620	1788	-	0,19
						41,570	1815	-	0,40
	Compostos Identificados (%)				<b>94,54</b>				<b>92,55</b>
	Compostos Não Identificados (%)				<b>5,46</b>				<b>7,45</b>
	Total (%)				<b>100</b>				<b>100</b>

FONTE: A autora (2019)

NOTA: TR= tempo de retenção (minutos), IRt = índice de retenção (Adams, 2017), IRc = índice de retenção calculado, %= porcentagem do componente.

A partir do óleo essencial das folhas foi possível identificar 94,54% dos componentes, sendo que a classe dos sesquiterpenos foram predominantes, perfazendo 58,83%, seguido de álcoois sesquiterpênicos (34,97%) e sesquiterpenos oxigenados (1,75%). No óleo essencial obtido dos galhos dos 92,55% identificados 55,10% pertence à classe dos álcoois sesquiterpênicos, 33,92% a sesquiterpenos e 3,53% a sesquiterpenos oxigenados.

Os constituintes químicos majoritários foram o álcool sesquiterpeno 5-hidroxicalameneno e os sesquiterpenos trans – calameneno,  $\alpha$ -Copaeno e trans-Muurola-4(14),5-dieno, tanto para o OE das folhas quanto para os galhos, diferindo apenas na quantidade expressa, conforme indicado na (FIGURA 14).

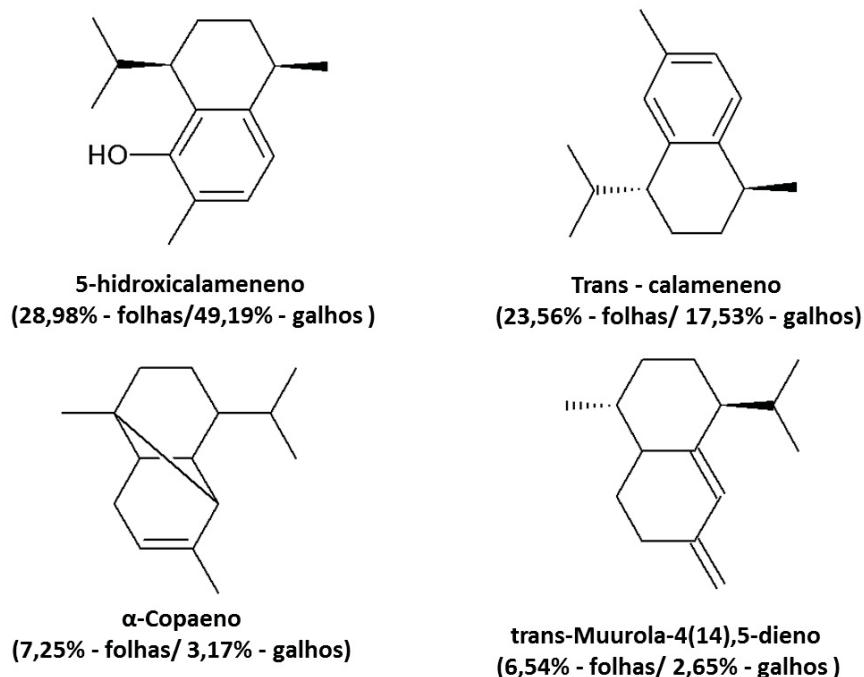
A predominância de sesquiterpenos está de acordo com o reportado na literatura para a família Lauraceae (CICCIÓ; CHAVERRI, 2008). Não foi encontrado na literatura referência do constituinte 5-hidroxicalameneno no gênero *Ocotea*, no entanto o 7-hidroxicalameneno está presente no óleo essencial de *O. elegans* e *O. corymbosa* (BATISTA et al., 2010). O trans-calameneno já foi identificado no OE de *O. quixos* (PINO et al., 2018) e em *O. indecora* (SILVA et al., 2019). O cis-calameneno também está presente em *O. auriculiformis* (RIGOBERT et al., 2017).

A composição química do óleo essencial de *O. bicolor* não apresentou os mesmos constituintes majoritários do estudo de Damasceno (2017), embora componentes calamenenos tenham apresentado uma porcentagem bem pequena. Diversos fatores podem influenciar a composição dos óleos essenciais, entre os quais estão época da coleta, forma de cultivo, condições climáticas, idade do material vegetal, período e condições de armazenamento, temperatura, irradiância,



fotoperíodo, regime de ventos e micronutrientes presentes no solo (BRUNETON, 2001; SIMÕES; SPITZER, 2004).

FIGURA 14 - COMPONENTES MAJORITÁRIOS DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS E GALHOS DE *Ocotea bicolor*



FONTE: A autora (2019)

Além desses fatores a existência de quimiotipos, ou raças químicas em uma mesma espécie, são muito frequentes em plantas aromáticas (THOMPSON et al., 2003). Nesse sentido, diversos estudos têm sido conduzidos na tentativa de estabelecer diferentes quimiotipos baseada na composição diferenciada do óleo essencial, sendo estes identificados por seu composto majoritário. Algumas espécies de Lauraceae apresentam quimiotipos relatados na literatura, como por exemplo a *Cinnamomum zeylanicum* com os seguintes quimiotipos identificados: eugenol (THOMAS; GREETHA; SHYLARA 1987), (E)-cinamaldeído (MÖLLENBECK et al., 1997), benzoato de metila (RAO; PAUL; DUTTA, 1988), linalol (JIROVETZ et al., 2001) e cânfora (SENANAYAKE; LEE; WILLS, 1978).

Os compostos majoritários 5-hidroxicalameneno e trans-calameneno derivam da mesma rota biossintética que o composto majoritário  $\delta$ -cadineno identificado no estudo de Damasceno (2017), tendo em comum o esqueleto cadinano como precursor (NAKASHIMA et al., 2002; RUIZ-REYES; SUAREZ, 2015).

O sesquiterpeno calameneno é um composto presente em uma série de óleos essenciais, sendo que suas formas oxigenadas apresentam uma ampla gama de atividades biológicas (SERRA; FUGANTI, 2005).

#### 4.4 COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS

A (TABELA 9) apresenta o teor de fenólicos totais encontrado no extrato e frações de *O. bicolor*. Os resultados foram expressos em mg de ácido gálico em g de amostra (mg EAG/g).

TABELA 9 - TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DE *Ocotea bicolor*

Amostra	mg EAG/g
FH	82,7±3,7 <sup>f</sup>
FC	241,2±10,3 <sup>d,e</sup>
FAE	1063,0±10,2 <sup>a</sup>
FR	410,3±11,8 <sup>c</sup>
FHS	127,3±19,0 <sup>e,f</sup>
FCS	285,4±1,0 <sup>c,d</sup>
FAES	836,9±6,0 <sup>b</sup>
FRS	842,2±6,4 <sup>b</sup>
EB	966,0±4,7 <sup>a,b</sup>

FONTE: A autora (2018)

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

\*Valores das médias das triplicatas ± desvio padrão relativo. Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ) entre si, pelo teste de Tukey.

A partir dos dados obtidos foi observado que a fração acetato de etila (FAE) apresentou o maior conteúdo de fenólicos totais, seguido do extrato bruto (EB) e das frações remanescente do sólido (FRS) e acetato de etila do sólido (FAES). No entanto, se levarmos em consideração a classificação proposta por Chew e colaboradores (2011) onde a quantidade de fenólicos totais das plantas é considerada alta quando maior que 50 mg EAG/g, média-alta: 30-50 mg EAG/g, médio baixa: 10-30 mg EAG/g e baixa: <10 mg EAG/g, todas as frações testadas apresentam alto conteúdo desses metabólitos.

No estudo com *O. lancifolia*, Silva et al. (2017b) também encontraram alto teor de compostos fenólicos, estimados pelo mesmo método, nas frações acetato de etila e butanólica com valores de 360,04 mg EAG/g e 405,09 mg EAG/g respectivamente.

Compostos fenólicos oriundos de plantas incluem fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados do ácido benzóico e cinâmico), cumarinas, flavonoides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas (NACZKA; SHAHIDIB, 2004).

#### 4.5 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

##### 4.5.1 Capacidade antioxidante total pelo método de redução do ferro - FRAP

Por meio da (TABELA 10) pode ser observado os resultados referentes ao teste da capacidade antioxidante realizado pela metodologia de FRAP.

TABELA 10 - CAPACIDADE ANTIOXIDANTE PELA REDUÇÃO DO FERRO (FRAP) DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DE *Ocotea bicolor*

Amostra	A.A. ( $\mu\text{M}$ sulfato ferroso/g).
Vit C	12469,9 $\pm$ 1,22 <sup>a</sup>
Rut	12038,1 $\pm$ 4,40 <sup>a</sup>
FH	490,1 $\pm$ 1,02 <sup>f</sup>
FC	2172,8 $\pm$ 1,00 <sup>e</sup>
FAE	8937,8 $\pm$ 1,90 <sup>b</sup>
FR	2392,8 $\pm$ 0,50 <sup>e</sup>
FHS	496,9 $\pm$ 0,37 <sup>f</sup>
FCS	574,6 $\pm$ 0,68 <sup>f</sup>
FAES	9490,8 $\pm$ 2,06 <sup>b</sup>
FRS	7853,6 $\pm$ 1,93 <sup>c</sup>
EB	5308,4 $\pm$ 1,36 <sup>d</sup>

FONTE: A autora (2018)

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

\*Valores das médias das triplicatas  $\pm$  desvio padrão relativo. Médias seguidas de letras

diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ) entre si, pelo teste de Tukey.

Ao analisar os resultados é possível verificar que a fração acetato de etila do sólido (FAES) foi a que apresentou melhor resultado (estatisticamente significativo) comparada aos padrões fitoquímicos Vitamina C e Rutina. A fração acetato de etila (FAE) e fração remanescente do sólido (FRS) também apresentaram significativo poder redutor de íons férricos. Todas essas frações têm em comum a presença de flavonoides evidenciada por meio de cromatografia de camada delgada no estudo de Damasceno (2017) e maior teor de compostos fenólico (TABELA 10). Cabe ressaltar a presença do flavonoide astilbina na FRS e FAES.

Nesse sentido, estudos evidenciam a correlação entre compostos fenólicos e flavonoides e o método FRAP, levando ao entendimento de que o conteúdo desses metabólitos é um fator importante na determinação da capacidade antioxidante por meio de redução do  $Fe^{3+}$  em  $Fe^{2+}$  (ZHENG; WANG, 2001; LUXIMON-RAMMA et al., 2002; OLSZEWSKA; MICHEL, 2009).

Resultado semelhante foi encontrado no estudo de Ogundajo, Adeniran, Ashafa (2018), onde o extrato acetato de etila de *O. bullata* apresentou o melhor poder redutor de íons férricos dentre os extratos testados.

#### 4.5.2 Capacidade antioxidante total pelo método ABTS

Os resultados obtidos pelo método ABTS para avaliação da capacidade antioxidante dos extratos e frações de *O. bicolor* estão sumarizados na (TABELA 11).

Por meio dos resultados, é possível perceber que nas amostras testadas os resultados que mais se aproximaram estatisticamente do padrão rutina foram as frações acetato de etila do sólido (FAES) e a fração remanescente do sólido (FRS), frações nas quais foi identificado o flavonoide astilbina. A Fração Acetato de Etila (FAE) também apresentou resultado significativo, seguido das outras frações, cuja capacidade antioxidante frente ao método testado, apresentou menor intensidade. A Fração Hexano do Sólido (FHS) foi a que mais se distanciou do padrão fitoquímico rutina.

TABELA 11 - CAPACIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO (ABTS) DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DE *Ocotea bicolor*

Amostra	A.A. ( $\mu\text{M Trolox/g}$ ).
Rut	3620,83 $\pm$ 3,75 <sup>a</sup>
FH	264,3 $\pm$ 1,27 <sup>d</sup>
FC	780,1 $\pm$ 6,34 <sup>c</sup>
FAE	2314,6 $\pm$ 8,49 <sup>b</sup>
FR	693,4 $\pm$ 0,50 <sup>c</sup>
FHS	86,9 $\pm$ 0,30 <sup>d</sup>
FCS	293,5 $\pm$ 15,8 <sup>d</sup>
FAES	3052,0 $\pm$ 1,66 <sup>a</sup>
FRS	2807,4 $\pm$ 0,22 <sup>a</sup>
EB	977,8 $\pm$ 0,59 <sup>c</sup>

FONTE: A autora (2018)

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

\*Valores das médias das triplicatas  $\pm$  desvio padrão relativo. Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ) entre si, pelo teste de Tukey.

Estudos com o mesmo gênero apresentaram resultados semelhantes. Em *O. paranaensis* a capacidade antioxidante por meio desse método na fração acetato de etila foi de 3440  $\mu\text{M Trolox/g}$  (GRIBNER et al., 2020b). E no estudo com *O. bullata*, o valor de  $\text{IC}_{50}$  para o extrato de acetato de etila foi menor do que o controle de ácido gálico (OGUNDAJO; ADENIRAN; ASHAF, 2018). Para *O. lancifolia* a fração acetato de etila também exibiu maior capacidade de eliminação ABTS dentre as amostras testadas (SILVA et al., 2017b).

#### 4.5.3 Capacidade antioxidante total pelo método ORAC

Os resultados obtidos nesse ensaio antioxidante encontram-se expresso na (TABELA 12).

TABELA 12 - CAPACIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO (ORAC) DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DE *Ocotea bicolor*

Amostra	A.A. ( $\mu\text{M Trolox/g}$ ).
FH	604,4 $\pm$ 10,5 <sup>d</sup>
FC	605,7 $\pm$ 7,1 <sup>d</sup>
FAE	825,8 $\pm$ 4,7 <sup>b</sup>
FR	299,4 $\pm$ 14,9 <sup>e</sup>
FHS	660,8 $\pm$ 8,0 <sup>d,c</sup>
FCS	194,5 $\pm$ 0,52 <sup>e</sup>
FAES	1134,8 $\pm$ 6,5 <sup>a</sup>
FRS	798,5 $\pm$ 1,6 <sup>c,b</sup>
EB	586,3 $\pm$ 12,2 <sup>d</sup>

FONTE: A autora (2019)

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

\*Valores das médias das triplicatas  $\pm$  desvio padrão relativo. Médias seguidas de letras

diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ) entre si, pelo teste de Tukey.

De modo semelhante ao ocorrido nos ensaios de FRAP e ABTS a fração acetato de etila do sólido (FAES) apresentou os melhores resultados. Abaixo desta, estão as frações acetato de etila (FAE) e fração remanescente do sólido (FRS) com resultados promissores. As demais frações apresentaram um menor poder antioxidante frente a esse teste, sendo que a fração clorofórmio do sólido foi a que apresentou o menor resultado.

Cabe destacar que a astilbina identificada nas frações acetato de etila do sólido (FAES) e fração remanescente do sólido (FRS) apresenta elevado poder antioxidante (PETACCI et al., 2010; XU et al., 2013).

Em um estudo de revisão sobre as atividades fisiológicas e farmacológicas da astilbina, dos artigos elencados, 2,70% reportaram propriedades antioxidantes. Alguns desses estudos avaliaram a capacidade antioxidante por meio de atividade sequestrante de radical DPPH, atividade sequestrante de cátion radical ABTS, atividade de eliminação no radical ânion superóxido e atividade antioxidante pelo método de co-oxidação do  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico. A atividade antioxidante da astilbina foi comparável à estabelecida por antioxidantes usados com frequência como Trolox, hidroxitolueno butilado (BHT) e hidroxianisol butilado (BHA). Nestes

estudos, também foi indicado que o mecanismo de ação antioxidante da astilbina é a eliminação das espécies reativas de oxigênio (ROS) de forma direta ou indireta. Diretamente, essa substância usa a via de transporte de elétrons para gerar sua ação antioxidante (SHARMA et al., 2020).

Dessa forma os resultados para essas frações podem estar relacionados diretamente com a presença dessa substância e com outros compostos fenólicos que estejam agindo em sinergismo.

Os estudos da aplicação desse ensaio antioxidante em espécies de *Ocotea* ainda são escassos. Pereira e colaboradores (2019), a semelhança do presente estudo, detectaram um melhor desempenho na fração acetato de etila de *O. notata* quando comparada as outras frações testadas.

#### 4.5.4 Correlação entre capacidade antioxidante e teor de compostos fenólicos

Na (TABELA 13) está expressa a correlação entre a capacidade antioxidante testada por diversos métodos e o teor de compostos fenólicos nas amostras testadas.

TABELA 13 - CORRELAÇÃO DE PEARSON ENTRE CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS (TPC) DO EXTRATO E FRAÇÕES DE *Ocotea bicolor*

(continua)

Amostra	ABTS	FRAP	ORAC	TPC
	$\mu\text{M Trolox/g}$	$\mu\text{M sulfato ferroso/g}$	$\mu\text{M Trolox/g}$	$\text{mg EAG/g}$
FH	$264,3 \pm 1,27^d$	$490,1 \pm 1,02^f$	$604,4 \pm 10,5^d$	$78,03 \pm 15,1^d$
	$r = 0,998$	$r = 0,995$	$r = 0,940$	-
FC	$780,1 \pm 6,34^c$	$2172,8 \pm 1,00^e$	$605,7 \pm 7,1^d$	$184,05 \pm 16,2^{c,d}$
	$r = 0,967$	$r = 0,976$	$r = 0,91$	-
FAE	$2314,6 \pm 8,49^b$	$8937,8 \pm 1,90^b$	$825,8 \pm 4,7^b$	$1109,9 \pm 10,0^a$
	$r = 0,961$	$r = 0,961$	$r = 0,930$	-
FR	$693,4 \pm 0,50^c$	$2392,8 \pm 0,50^e$	$299,4 \pm 14,9^e$	$265,7 \pm 32,1^c$
	$r = 0,887$	$r = 0,932$	$r = 0,990$	-
FHS	$86,9 \pm 0,30^d$	$496,9 \pm 0,37^f$	$660,8 \pm 8,0^{d,c}$	$139,0 \pm 5,87^d$
	$r = 0,990$	$r = 0,997$	$r = 0,98$	-

TABELA 13 - CORRELAÇÃO DE PEARSON ENTRE CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS (TPC) DO EXTRATO E FRAÇÕES DE *Ocotea bicolor*

Amostra	ABTS	FRAP	ORAC	(conclusão) TPC
	$\mu\text{M Trolox/g}$	$\mu\text{M sulfato ferroso/g}$	$\mu\text{M Trolox/g}$	$\text{mg EAG/g}$
FCS	293,5 $\pm$ 15,8 <sup>d</sup> r = 0,940	574,6 $\pm$ 0,68 <sup>f</sup> r = 0,955	194,5 $\pm$ 0,52 <sup>e</sup> r = 0,990	175,1 $\pm$ 42,5 <sup>c,d</sup> -
FAES	3052,0 $\pm$ 1,66 <sup>a</sup> r = 0,974	9490,8 $\pm$ 2,06 <sup>b</sup> r = 0,974	1134,8 $\pm$ 6,5 <sup>a</sup> r = 0,880	1144,8 $\pm$ 12,18 <sup>a</sup> -
FRS	2807,4 $\pm$ 0,22 <sup>a</sup> r = 0,934	7853,6 $\pm$ 1,93 <sup>e</sup> r = 0,955	798,5 $\pm$ 1,6 <sup>c,b</sup> r = 0,930	660,7 $\pm$ 9,94 <sup>b</sup> -
EB	977,8 $\pm$ 0,59 <sup>c</sup> r = 0,969	5308,4 $\pm$ 1,36 <sup>d</sup> r = 0,969	586,3 $\pm$ 12,2 <sup>d</sup> r = 1,00	731,1 $\pm$ 24,7 <sup>b</sup> -
RUT	3082,7 $\pm$ 9,23 <sup>a</sup>	12038,1 $\pm$ 4,40 <sup>a</sup>	N.a	N.a

FONTE: A autora (2020)

NOTA: fração hexano (FH), fração clorofórmio (FC), fração acetato de etila (FAE), fração remanescente (FR), fração hexano do sólido (FHS), fração clorofórmio do sólido (FCS), fração acetato de etila do sólido (FAES), fração remanescente do sólido (FRS), extrato bruto (EB), rutina (RUT); capacidade antioxidante por meio da redução do ferro (FRAP); capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC); 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico (ABTS); teor de compostos fenólicos (TPC).

\*Valores das médias das triplicatas  $\pm$  desvio padrão relativo. Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ) entre si, pelo teste de *Tukey*. r = Coeficiente de correlação de Pearson. N.a. = Não se aplica ou não foi realizado o teste.

Pelos resultados obtidos na correlação de Pearson e através da classificação proposta por Rowntree (1981) onde os coeficientes (r) são: muito fraco (0,0 – 0,2), fraco (0,2 – 0,4), moderado (0,4 – 0,7), forte (0,7 – 0,9) e muito forte (0,9 – 1,0), podemos verificar que há uma correlação positiva muito forte (maior que 0,9) entre a capacidade antioxidante e o teor de compostos fenólicos em praticamente todas as amostras e métodos analisados, com exceção da Fração Remanescente (FR) no ensaio de ABTS e na Fração Acetato de Etila do Sólido (FAES) no teste de ORAC, onde essa correlação positiva foi apenas forte (entre 0,7 e 0,9).

A correlação de Pearson é utilizada em várias áreas da pesquisa científica com o objetivo de medir associação linear entre variáveis quantitativas. Seu coeficiente varia entre -1 e 1. O valor indica a magnitude e o sinal aponta a direção da correlação (negativa ou positiva). Quanto mais perto de 1 mais forte será o nível de associação linear entre as variáveis. Quanto mais perto de zero, menor o nível de



associação. Dessa forma, uma correlação positiva indica que quando x aumenta, y também aumenta, ou seja, valores altos de x estão associados a valores altos de y (FIGUEIREDO FILHO et al., 2014).

De acordo com Dudonne et al. (2009), o teor de compostos fenólicos de extratos vegetais impacta fortemente sua capacidade antioxidante, o que vai ao encontro dos achados no presente estudo.

## 4.6 AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS

### 4.6.1 Atividade alelopática

#### 4.6.1.1 Teste de Germinação

A análise dos efeitos alelopáticos do extrato e frações de *O. bicolor* sobre a germinação de sementes de *Lactuca sativa* (alface) e *Allium cepa* (cebola) se encontram sumarizados na (TABELA 14). Foi observado uma interferência estatisticamente significativa no processo de germinação, quando as sementes de *L. sativa* estiveram em contato com a fração clorofórmio (FC) nas concentrações de 250 e 750 µg/mL e no índice de velocidade de germinação (IVG) nas concentrações de 250–1000 µg/mL. A fração hexano do sólido (FHS) interferiu em ambos os parâmetros analisados a 500 µg/mL.

TABELA 14 - EFEITO DO EXTRATO E FRAÇÕES DE *Ocotea bicolor* SOBRE A GERMINAÇÃO E O ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG) DE *Lactuca sativa* E *Allium cepa* (continua)

Amostra	Concentração da amostra (µg/mL)	<i>L. sativa</i>		<i>A. cepa</i>	
		Germinação	IVG	Germinação	IVG
EB	100	5,00±0,00 <sup>c</sup>	4,75±0,28 <sup>d</sup>	4,25±0,05 <sup>a</sup>	0,99±0,07 <sup>a</sup>
	250	4,75±0,50 <sup>c</sup>	4,75±0,28 <sup>d</sup>	5,00±0,00 <sup>a</sup>	1,08±0,05 <sup>a</sup>
	500	5,00±0,00 <sup>c</sup>	4,75±0,28 <sup>d</sup>	4,50±1,00 <sup>a</sup>	0,92±0,23 <sup>a</sup>
	750	5,00±0,00 <sup>c</sup>	4,87±0,25 <sup>d</sup>	4,00±1,41 <sup>a</sup>	<b>0,78±0,42<sup>b</sup></b>
	1000	4,88±0,25 <sup>c</sup>	4,87±0,25 <sup>d</sup>	4,75±0,50 <sup>a</sup>	0,91±0,17 <sup>a</sup>
FH	100	5,00±0,00 <sup>c</sup>	4,83±0,33 <sup>d</sup>	4,50±1,00 <sup>a</sup>	<b>0,86±0,26<sup>b</sup></b>
	250	5,00±0,00 <sup>c</sup>	4,70±0,34 <sup>d</sup>	4,00±1,41 <sup>a</sup>	<b>0,82±0,36<sup>b</sup></b>
	500	4,75±0,50 <sup>c</sup>	4,31±0,62 <sup>d</sup>	4,25±0,96 <sup>a</sup>	<b>0,73±0,36<sup>b</sup></b>
	750	5,00±0,00 <sup>c</sup>	4,43±0,51 <sup>d</sup>	5,00±0,00 <sup>a</sup>	<b>0,86±0,17<sup>b</sup></b>
	1000	4,75±0,50 <sup>c</sup>	4,37±0,62 <sup>d</sup>	4,25±0,96 <sup>a</sup>	<b>0,67±0,34<sup>b</sup></b>

TABELA 14 - EFEITO DO EXTRATO E FRAÇÕES DE *Ocotea bicolor* SOBRE A GERMINAÇÃO E O ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG) DE *Lactuca sativa* E *Allium cepa*

(continuação)

Amostra	Concentração da amostra (µg/mL)	<i>L. sativa</i>		<i>A. cepa</i>	
		Germinação	IVG	Germinação	IVG
FHS	100	5,00±0,00 <sup>c</sup>	5,00±0,00 <sup>d</sup>	5,00±0,00 <sup>a</sup>	1,08±0,17 <sup>a</sup>
	250	5,00±0,00 <sup>c</sup>	5,00±0,00 <sup>d</sup>	4,25±0,96 <sup>a</sup>	<b>0,66±0,30<sup>b</sup></b>
	500	<b>3,75±0,95<sup>a</sup></b>	<b>0,82±0,21<sup>a</sup></b>	4,75±0,50 <sup>a</sup>	<b>0,83±0,16<sup>b</sup></b>
	750	5,00±0,00 <sup>c</sup>	5,00±0,00 <sup>d</sup>	4,25±0,96 <sup>a</sup>	<b>0,79±0,18<sup>b</sup></b>
	1000	5,00±0,00 <sup>c</sup>	5,00±0,00 <sup>d</sup>	5,00±0,00 <sup>a</sup>	0,96±0,06 <sup>a</sup>
FC	100	5,00±0,00 <sup>c</sup>	5,00±0,00 <sup>d</sup>	4,75±0,50 <sup>a</sup>	1,05±0,23 <sup>a</sup>
	250	<b>3,50±1,29<sup>a</sup></b>	<b>0,68±0,21<sup>a</sup></b>	5,00±0,00 <sup>a</sup>	1,17±0,08 <sup>a</sup>
	500	5,00±0,00 <sup>c</sup>	<b>2,39±0,20<sup>c</sup></b>	5,00±0,00 <sup>a</sup>	0,95±0,21 <sup>a</sup>
	750	<b>4,25±1,50<sup>b</sup></b>	<b>1,54±0,67<sup>b</sup></b>	4,50±1,00 <sup>a</sup>	0,93±0,28 <sup>a</sup>
	1000	4,50±1,00 <sup>c</sup>	<b>1,22±0,29<sup>b</sup></b>	4,50±1,00 <sup>a</sup>	<b>0,84±0,27<sup>b</sup></b>
FCS	100	5,00±0,00 <sup>c</sup>	5,00±0,00 <sup>d</sup>	5,00±0,00 <sup>a</sup>	1,02±0,08 <sup>a</sup>
	250	5,00±0,00 <sup>c</sup>	4,87±0,25 <sup>d</sup>	4,75±0,50 <sup>a</sup>	<b>0,79±0,24<sup>b</sup></b>
	500	5,00±0,00 <sup>c</sup>	4,87±0,25 <sup>d</sup>	4,00±1,15 <sup>a</sup>	<b>0,67±0,18<sup>b</sup></b>
	750	5,00±0,00 <sup>c</sup>	5,00±0,00 <sup>d</sup>	5,00±0,00 <sup>a</sup>	<b>0,82±0,20<sup>b</sup></b>
	1000	5,00±0,00 <sup>c</sup>	4,87±0,25 <sup>d</sup>	5,00±0,00 <sup>a</sup>	1,12±0,12 <sup>a</sup>
FAE	100	5,00±0,00 <sup>c</sup>	4,87±0,25 <sup>d</sup>	4,50±1,00 <sup>a</sup>	1,05±0,24 <sup>a</sup>
	250	5,00±0,00 <sup>c</sup>	4,50±0,70 <sup>d</sup>	4,50±0,58 <sup>a</sup>	0,98±0,16 <sup>a</sup>
	500	4,75±0,50 <sup>c</sup>	4,62±0,48 <sup>d</sup>	4,50±0,58 <sup>a</sup>	0,91±0,22 <sup>a</sup>
	750	5,00±0,00 <sup>c</sup>	4,75±0,28 <sup>d</sup>	4,25±0,96 <sup>a</sup>	<b>0,75±0,36<sup>b</sup></b>
	1000	5,00±0,00 <sup>c</sup>	5,00±0,00 <sup>d</sup>	4,50±0,58 <sup>a</sup>	1,00±0,17 <sup>a</sup>
FAES	100	5,00±0,00 <sup>c</sup>	4,87±0,25 <sup>d</sup>	5,00±0,00 <sup>a</sup>	1,12±0,17 <sup>a</sup>
	250	5,00±0,00 <sup>c</sup>	5,00±0,00 <sup>d</sup>	4,00±1,15 <sup>a</sup>	<b>0,81±0,14<sup>b</sup></b>
	500	5,00±0,00 <sup>c</sup>	4,56±0,31 <sup>d</sup>	4,75±0,50 <sup>a</sup>	1,00±0,28 <sup>a</sup>
	750	5,00±0,00 <sup>c</sup>	4,75±0,28 <sup>d</sup>	5,00±0,00 <sup>a</sup>	1,20±0,16 <sup>a</sup>
	1000	4,75±0,50 <sup>c</sup>	4,62±0,48 <sup>d</sup>	4,75±0,50 <sup>a</sup>	0,95±0,13 <sup>a</sup>

TABELA 14 - EFEITO DO EXTRATO E FRAÇÕES DE *Ocotea bicolor* SOBRE A GERMINAÇÃO E O ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG) DE *Lactuca sativa* E *Allium cepa*

(conclusão)

Amostra	Concentração da amostra (µg/mL)	<i>L. sativa</i>		<i>A. cepa</i>	
		Germinação	IVG	Germinação	IVG
FR	100	5,00±0,00 <sup>c</sup>	5,00±0,00 <sup>d</sup>	5,00±0,00 <sup>a</sup>	1,04±0,29 <sup>a</sup>
	250	4,75±0,50 <sup>c</sup>	4,62±0,48 <sup>d</sup>	4,50±1,00 <sup>a</sup>	1,03±0,11 <sup>a</sup>
	500	5,00±0,00 <sup>c</sup>	4,87±0,25 <sup>d</sup>	5,00±0,00 <sup>a</sup>	1,02±0,11 <sup>a</sup>
	750	5,00±0,00 <sup>c</sup>	5,00±0,00 <sup>d</sup>	4,00±0,82 <sup>a</sup>	<b>0,79±0,15<sup>b</sup></b>
	1000	5,00±0,00 <sup>c</sup>	4,87±0,25 <sup>d</sup>	4,75±0,50 <sup>a</sup>	<b>0,89±0,29<sup>b</sup></b>
FRS	100	5,00±0,00 <sup>c</sup>	5,00±0,00 <sup>d</sup>	4,75±0,50 <sup>a</sup>	1,03±0,24 <sup>a</sup>
	250	5,00±0,00 <sup>c</sup>	4,52±0,33 <sup>d</sup>	4,75±0,50 <sup>a</sup>	<b>0,89±0,24<sup>b</sup></b>
	500	5,00±0,00 <sup>c</sup>	4,87±0,25 <sup>d</sup>	4,50±0,58 <sup>a</sup>	1,00±0,11 <sup>a</sup>
	750	5,00±0,00 <sup>c</sup>	4,87±0,25 <sup>d</sup>	4,00±1,15 <sup>a</sup>	0,91±0,31 <sup>a</sup>
	1000	5,00±0,00 <sup>c</sup>	4,87±0,25 <sup>d</sup>	3,50±0,58 <sup>a</sup>	<b>0,65±0,12<sup>b</sup></b>
CONTROLE ÁGUA	-	5,00±0,00 <sup>c</sup>	5,00±0,00 <sup>d</sup>	4,75±0,50 <sup>a</sup>	0,94±0,30 <sup>a</sup>
CONTROLE METANOL	-	5,00±0,00 <sup>c</sup>	5,00±0,00 <sup>d</sup>	4,75±0,50 <sup>a</sup>	1,02±0,20 <sup>a</sup>

FONTE: A autora (2019)

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

\*Valores das médias das quadruplicatas ± desvio padrão. Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ) entre si, pelo teste de *Scott-Knott*.

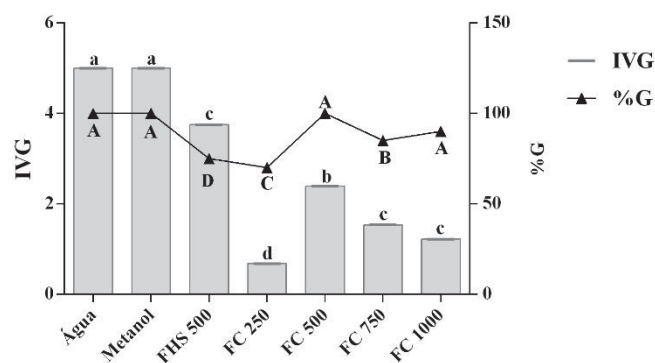
A capacidade de germinação na fração clorofórmio não foi afetada similarmente ao índice de velocidade de germinação. Foi observado nas mesmas concentrações, onde não ocorreu redução na germinação, um atraso no processo germinativo. Apesar da germinabilidade ser um índice muito utilizado em estudos alelopáticos, na maioria das vezes não demonstra um resultado expressivo. (UHLMANN; OLIVEIRA; SANTOS, 2018). Ainda, segundo Carvalho et al. (2015) a germinação é mais resistente à substâncias alelopáticas do que o crescimento das plântulas.

A concentração de 250 µg/mL dessa fração afetou a velocidade de germinação e inibiu a germinação com mais intensidade (até 30% de inibição)

quando comparada ao controle. O aumento da concentração dessa fração não acarretou aumento da inibição, portanto, não pode ser considerada como dose/dependente. Na fração hexano do sólido houve influência em ambos os parâmetros analisados na concentração de 500 µg/mL, com inibição de até 25% da capacidade de germinação em relação ao controle.

Quando testadas em sementes de *A. cepa* as frações não apresentaram nenhuma interferência no processo de germinação quando comparadas ao controle. Quanto ao índice de velocidade de germinação a fração hexano (FH) em todas as concentrações testadas; fração hexano do sólido (FHS) de 250-750 µg/mL; fração clorofórmio (FC) 1000 µg/mL; fração clorofórmio do sólido (FCS) 250-750 µg/mL; fração acetato de etila (FAE) 750 µg/mL; fração acetato de etila do sólido (FAES) 250 µg/mL; fração remanescente (FR) 750-1000 µg/mL; fração remanescente do sólido (FRS) 250 e 1000 µg/mL e extrato bruto na concentração de 750 µg/mL ocasionaram diminuição dessa velocidade comparadas ao controle. As demais frações e concentrações não interferiram nesse índice. Para melhor visualização dos dados desse experimento, as frações com diferença estatística dos controles foram expressas graficamente (FIGURAS 15 e 16), respectivamente para *L. sativa* e *A. cepa*.

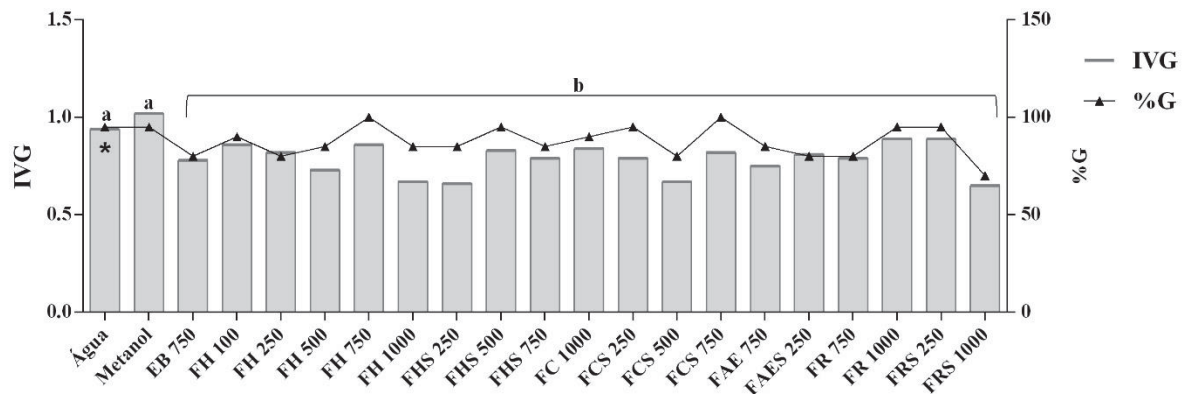
FIGURA 15 - GERMINAÇÃO E ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG) DE *Lactuca sativa* FRENTE A FRAÇÕES DE *Ocotea bicolor*.



FONTE: A autora (2019)

NOTA: fração hexano do sólido (FHS), fração clorofórmio (FC), \*Letras minúsculas diferentes representam diferença estatística a nível de 5% de significância para o IVG pelo teste de *Scott-Knott*. Letras maiúsculas diferentes representam diferença estatística a nível de 5% de significância para na germinação pelo teste de *Scott-Knott*.

FIGURA 16 - GERMINAÇÃO E ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG) DE *Alium cepa* FRENTE A FRAÇÕES DE *Ocotea bicolor*.



FONTE: A autora (2019)

NOTA: extrato bruto (EB), fração hexano (FH), fração clorofórmio (FC), fração acetato de etila (FAE), fração remanescente (FR), fração hexano do sólido (FHS), fração clorofórmio do sólido (FCS), fração acetato de etila do sólido (FAES), fração remanescente do sólido (FRS). \*Letras minúsculas diferentes representam diferença estatística a nível de 5% de significância para o IVG pelo teste de *Scott-Knott*. (\*) demonstra que não houve diferença estatística a nível de 5% de significância para a germinação pelo teste de *Scott-Knott*.

Diferente dos achados no presente estudo, Araujo (2012) ao testar os efeitos alelopáticos das frações de *O. pulchella* em *L. sativa*, observou em todas as frações testadas, exceto a fração hexânica, uma interferência na porcentagem final de germinação das sementes com valores de inibição superiores a 50%, em todas as concentrações ensaiadas, sendo que essas mesmas amostras não interferiram na velocidade de germinação de maneira significativa.

Outros estudos atestaram o potencial alelopático de espécies de *Ocotea*, como o de Prichoa e colaboradores (2013), utilizando extrato aquoso de *O. odorifera*, o qual evidenciou diminuição da porcentagem de germinação de sementes de alface em relação ao controle, mesmo na menor concentração testada (0,1%). Em pesquisa similar com a mesma espécie, também com extrato aquoso (folhas, raízes e caule) foi observada redução significativa da germinação de sementes de sorgo (CARMO; LIMA-BORGES; TAKAKI, 2007).

As mudanças no padrão de germinação são decorrentes das interações que ocorrem em níveis celulares e moleculares como: alterações na permeabilidade de membranas, transcrição e tradução do DNA, absorção de minerais, funcionamento de mensageiros secundários, respiração, conformação de enzimas e receptores entre outros (FERREIRA; ÁQUILA, 2000; MARASCHIN-SILVA; ÁQUILA, 2006).

## 4.6.1.2 Teste de Crescimento

Nessa análise foram calculadas as médias de crescimento (mm) da radícula e do hipocótilo de plântulas de *L. sativa* e *A. cepa* submetidas ao extrato e frações de *O. bicolor*. Os dados foram compilados e expressos na (TABELA 15), e para uma melhor visualização também foram expressos de forma gráfica nas (FIGURAS 17-20), onde as amostras que foram dispostas acima do eixo X demonstraram efeito estimulatório e as que se encontram abaixo desse eixo apresentaram efeito inibitório, quando comparadas ao grupo controle.

TABELA 15 - ENSAIO DE CRESCIMENTO DA RADÍCULA E HIPOCÓTILO DE *Lactuca sativa* E *Allium cepa* SUBMETIDAS AO EXTRATO E FRAÇÕES DE *Ocotea bicolor*

(continua)

Amostra	Concentração da amostra (µg/mL)	<i>L. sativa</i>		<i>A. cepa</i>	
		Radícula (mm)	Hipocótilo (mm)	Radícula (mm)	Hipocótilo (mm)
EB	100	30,45±9,33 <sup>f</sup>	18,74±5,08 <sup>d</sup>	11,16±9,16 <sup>a</sup>	24,94±20,90 <sup>a</sup>
	250	<b>33,91±10,38<sup>g</sup></b>	16,83±5,02 <sup>d</sup>	10,32±6,60 <sup>a</sup>	24,28±19,88 <sup>a</sup>
	500	<b>35,88±6,63<sup>g</sup></b>	23,50±5,58 <sup>e</sup>	10,17±6,89 <sup>a</sup>	29,99±14,61 <sup>b</sup>
	750	32,42±10,13 <sup>f</sup>	19,23±6,69 <sup>d</sup>	10,75±5,64 <sup>a</sup>	27,47±12,31 <sup>a</sup>
	1000	32,00±5,86 <sup>f</sup>	18,68±4,74 <sup>d</sup>	9,68±6,87 <sup>a</sup>	23,93±13,87 <sup>a</sup>
FH	100	18,47±6,10 <sup>c</sup>	21,30±5,70 <sup>e</sup>	20,05±16,23 <sup>c</sup>	40,97±21,44 <sup>c</sup>
	250	20,87±5,34 <sup>c</sup>	17,84±4,83 <sup>d</sup>	12,20±8,09 <sup>a</sup>	34,03±21,95 <sup>b</sup>
	500	17,05±6,52 <sup>b</sup>	17,99±5,15 <sup>d</sup>	8,67±5,86 <sup>a</sup>	28,07±18,38 <sup>a</sup>
	750	17,88±6,00 <sup>c</sup>	15,88±4,82 <sup>c</sup>	10,11±5,16 <sup>a</sup>	23,47±14,16 <sup>a</sup>
	1000	15,29±3,45 <sup>b</sup>	15,50±1,82 <sup>c</sup>	8,79±5,26 <sup>a</sup>	16,15±12,57 <sup>a</sup>
FHS	100	24,09±6,06 <sup>d</sup>	24,24±4,42 <sup>e</sup>	13,53±11,60 <sup>a</sup>	30,36±22,40 <sup>b</sup>
	250	23,78±10,62 <sup>d</sup>	25,85±9,93 <sup>e</sup>	14,60±9,48 <sup>b</sup>	28,81±19,16 <sup>b</sup>
	500	23,35±4,08 <sup>d</sup>	21,95±4,34 <sup>e</sup>	10,69±6,93 <sup>a</sup>	24,36±15,42 <sup>a</sup>
	750	24,01±2,86 <sup>d</sup>	20,14±4,21 <sup>e</sup>	7,98±5,54 <sup>a</sup>	21,02±13,88 <sup>a</sup>
	1000	16,79±6,97 <sup>b</sup>	12,85±5,44 <sup>c</sup>	6,31±4,13 <sup>a</sup>	15,67±9,99 <sup>a</sup>
FC	100	5,33±2,50 <sup>a</sup>	20,74±9,29 <sup>e</sup>	10,50±7,62 <sup>a</sup>	20,91±13,75 <sup>a</sup>
	250	3,71±2,98 <sup>a</sup>	13,21±6,77 <sup>c</sup>	8,10±5,40 <sup>a</sup>	20,18±12,90 <sup>a</sup>
	500	4,18±5,03 <sup>a</sup>	10,50±6,76 <sup>b</sup>	7,13±4,31 <sup>a</sup>	22,37±12,64 <sup>a</sup>
	750	1,01±1,67 <sup>a</sup>	3,42±6,04 <sup>a</sup>	5,80±4,93 <sup>a</sup>	18,03±15,20 <sup>a</sup>
	1000	0,97±2,67 <sup>a</sup>	1,23±3,42 <sup>a</sup>	6,33±4,23 <sup>a</sup>	12,45±11,39 <sup>a</sup>

TABELA 15 - ENSAIO DE CRESCIMENTO DA RADÍCULA E HIPOCÓTILO DE *Lactuca sativa* E *Allium cepa* SUBMETIDAS AO EXTRATO E FRAÇÕES DE *Ocotea bicolor*  
(continuação)

Amostra	Concentração da amostra (µg/mL)	<i>L. sativa</i>		<i>A. cepa</i>	
		Radícula (mm)	Hipocótilo (mm)	Radícula (mm)	Hipocótilo (mm)
FCS	100	18,09±3,35 <sup>c</sup>	20,61±4,05 <sup>e</sup>	10,40±6,30 <sup>a</sup>	22,78±15,46 <sup>a</sup>
	250	16,64±3,68 <sup>b</sup>	17,94±4,40 <sup>d</sup>	9,76±6,74 <sup>a</sup>	20,88±14,82 <sup>a</sup>
	500	15,09±4,45 <sup>b</sup>	21,58±4,79 <sup>e</sup>	8,44±5,54 <sup>a</sup>	22,23±14,69 <sup>a</sup>
	750	16,04±4,32 <sup>b</sup>	20,76±4,60 <sup>e</sup>	8,78±4,28 <sup>a</sup>	16,39±8,71 <sup>a</sup>
	1000	14,21±2,70 <sup>b</sup>	16,93±2,23 <sup>d</sup>	6,64±5,01 <sup>a</sup>	12,35±9,42 <sup>a</sup>
FAE	100	14,39±5,80 <sup>b</sup>	23,86±8,06 <sup>e</sup>	8,87±6,72 <sup>a</sup>	29,97±19,47 <sup>b</sup>
	250	13,86±7,50 <sup>b</sup>	22,87±4,01 <sup>e</sup>	8,04±6,96 <sup>a</sup>	27,13±21,80 <sup>a</sup>
	500	18,75±9,01 <sup>c</sup>	14,33±4,81 <sup>c</sup>	10,28±6,38 <sup>a</sup>	34,30±20,82 <sup>b</sup>
	750	23,58±7,70 <sup>d</sup>	8,99±4,45 <sup>b</sup>	12,62±4,17 <sup>a</sup>	41,79±13,75 <sup>c</sup>
	1000	19,27±7,34 <sup>c</sup>	6,51±3,52 <sup>b</sup>	11,51±7,79 <sup>a</sup>	31,78±17,34 <sup>b</sup>
FAES	100	20,25±10,41 <sup>c</sup>	9,59±3,82 <sup>b</sup>	12,23±7,50 <sup>a</sup>	32,88±17,37 <sup>b</sup>
	250	25,50±8,90 <sup>d</sup>	15,40±5,12 <sup>c</sup>	11,58±8,65 <sup>a</sup>	36,91±23,77 <sup>c</sup>
	500	<b>34,10±10,01<sup>g</sup></b>	16,54±6,06 <sup>d</sup>	11,74±7,44 <sup>a</sup>	30,35±20,56 <sup>b</sup>
	750	<b>36,51±8,24<sup>g</sup></b>	22,86±5,50 <sup>e</sup>	9,25±5,99 <sup>a</sup>	29,61±16,76 <sup>b</sup>
	1000	<b>36,56±8,92<sup>g</sup></b>	21,13±4,67 <sup>e</sup>	8,28±5,29 <sup>a</sup>	24,74±16,58 <sup>a</sup>
FR	100	28,29±8,67 <sup>e</sup>	30,31±8,06 <sup>f</sup>	10,12±6,74 <sup>a</sup>	25,98±12,33 <sup>a</sup>
	250	27,84±9,32 <sup>e</sup>	29,49±9,21 <sup>f</sup>	11,11±12,65 <sup>a</sup>	21,25±16,92 <sup>a</sup>
	500	32,38±10,55 <sup>f</sup>	<b>35,45±4,93<sup>g</sup></b>	10,87±5,99 <sup>a</sup>	28,13±12,13 <sup>a</sup>
	750	22,90±8,14 <sup>d</sup>	29,56±9,10 <sup>f</sup>	10,45±8,57 <sup>a</sup>	23,20±16,41 <sup>a</sup>
	1000	22,49±5,96 <sup>d</sup>	31,72±8,43 <sup>f</sup>	8,63±5,02 <sup>a</sup>	35,75±18,43 <sup>b</sup>
FRS	100	32,39±11,52 <sup>f</sup>	32,49±11,68 <sup>f</sup>	12,44±7,63 <sup>a</sup>	33,34±19,86 <sup>b</sup>
	250	28,17±11,13 <sup>e</sup>	14,43±6,53 <sup>c</sup>	10,94±6,20 <sup>a</sup>	39,29±17,99 <sup>c</sup>
	500	<b>35,07±10,38<sup>g</sup></b>	10,59±5,51 <sup>b</sup>	11,46±6,17 <sup>a</sup>	39,43±19,14 <sup>c</sup>
	750	<b>35,51±10,80<sup>g</sup></b>	11,00±5,29 <sup>b</sup>	13,98±7,30 <sup>b</sup>	35,11±18,38 <sup>b</sup>
	1000	32,29±10,93 <sup>f</sup>	15,52±5,18 <sup>c</sup>	8,74±5,38 <sup>a</sup>	25,54±15,61 <sup>a</sup>

TABELA 15 - ENSAIO DE CRESCIMENTO DA RADÍCULA E HIPOCÓTILO DE *Lactuca sativa* E *Allium cepa* SUBMETIDAS AO EXTRATO E FRAÇÕES DE *Ocotea bicolor*

(conclusão)

Amostra	Concentração da amostra (µg/mL)	<i>L. sativa</i>		<i>A. cepa</i>	
		Radícula (mm)	Hipocótilo (mm)	Radícula (mm)	Hipocótilo (mm)
CONTROLE ÁGUA	-	29,29±11,08 <sup>f</sup>	31,13±4,47 <sup>f</sup>	19,02±8,96 <sup>c</sup>	40,68±15,99 <sup>c</sup>
CONTROLE METANOL	-	29,52±4,00 <sup>f</sup>	30,05±5,31 <sup>f</sup>	19,91±11,56 <sup>c</sup>	47,97±23,57 <sup>c</sup>

FONTE: A autora (2019)

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

\*Valores das médias das quadruplicatas ± desvio padrão. Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ) entre si, pelo teste de *Scott-Knott*.

Ao comparar os resultados obtidos para o crescimento da radícula de *L. sativa* com o controle, foi observado um efeito estimulatório, estatisticamente significativo, nas concentrações de 250 e 500 µg/mL do extrato bruto (EB).

Na fração acetato de etila do sólido (FAES) esse efeito ocorreu nas concentrações de 500 µg/mL – 1000 µg/mL e na fração remanescente (FR) na concentração de 500 e 750 µg/mL. Nas demais frações houve inibição do crescimento em menor ou maior intensidade, com destaque para a fração clorofórmio (FC) onde ocorreu dose dependência e a maior porcentagem de inibição. Estatisticamente, essa fração foi a mais distante do controle.

Os resultados para o crescimento da radícula em sementes de *A. cepa* demonstram inibição em praticamente todas as frações testadas, com exceção para a fração hexano (FH) na menor concentração, a qual se assemelhou estatisticamente ao controle.

Foi observado no crescimento do hipocótilo de *L. sativa* a inibição frente a todos os extratos testados, exceto a concentração de 500 µg/mL da fração remanescente (FR), na qual ocorreu estímulo. A fração clorofórmio apresentou dose dependência na inibição, sendo esta mais expressiva nas maiores concentrações testadas.

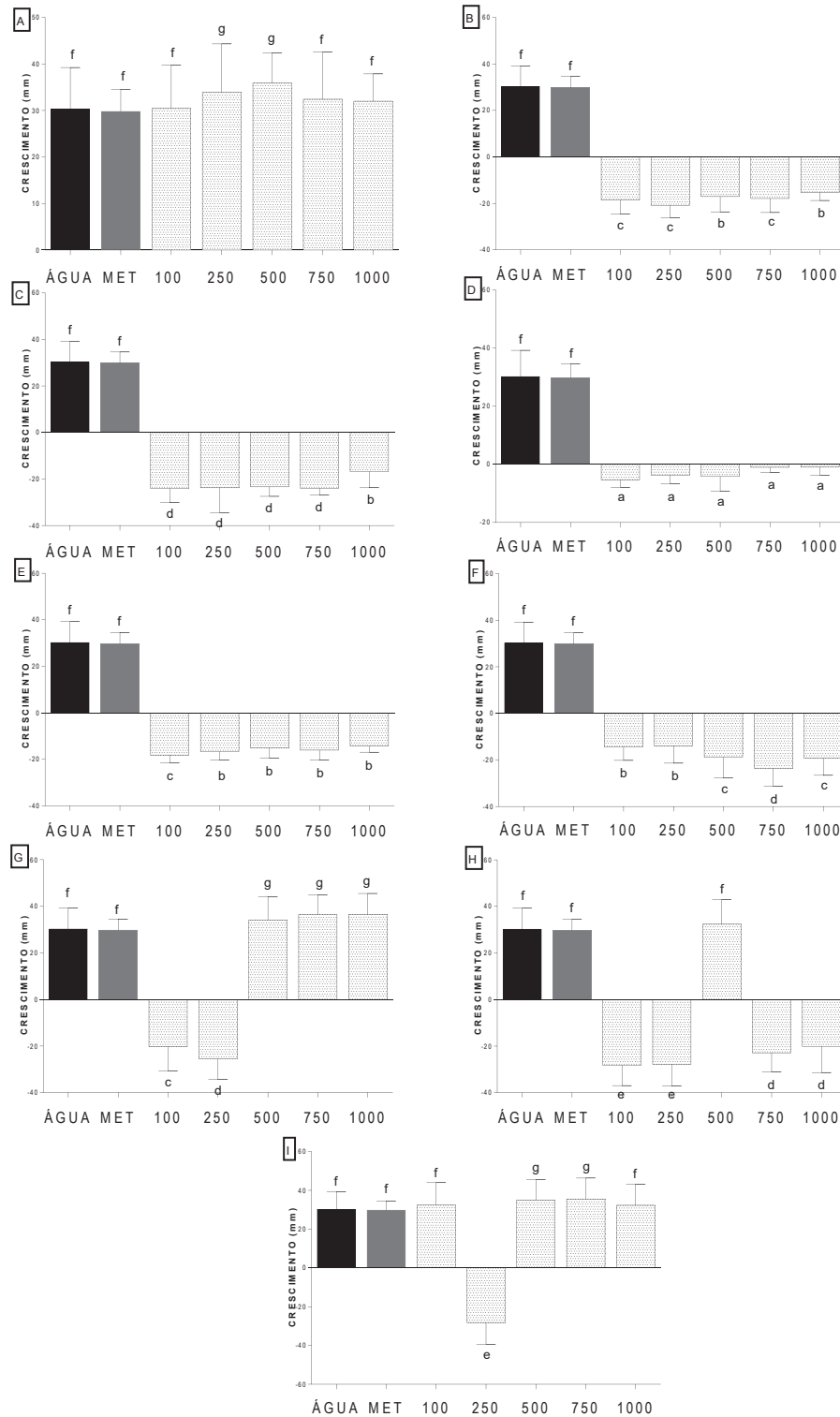
Em *A. cepa* somente as frações hexano (FH) 100 µg/mL, fração acetato de etila (FAE) 750 µg/mL, fração acetato de etila do sólido (FAES) 250 µg/mL e fração remanescente do sólido (FRS) 250 e 500 µg/mL se assemelharam estatisticamente



no crescimento do hipocótilo. O restante das frações provocou inibição e as frações hexanos (FH e FHS) apresentaram dose-dependência.

A ação inibitória do crescimento do hipocótilo, de forma mais acentuada em relação à inibição da radícula é um efeito pouco relatado na literatura. Vários autores afirmam uma maior interferência no sistema de crescimento radicular em relação ao hipocótilo, pois os tecidos da raiz são mais permeáveis a aleloquímicos. Aliado a isso, o maior contato deste órgão com a superfície onde foi depositada a amostra, pode alterar o crescimento inicial dos tecidos por interferir nas atividades metabólicas da raiz e divisão celular nas extremidades das mesmas (CRUZ-ORTEGA et al., 1998; CHUNG; AHN; YUN, 2001; NISHIDA et al., 2005).

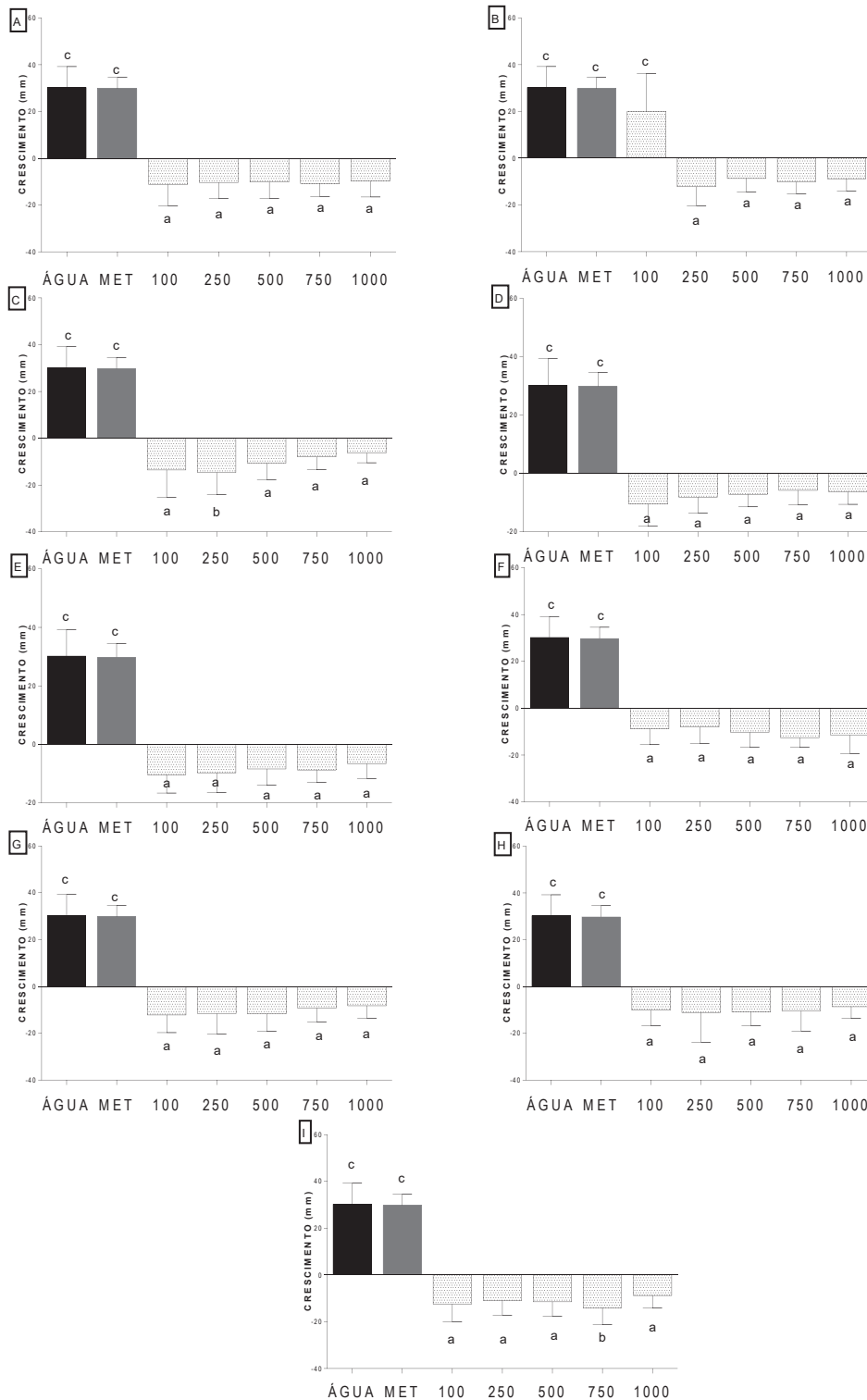
FIGURA 17 - ENSAIO DE CRESCIMENTO DA RADÍCULA DE *Lactuca sativa* SUBMETIDAS AO EXTRATO E FRAÇÕES DE *Ocotea bicolor*



FONTE: A autora (2019)

NOTA: A: extrato bruto (EB); B: fração hexano (FH); C: fração hexano do sólido (FHS); D: fração clorofórmio (FC); E: fração clorofórmio do sólido (FCS); F: fração acetato de etila (FAE); G: fração acetato de etila do sólido (FAES); H: fração remanescente (FR); I: fração remanescente do sólido (FRS); MET: metanol. \*Letras minúsculas diferentes representam diferença estatística a nível de 5% de significância pelo teste de *Scott-Knott*.

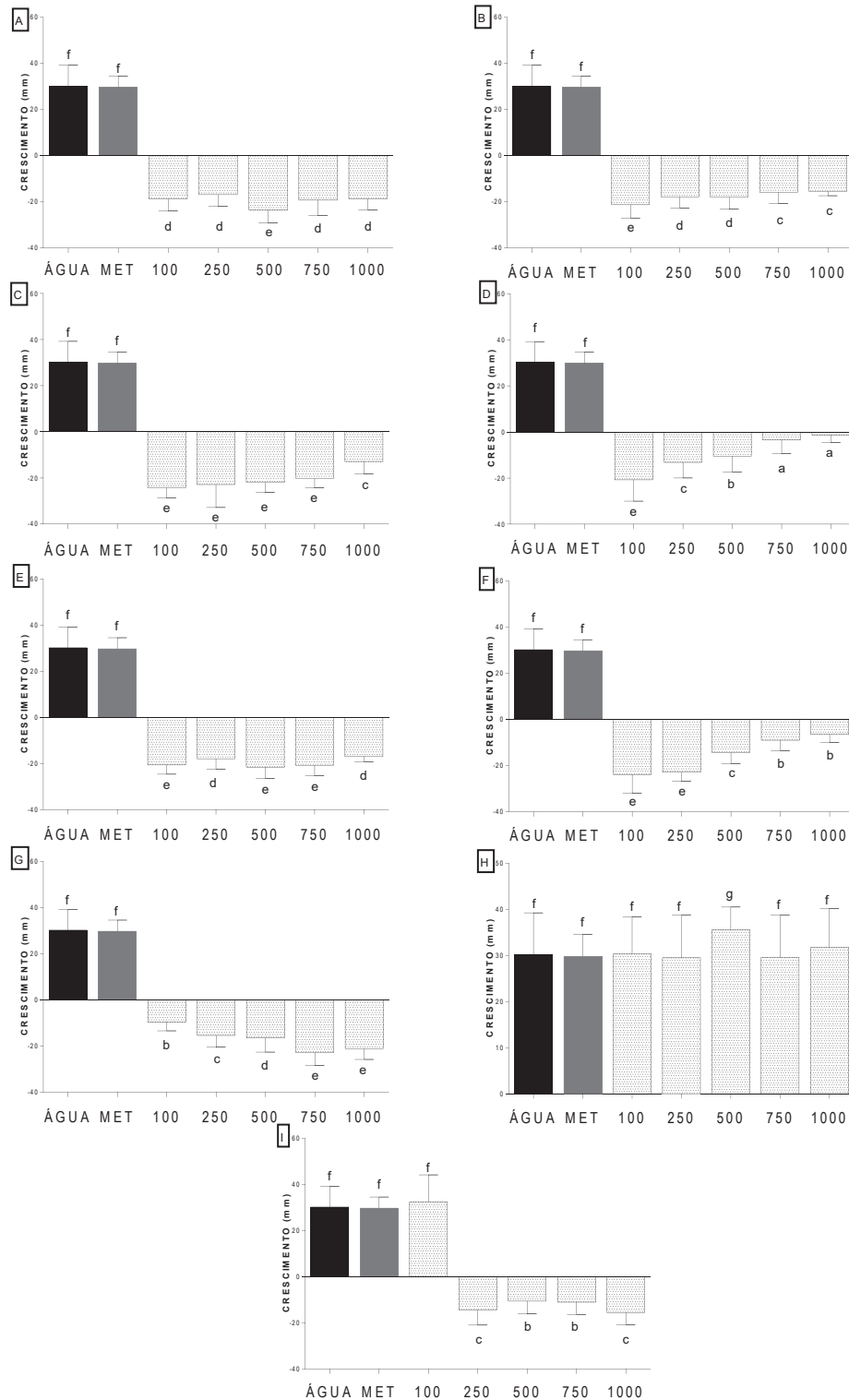
FIGURA 18 - ENSAIO DE CRESCIMENTO DA RADÍCULA DE *Allium cepa* SUBMETIDAS AO EXTRATO E FRAÇÕES DE *Ocotea bicolor*



FONTE: A autora (2019)

NOTA: A: extrato bruto (EB); B: fração hexano (FH); C: fração hexano do sólido (FHS); D: fração clorofórmio (FC); E: fração clorofórmio do sólido (FCS); F: fração acetato de etila (FAE); G: fração acetato de etila do sólido (FAES); H: fração remanescente (FR); I: fração remanescente do sólido (FRS); MET: metanol. \*Letras minúsculas diferentes representam diferença estatística a nível de 5% de significância pelo teste de *Scott-Knott*.

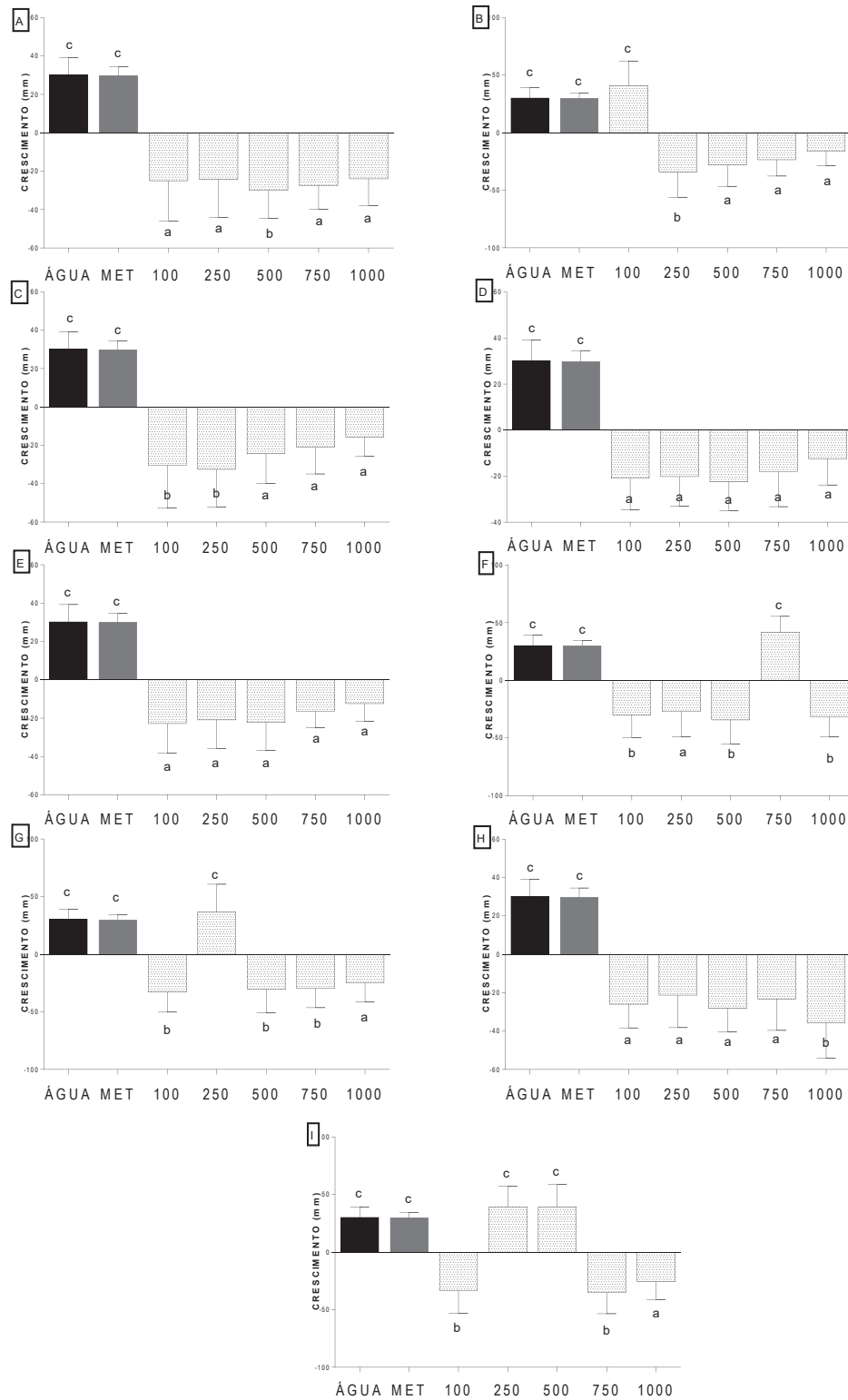
FIGURA 19 - ENSAIO DE CRESCIMENTO DO HIPOCÓTILO DE *Lactuca sativa* SUBMETIDAS AO EXTRATO E FRAÇÕES DE *Ocotea bicolor*



FONTE: A autora (2019)

NOTA: A: extrato bruto (EB); B: fração hexano (FH); C: fração hexano do sólido (FHS); D: fração clorofórmio (FC); E: fração clorofórmio do sólido (FCS); F: fração acetato de etila (FAE); G: fração acetato de etila do sólido (FAES); H: fração remanescente (FR); I: fração remanescente do sólido (FRS); MET: metanol. \*Letras minúsculas diferentes representam diferença estatística a nível de 5% de significância pelo teste de *Scott-Knott*.

FIGURA 20 - ENSAIO DE CRESCIMENTO DO HIPOCÓTILO DE *Allium cepa* SUBMETIDAS AO EXTRATO E FRAÇÕES DE *Ocotea bicolor*



FONTE: A autora (2019)

NOTA: A: extrato bruto (EB); B: fração hexano (FH); C: fração hexano do sólido (FHS); D: fração clorofórmio (FC); E: fração clorofórmio do sólido (FCS); F: fração acetato de etila (FAE); G: fração acetato de etila do sólido (FAES); H: fração remanescente (FR); I: fração remanescente do sólido (FRS); MET: metanol. \*Letras minúsculas diferentes representam diferença estatística a nível de 5% de significância pelo teste de *Scott-Knott*.

## 4.6.2 Avaliação da atividade hemolítica

A atividade hemolítica reflete a capacidade dos extratos e frações de *O. bicolor* de promover a lise de células sanguíneas. Os resultados dessa atividade estão expressos na (TABELA 16) e evidenciado por meio da (FIGURA 21).

TABELA 16 - ENSAIO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE *Ocotea bicolor*

(continua)

Amostra	Concentração da amostra ( $\mu\text{g/mL}$ )	% de Hemólise
EB	100	1,497 $\pm$ 0,327 <sup>b</sup>
	250	2,012 $\pm$ 0,047 <sup>c</sup>
	500	3,041 $\pm$ 0,000 <sup>c</sup>
	750	3,493 $\pm$ 0,054 <sup>c</sup>
	1000	5,380 $\pm$ 0,846 <sup>e</sup>
FH	100	5,281 $\pm$ 0,773 <sup>e</sup>
	250	5,188 $\pm$ 0,822 <sup>e</sup>
	500	4,881 $\pm$ 0,941 <sup>e</sup>
	750	4,308 $\pm$ 0,879 <sup>d</sup>
	1000	4,214 $\pm$ 0,284 <sup>d</sup>
FHS	100	1,987 $\pm$ 0,162 <sup>c</sup>
	250	1,427 $\pm$ 0,122 <sup>b</sup>
	500	1,147 $\pm$ 0,516 <sup>b</sup>
	750	0,453 $\pm$ 0,234 <sup>a</sup>
	1000	0,427 $\pm$ 0,705 <sup>a</sup>
FC	100	0,440 $\pm$ 0,223 <sup>a</sup>
	250	0,520 $\pm$ 0,212 <sup>a</sup>
	500	0,707 $\pm$ 0,321 <sup>a</sup>
	750	0,827 $\pm$ 0,469 <sup>a</sup>
	1000	2,334 $\pm$ 0,510 <sup>c</sup>
FCS	100	0,773 $\pm$ 0,162 <sup>a</sup>
	250	1,387 $\pm$ 0,411 <sup>b</sup>
	500	1,387 $\pm$ 0,266 <sup>b</sup>
	750	1,414 $\pm$ 0,311 <sup>b</sup>
	1000	1,454 $\pm$ 0,284 <sup>b</sup>
FAE	100	1,279 $\pm$ 0,216 <sup>b</sup>
	250	1,528 $\pm$ 0,097 <sup>b</sup>
	500	1,731 $\pm$ 0,124 <sup>b</sup>
	750	2,027 $\pm$ 0,054 <sup>c</sup>
	1000	2,963 $\pm$ 0,258 <sup>c</sup>
FAES	100	3,707 $\pm$ 0,101 <sup>d</sup>
	250	4,241 $\pm$ 0,454 <sup>d</sup>
	500	4,308 $\pm$ 0,824 <sup>d</sup>
	750	4,348 $\pm$ 0,046 <sup>d</sup>
	1000	4,388 $\pm$ 0,257 <sup>d</sup>

TABELA 16– ENSAIO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE *O. bicolor*

(conclusão)		
Amostra	Amostra	Amostra
FR	100	3,057±0,929 <sup>c</sup>
	250	2,698±0,135 <sup>c</sup>
	500	2,635±0,258 <sup>c</sup>
	750	2,464±0,704 <sup>c</sup>
	1000	2,292±0,000 <sup>c</sup>
FRS	100	2,620±0,162 <sup>c</sup>
	250	2,807±0,353 <sup>c</sup>
	500	3,025±0,378 <sup>c</sup>
	750	3,072±0,656 <sup>c</sup>
	1000	3,181±0,597 <sup>c</sup>
SAP	100	8,802±0,204 <sup>g</sup>
	250	20,490±0,8895 <sup>h</sup>
	500	50,793±1,079 <sup>i</sup>
	750	77,922±2,5488 <sup>j</sup>
	1000	95,093±0,889 <sup>k</sup>
CONTROLE TRITON	-	100 <sup>k</sup>
CONTROLE PBS	-	7,641±0,270 <sup>f</sup>
CONTROLE METANOL	-	6,803±0,521 <sup>f</sup>

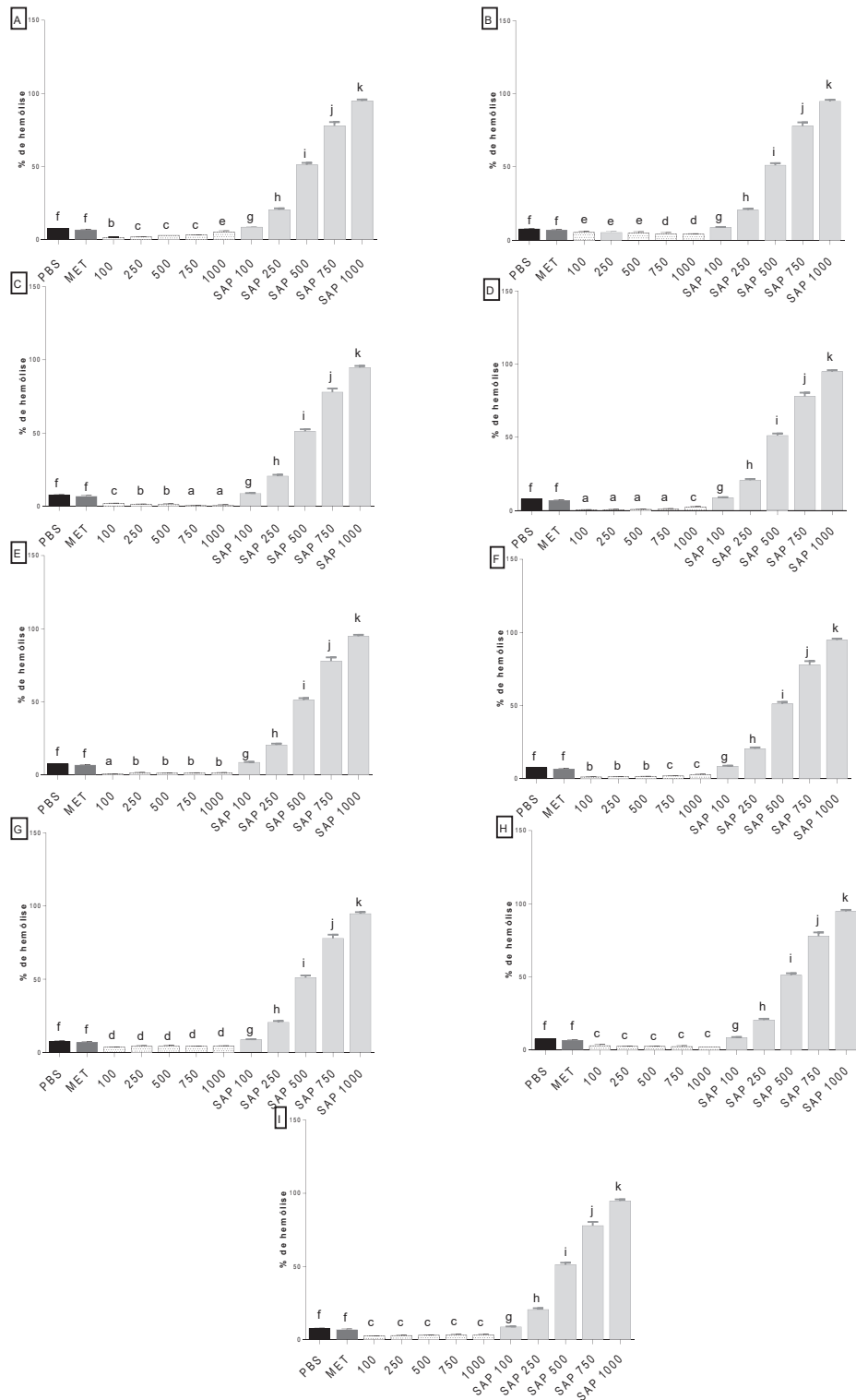
FONTE: A autora (2019)

NOTA: extrato bruto (EB), fração hexano (FH), fração clorofórmio (FC), fração acetato de etila (FAE), fração remanescente (FR), fração hexano do sólido (FHS), fração clorofórmio do sólido (FCS), fração acetato de etila do sólido (FAES), fração remanescente do sólido (FRS), SAP: Controle positivo Saponina, PBS: Controle Tampão Fosfato.

\*Valores das médias ± desvio padrão. Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ) entre si, pelo teste de *Scott-Knott*.

Os resultados obtidos permitem verificar que a taxa de hemólise ocasionada pelos extratos e frações de *O. bicolor* não ultrapassou os 5% quando comparada ao Triton 0,1% considerado como 100% de hemólise. Na maioria das amostras houve uma resposta dose dependente, no entanto, nas frações hexanos (FH e FHS) e fração remanescente (FR) ocorreu o contrário, onde as concentrações maiores apresentaram menor porcentagem de hemólise. Dentre as amostras testadas as frações hexano (FH) e fração acetato de etila do sólido (FAES) apresentaram maior atividade hemolítica. As menores taxas, próximas de 0%, resultaram da fração clorofórmio (FC).

FIGURA 21 - COMPARAÇÃO DA PORCENTAGEM DE HEMÓLISE DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE *Ocotea bicolor* COM O CONTROLE POSITIVO



FONTE: A autora (2019)

NOTA: PBS: Controle Tampão Fosfato; MET: Controle metanol; A: extrato bruto (EB); B: fração hexano (FH); C: fração hexano do sólido (FHS); D: fração clorofórmio (FC); E: fração clorofórmio do sólido (FCS); F: fração acetato de etila (FAE); G: fração acetato de etila do sólido (FAES); H: fração remanescente (FR); I: fração remanescente do sólido (FRS); SAP: Controle positivo Saponina.



Todas as frações demonstraram capacidade hemolítica, estatisticamente inferior aos controles negativos (PBS e Metanol). Apesar do mecanismo de ação da capacidade hemolítica não ser um dos objetivos do presente estudo, podemos inferir que a baixa capacidade hemolítica do extrato e frações testadas, pode estar relacionada a presença de substâncias atuantes como antioxidantes naturais, prevenindo o rompimento de eritrócitos.

De acordo com Ahmed e colaboradores (2019) a presença de antioxidantes em extratos vegetais, como os compostos fenólicos e flavonoides, pode prevenir a hemólise nos eritrócitos pelo fato de estabilizarem a membrana eritrocítica e capturarem os radicais livres.

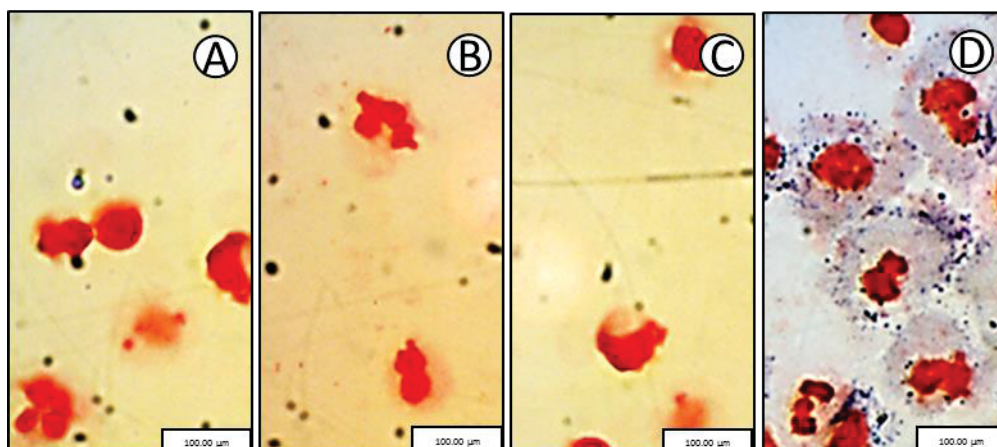
Na literatura, os relatos sobre atividade hemolítica do gênero *Ocotea* são escassos. Rodrigues e colaboradores (2019) ao analisarem os efeitos do extrato etanólico de cascas e folhas de *O. minarum* em eritrócitos humanos após 4 h de incubação perceberam indução de hemólise em concentrações maiores que 25 µg/mL no extrato etanólico de casca e maiores que 100 µg/mL no extrato etanólico de folha. Nas maiores concentrações testadas (100 e 125 µg/mL) houve altas taxas de hemólise.

#### 4.6.3 Avaliação do ensaio de NBT sobre neutrófilos humanos

Ao contrário do controle positivo PMA, a astilbina não foi capaz de ativar os neutrófilos na concentração de 10 µg/mL, fato evidenciado pela não formação dos depósitos de formazan, como pode ser visualizado na (FIGURA 22).

Alguns estudos têm apontado o efeito imunossupressor da astilbina, o que pode ser uma ferramenta útil em transplantes de órgãos, com menores efeitos adversos (ZHAO et al., 2009). Essa substância também causa supressão do desenvolvimento e funcionamento das células dendríticas que desempenham uma função fundamental no início do resposta imune (ZOU et al., 2010). No estudo de Zheng e colaboradores (2013) a astilbina inibiu a adesão e migração de macrófagos de células endoteliais da veia umbilical humana.

FIGURA 22 - ATIVAÇÃO QUALITATIVA DE NEUTRÓFILOS HUMANOS



FONTE: A autora (2021)

NOTA: A: Não ativação de neutrófilos humanos pela astilbina; B: Neutrófilos humanos normais; C: Neutrófilos humanos em NBT; D: Ativação de neutrófilos humanos pelo PMA.

#### 4.6.4 Avaliação da atividade larvicida sobre *Aedes aegypti* (CULICIDAE)

A escolha do óleo essencial de *O. bicolor* para a realização dessa técnica, recaiu no resultado promissor ( $CL_{50}$  de  $40\mu\text{g/mL}$ ) em estudo preliminar de toxicidade em *Artemia salina* (DAMASCENO, 2017). Os resultados obtidos encontram-se sumarizados na (TABELA 17).

TABELA 17 - CONCENTRAÇÃO-RESPOSTA DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS E GALHOS DE *Ocotea bicolor* EM LARVAS DE *Aedes aegypti* DE 4º ESTÁGIO LARVAL APÓS 24H DE EXPOSIÇÃO

Amostra	N	Inclinação da reta	$CL_{50}$ (IC95) $\mu\text{g/mL}$	$CL_{95}$ (IC95) $\mu\text{g/mL}$	$X^2$	GL	p-value
OE folhas	360	$5,5 \pm 0,75$	23,88 (22,33;25,67)	39,41 (34,58;49,2)	35,56	4	0,99
OE galhos	420	$6,4 \pm 0,74$	18,5 (17,14;19,8)	33,22 (29,61;39,14)	9,18	5	0,89

FONTE: A autora (2019)

NOTA: OE: óleo essencial, N: número de larvas avaliadas,  $CL_{50}$ : concentração capaz de matar 50% dos organismos expostos ao tratamento,  $CL_{95}$ : concentração capaz de matar 95% dos organismos expostos ao tratamento, IC: intervalo de confiança,  $X^2$ : Qui-quadrado, GL: graus de liberdade.

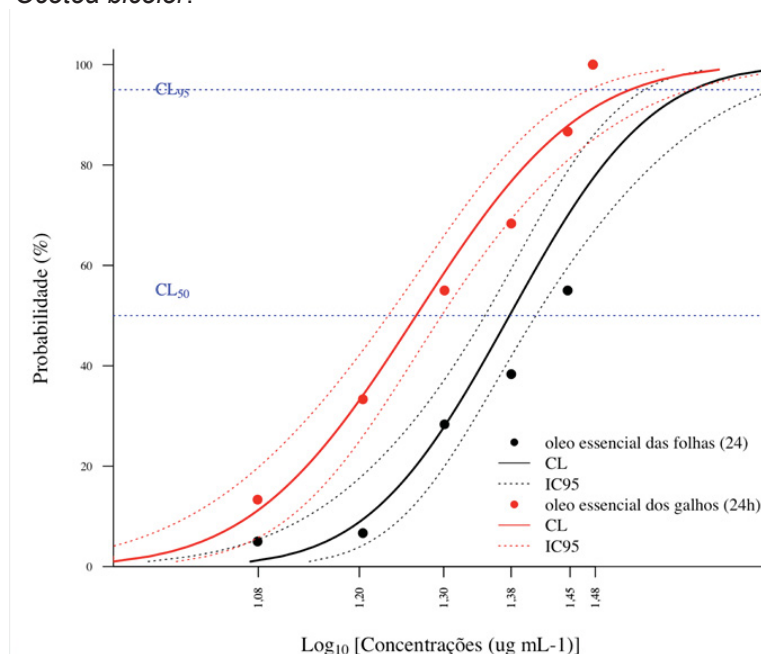
Não foi encontrada uma faixa de concentração padrão para a determinação da eficiência da atividade larvicida de produtos naturais pela OMS, dessa forma considerou-se o padrão proposto por Komalamisra et al. (2005), onde:  $CL_{50} < 50 \mu\text{g/mL}$ : altamente ativo;  $CL_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$ : moderadamente ativo;  $CL_{50} < 750 \mu\text{g/mL}$ :

efetivo;  $CL_{50} > 750 \mu\text{g/mL}$ : inativo. Dessa forma, por meio dos resultados obtidos, o OE de folhas e galhos de *O. bicolor* foram altamente ativos, por apresentarem  $CL_{50}$  bem abaixo da concentração de  $50 \mu\text{g/mL}$ .

Embora os resultados expressos na (TABELA 18) apresentem uma resposta mais efetiva do óleo essencial dos galhos (OEG) sobre as larvas de *Aedes aegypti*, o coeficiente de inclinação da reta do OE galhos foi apenas 1,1 maior que o coeficiente observado no óleo essencial das folhas (OEF). Isto indica uma resposta de mortalidade mais rápida apenas em pequenas variações das concentrações do OEG, se comparado com o OEF.

Podemos verificar a semelhança entre as inclinações das curvas pela (FIGURA 23), onde o intervalo superior da  $CL_{95}$  do OEF se sobrepõe ao intervalo inferior da  $CL_{95}$  do OEG. Essa sobreposição está melhor evidenciado na (FIGURA 24) onde os intervalos de confiança nas  $CL_{95}$  foram expressos de forma gráfica. Dessa forma, estatisticamente, ambas amostras testadas apresentam similar efetividade.

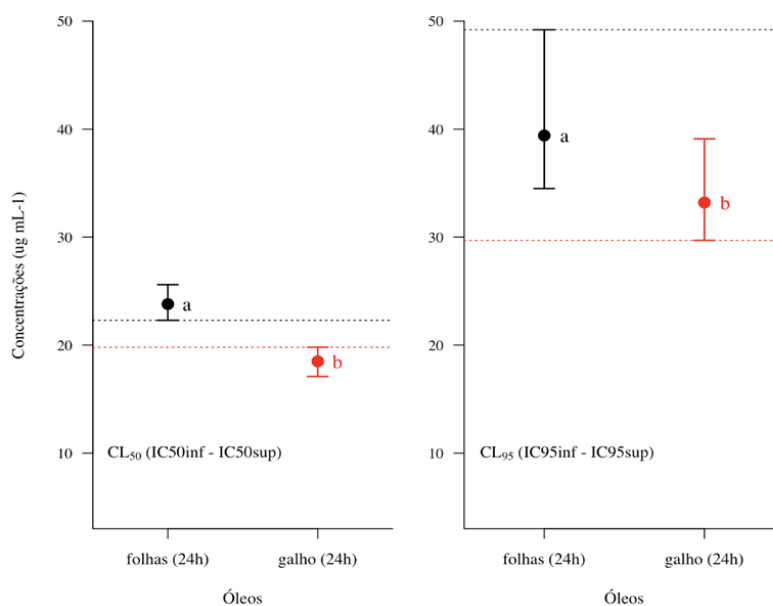
FIGURA 23 - CURVAS DE CONCENTRAÇÃO-MORTALIDADE DAS LARVAS DE *Aedes aegypti* EXPOSTAS DURANTE 24H AO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS E GALHOS DE *Ocotea bicolor*.



FONTE: A autora (2020)

NOTA:  $CL_{50}$ : concentração capaz de matar 50% dos organismos expostos ao tratamento,  $CL_{95}$ : concentração capaz de matar 95% dos organismos expostos ao tratamento, IC: intervalo de confiança.

FIGURA 24 - COMPARAÇÃO DA CL<sub>50</sub> E CL<sub>95</sub> CONSIDERANDO OS INTERVALOS DE CONFIANÇA, MOSTRANDO A PRESENÇA DE SOBREPOSIÇÃO DOS INTERVALOS DE CONFIANÇA NAS CL<sub>95</sub>.



FONTE: A autora (2020)

NOTA: CL<sub>50</sub>: concentração capaz de matar 50% dos organismos expostos ao tratamento, CL<sub>95</sub>: concentração capaz de matar 95% dos organismos expostos ao tratamento, IC: intervalo de confiança.

Óleos essenciais oriundos das plantas são tipicamente constituídos por um complexo de compostos químicos agindo isoladamente, aditivamente ou concomitantemente por meio de múltiplos mecanismos de ação. Esse pode ser um fator preponderante para o baixo desenvolvimento de resistência à óleos essenciais (SIMAS et al., 2004; THANIGAIVEL et al., 2019).

Os terpenos estão entre os compostos com maior atividade larvicida. Os óleos essenciais com maior teor de hidrocarbonetos sesquiterpênicos, sesquiterpenos oxigenados e hidrocarbonetos monoterpênicos são aqueles com atividade mais pronunciada (THANIGAIVEL et al., 2019; LUZ et al., 2020).

A atividade larvicida de óleos essenciais tem sido amplamente estudada. Entre as famílias botânicas com a maioria de espécies com potencial larvicida está a Lauraceae, ao lado de Lamiaceae, Myrtaceae, Piperaceae, Asteraceae, Rutaceae e Euphorbiaceae (DIAS; MORAES, 2014; LUZ et al., 2020; SOUZA et al., 2020).

Inclusive, alguns desses estudos têm apontado alta efetividade de espécies de Lauraceae, tais como: *Beilschmiedia robusta* CL<sub>50</sub> = 22,0 µg/mL (CHAU et al., 2020); *Cinnamomum damhaensis*, *Cinnamomum ovatum*, *Cinnamomum polyadelphum*, *Cinnamomum tonkinense* respectivamente com CL<sub>50</sub> de 21,43

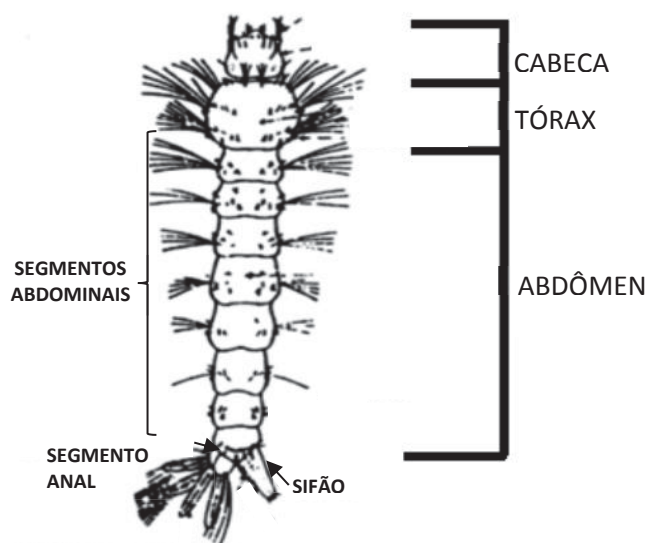
$\mu\text{g/mL}$ , 24,12  $\mu\text{g/mL}$ , 23,41  $\mu\text{g/mL}$  e 17,44  $\mu\text{g/mL}$  (DAI et al., 2020); *Cryptocarya concinna* e *Cryptocarya infectoria* com respectiva  $\text{CL}_{50}$  de 16,22  $\mu\text{g/mL}$  e 18,94  $\mu\text{g/mL}$  (CHAU et al., 2020). Todas essas espécies apresentaram bioatividade larvicida muito próxima aos valores encontrados no presente estudo. No entanto, *Neolitsea ellipsoidea* apresentou uma efetividade maior às espécies anteriormente elencadas, com  $\text{CL}_{50}$  de 4,038  $\mu\text{g/mL}$  (CHAU et al., 2020).

Para o gênero *Ocotea*, foi encontrado poucos estudos dessa natureza, muito embora seja um gênero com muitas espécies aromáticas. Ensaio larvicidas com o OE de *O. nutans* (BETIM et al., 2019) e *O. quixos* (SCALVENZI et al., 2019) demonstraram efetividade inferior à *O. bicolor* apresentando  $\text{CL}_{50}$  de 250  $\mu\text{g/mL}$  e 75,51  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente.

#### 4.6.4.1 Alterações morfológicas externas das larvas de *Aedes aegypti* submetidas ao tratamento do óleo essencial de folhas e galhos de *Ocotea bicolor*

Larvas de *A. aegypti* com aspecto normal são compostas de cabeça, tórax e abdômen, sendo este último dividido em oito segmentos. O segmento posterior e anal do abdômen tem quatro brânquias lobuladas para regulação osmótica e um sifão ou tubo de ar para a respiração na superfície da água, conforme evidenciado na (FIGURA 25) (BRASIL, 2001).

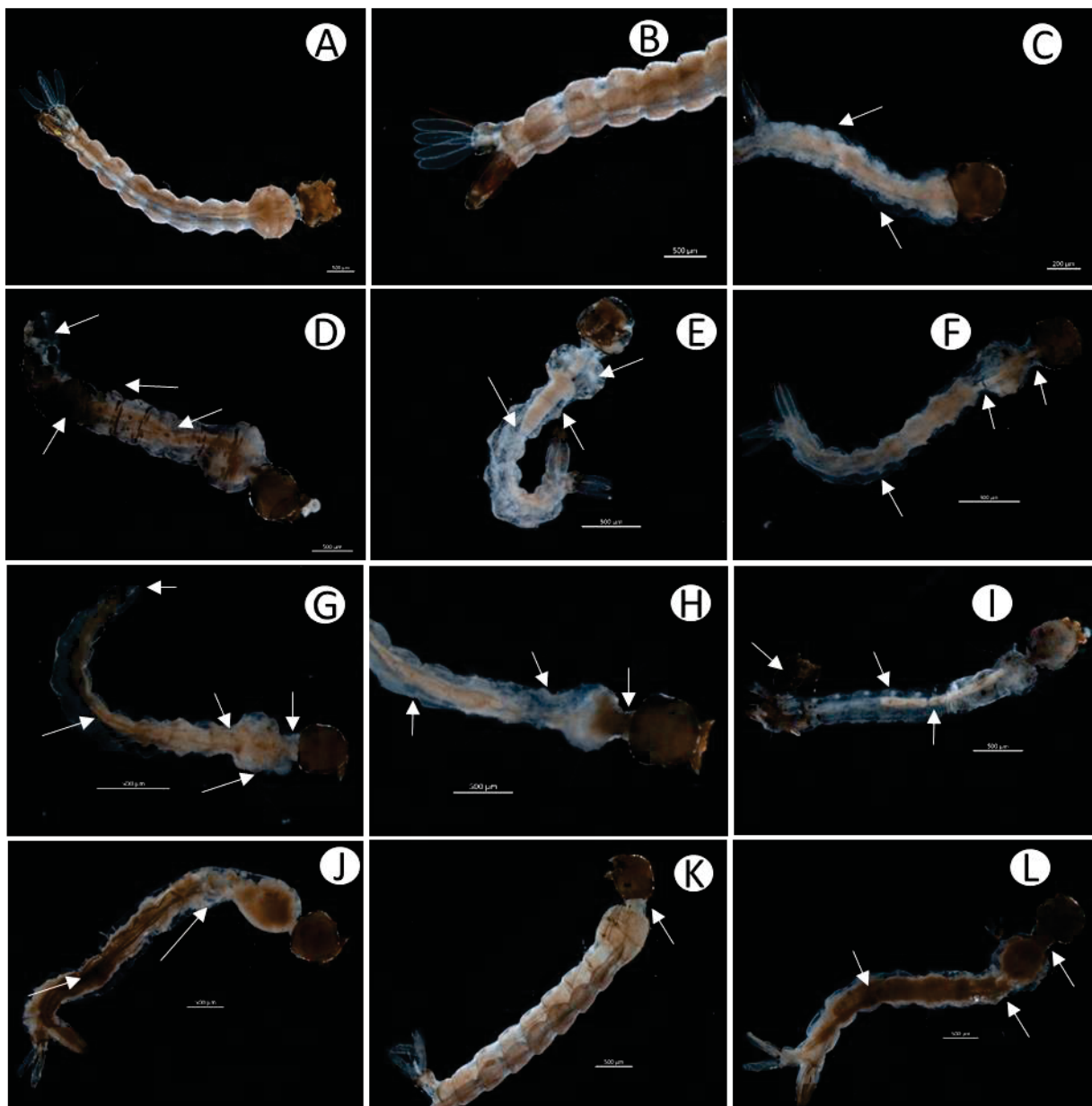
FIGURA 25 - MORFOLOGIA EXTERNA DA LARVA DE *Aedes aegypti*



FONTE: Adaptado de MONTEIRO (2014)

As larvas expostas ao OE de folhas e galhos de *O. bicolor* apresentaram algumas alterações morfológicas externas, as quais estão evidenciadas na (FIGURA 26). Como pode ser observado por meio da micrografia (FIGURA 26A – 26B), as larvas do grupo controle apresentaram o corpo nitidamente dividido em cabeça, tórax e abdômen e segmentos bem diferenciados. Na (FIGURA 26B) é possível observar papilas anais e sifão respiratório com características normais.

FIGURA 26 - MORFOLOGIA EXTERNA DAS LARVAS DE *Aedes aegypti* EXPOSTAS AO ÓLEO ESSENCIAL DE *Ocotea bicolor*



FONTE: A autora (2020)

NOTA: A e B: Controle; C: OEF 12; D: OEG 12; E: OEF 16; F: OEG 16; G: OEF 20; H: OEG 20; I: OEF 24; J: OEG 24; K: OEF 28; L: OEG 28. Concentração  $\mu\text{g/mL}$ . OEF: óleo essencial das folhas; OEG: óleo essencial dos galhos.

Em geral, as larvas tratadas com OE de folhas e galhos de *O. bicolor* apresentaram-se com aspecto frágil, curvado, pouco resistentes e com mobilidade comprometida. Já nas primeiras 12h de contato com a solução (sobretudo as de maior concentração), as larvas aparentavam letargia, ficando paradas no fundo do recipiente, movendo-se apenas com leves batidas no frasco.

Quando comparadas ao grupo controle, as larvas expostas ao OE de folhas e galhos de *O. bicolor* apresentaram distintas alterações nas diferentes concentrações utilizadas. O alongamento da cérvix foi a mais predominante (FIGURAS 26F, 26G, 26H, 26K, 26L), respectivamente nas amostras de OEG 16 µg/mL, OEF 20 µg/mL, OEG 20 µg/mL, OEF 28 µg/mL, OEG 28 µg/mL. Esse tipo de alteração foi evidenciado no estudo de Phophiro (2008) atribuída à intoxicação pelo óleo de *Carapa guianensis* e *Copaifera sp.* após 24 horas de exposição. Achado semelhante foi identificado no estudo com óleos voláteis de *Microlobius foetidus* (SILVA, 2014).

Essa característica também foi observada pelo uso do pesticida Diflubenzuron (BORGES et al., 2004). Alongamento no primeiro seguimento ocorreu nas larvas submetidas ao OEG 16µg/mL e OEF 20 µg/mL (FIGURAS 26F, 26G), bem como encurtamento dos segmentos (FIGURA 26C, 26D) na concentração de 12 µg/mL para o OEF e OEG.

O escurecimento dos segmentos pode ser observado nas (FIGURAS 26D, 26J, 26L) nas concentrações de 12 µg/mL e 28 µg/mL do OEG. Tal escurecimento pode ser causado pela sobreposição das cutículas dos segmentos abdominais (BARRETO et al, 2006) ou alterações na matriz peritrófica (EDWARDS; JACOBS-LORENA, 2000). A matriz peritrófica atua como barreira protetora contra várias substâncias químicas, agentes microbianos e até mesmo contra agressões físicas causadas pela ingestão de alimentos ou substâncias (VALOTTO et al., 2010). No estudo conduzido por Fujiwara (2017) alteração semelhante se deu ao ser as larvas expostas a cinamato de metila e ao linalol.

Também foi observado uma redução da espessura do corpo gorduroso expondo os segmentos das larvas quando submetidas ao OEF 12 µg/mL e 16 µg/mL, OEG 16 µg/mL e 20 µg/mL, OEF 24 µg/mL (FIGURAS 26C, 26E, 26F, 26H, 26I). Levando-se em consideração o papel de reserva energética desempenhada pela gordura corporal, um bloqueio na digestão ou absorção de nutrientes promovido

por danos às células epiteliais do intestino, podem ocasionar a morte da larva por falta dessa reserva (ARRESE; SOULAGES, 2010; SAUCEDO, 2011).

Outras alterações foram detectadas, tais como: inibição das papilas anais (FIGURAS 26D, 26G) nas larvas expostas ao OEG 12 µg/mL e OEF 20 µg/mL; deslocamento das peças do abdômen (FIGURAS 26D, 26E; 26G; 26I) nas concentrações de 12 µg/mL, 16 µg/mL, 20 µg/mL, 24 µg/mL do OEF; má formação na região do tórax (FIGURAS 26E, 26G), para o OEF 16 µg/mL e 20 µg/mL; má formação na região do primeiro segmento (FIGURAS 26H, 26L) quando submetidas ao OEG 20 µg/mL e 28 µg/mL; má formação na região do tórax, primeiro e segundo seguimentos na exposição ao OEG 24 µg/mL (FIGURA 26J) e nas larvas em contato com o OEF 24 µg/mL ocorreu o colapsamento do segmento anal e sifão respiratório, não sendo possível a sua identificação (FIGURA 26I).

Outra característica observada foi a inundação física do sistema traqueal (FIGURA 26E) na concentração de 16 µg/mL do OEF. Como pode ser verificado nessa figura, o sistema traqueal apresenta-se translúcido, indicativo da presença de líquido nessa porção. Diferentemente, o grupo controle (FIGURA 26A) exibe essa mesma porção de forma opaca e escura. Esse aspecto, segundo Souza e colaboradores (2012) é característica da presença somente de ar. De acordo com Corbet e colaboradores (2000) uma das formas de atuação dos óleos essenciais como larvicida é a inundação do sistema traqueal, podendo atuar também por meio da interrupção das forças que permitem que as larvas repousem na superfície, por toxicidade química, por indução de respostas quimiossensoriais ou pela ação combinada.



## 5 CONCLUSÃO

Por intermédio do presente trabalho foi possível a identificação do flavonoide glicosilado da classe dos diidroflavonóis: astilbina (3-O- $\alpha$ -ramnosídeo de taxifolina ou diidroquercetina-3-O- $\alpha$ -ramnosídeo). A substância foi isolada da Fração Acetato de Etila do Sólido (FAES) e identificada por técnicas de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .

A partir da obtenção do óleo essencial das folhas e galhos de *Ocotea bicolor* por hidrodestilação e análise cromatográfica por CG/EM, foi possível detectar a predominância de sesquiterpenos no óleo essencial das folhas e álcoois sesquiterpênicos no óleo essencial dos galhos. Os compostos majoritários para ambas as amostras foram: 5-hidroxicalameneno (28,98% - folhas / 49,19% - galhos); trans – calameneno (23,56% - folhas / 17,53% - galhos);  $\alpha$ -Copaeno ( 7,25% - folhas / 3,17% - galhos) e trans-Muurolo-4(14),5-dieno (6,54% - folhas / 2,65% - galhos).

A concentração de fenólicos totais foi considerada elevada em todas as amostras, com destaque para a Fração Acetato de Etila (FAE) e Extrato Bruto (EB). Referente a avaliação da capacidade antioxidante, os resultados foram expressivos frente todas as técnicas utilizadas. As Frações Acetato de Etila do Sólido (FAES), Fração Acetato de Etila (FAE) e a Fração Remanescente do Sólido (FRS) foram as que mais se destacaram apresentando a maior capacidade antioxidante total pelos métodos de redução do ferro – FRAP, ABTS e ORAC. Por intermédio do tratamento estatístico de correlação de Pearson, foi possível identificar uma correlação muito forte entre a capacidade antioxidante e o teor de compostos fenólicos em quase todas as amostras.

Em relação ao estudo alelopático as Frações Clorofórmio (FC) e Hexano do Sólido (FHS) interferiram na germinação das sementes de *Lactuca sativa*. Quando, porém, testadas em sementes de *Allium cepa* as amostras não apresentaram nenhuma interferência no processo de germinação, o que não ocorreu para o índice de velocidade de germinação, onde várias frações influenciaram negativamente. No teste de crescimento da radícula e do hipocótilo de plântulas de *L. sativa* e *A. cepa* a maioria das frações causou um efeito inibitório.

No ensaio da atividade hemolítica todas as amostras testadas apresentaram valores abaixo de 5% quando comparadas ao controle positivo. Na avaliação da atividade imunomoduladora sobre neutrófilos humanos o isolado astilbina na concentração de 10  $\mu\text{g/mL}$  não foi considerado ativador de neutrófilos.

O óleo essencial das folhas e galhos da espécie em estudo demonstraram alta atividade larvicida sobre *Aedes aegypti*, inclusive induzindo alterações morfológicas externas nas larvas expostas a elas, mesmo nas menores concentrações testadas, com predominância do alongamento da cérvix. Tais alterações interferem na sobrevivência e desenvolvimento das larvas.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados apresentados neste trabalho juntamente aos realizados previamente e descritos em Damasceno (2017) indicam o potencial de *Ocotea bicolor* (Lauraceae).

A espécie apresentou resultados promissores na capacidade antioxidante por meio de ensaios colorimétricos. No entanto para atestar sua real capacidade antioxidante, estudos *in vitro* e *in vivo* devem ser considerados, razão pela qual em sistemas biológicos a resposta antioxidante pode ser diferenciada.

A atividade alelopática de *O. bicolor*, torna a espécie elegível para a formulação de um biopesticida. No entanto, tal estudo deve ser ampliado, por meio de testes em plantas daninhas a fim de elucidar o mecanismo de ação frente a outras espécies vegetais.

Apesar dos resultados proeminentes da toxicidade do óleo essencial sobre larvas de *Aedes aegypti*, seu uso para tal finalidade deve ser atrelado a mais estudos toxicológicos, uma vez que sua ação tóxica pode afetar outros sistemas biológicos.

Dessa forma, de acordo com os resultados apresentados com *O. bicolor*, futuras investigações com mais análises antioxidantes, alelopáticas e sobretudo toxicológicas devem ser consideradas. Cabe considerar que, em se tratando de uma espécie com abundante composição química e pertencente a uma família rica em metabólitos secundários, ainda restam substâncias a serem identificadas e testadas, ampliando seu potencial biológico e farmacológico.

## REFERÊNCIAS

- ABD EL-GAWAD, A. M.; EL-AMIER, Y. A.; BONANOMI, G. Allelopathic activity and chemical composition of *Rhynchosia minima* (L.) DC. essential oil from Egypt. **Chemistry & biodiversity**, v. 15, n. 1, p. e1700438, 2018.
- ABREU, J. S. et al. Leukocytes respiratory burst and lysozyme level in pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887). **Brazilian Journal of Biology**, v. 69, n. 4, p. 1133-1139, 2009.
- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**, ed. 4.1, 2017.
- AGRAWAL, P. K.; THAKUR, R. S. <sup>13</sup>C NMR spectroscopy of lignan and neolignan derivatives. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 23, p. 389-418, 1985.
- AHMED, D. et al. Hepatoprotective, anti-hemolytic, and anti-radical properties of cold-pressed, no-solvent, extract of bottle gourd fruit. **International Journal of Vegetable Science**, v. 25, n. 4, p. 330-339, 2019.
- ALAM, M. N.; BRISTI, N. J.; RAFIQUZZAMAN, M. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 21, p.143-152, 2013.
- ALARCÓN, E. et al. Antioxidant capacity of herbal infusions and tea extracts: A comparison of ORAC-fluorescein and ORAC-pyrogallol red methodologies. **Food Chemistry**, v. 107, n. 3, p. 1114-1119, 2008.
- ALBARRACIN, L. T. et al. Aporphine alkaloids with antitubercular activity isolated from *Ocotea discolor* Kunth (Lauraceae). **Revista Colombiana de Química**, v. 46, n. 3, p. 22-27, 2017.
- ALBUQUERQUE, U. P. The use of medicinal plants by the cultural descendants of African people in Brazil. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 20, n. 2, p. 139-144, 2001.
- ALVES, M. C. S. et al. Alelopatia de extratos voláteis na germinação de sementes e no comprimento da raiz de alface. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 39, n. 11, p. 1083-1086, 2004.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, p. 232-240, 2007.
- ARAÚJO, A. C. R. **Estudo fitoquímico e avaliação das atividades alelopática, antioxidantes, antilarvicidas e citotoxicidade das folhas de *Ocotea pulchella* Mart. (Lauraceae)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde – Universidade Federal do Paraná. 2012.
- ARRESE, E. L.; SOULAGES, J. L. Insect fat body: energy, metabolismo and regulation. **Annual Review of Entomology**, v. 55, p. 207-225, 2010.

AUGUSTO, O. **Radicais Livres: Bons, maus e naturais**, Oficina de Textos: São Paulo, 2006.

ASLAM, F. et al. Antioxidant, haemolytic activities and GC-MS profiling of *Carissa carandas* roots. **International Journal of Phytomedicine**, v. 3, n. 4, p. 567-578, 2012.

BAITELLO, J. B. **A importância das Lauraceae na Mata Atlântica Brasileira**. 2016 Disponível em: <<http://www.ambiente.sp.gov.br/pesquisaambiental/pesquisas/aimportancia-das-lauraceae-na-mata-atlantica-brasileira/>>. Acesso em: 29 abr. 2018.

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

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agro-industrial byproducts: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, p. 191-203, 2006.

BALLABENI, V. et al. Antiplatelet and antithrombotic activities of essential oil from wild *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. (Lauraceae) calices from Amazonian Ecuador. **Pharmacological Research**, v. 55, p. 23-30, 2007.

BALLABENI, V. et al. *Ocotea quixos* Lam. óleo essencial: investigação in vitro e in vivo de suas propriedades antiinflamatórias. **Fitoterapia**, v. 81, n. 4, pág. 289-295, 2010.

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

BARBOSA-FILHO, J. M. et al. *Ocotea duckei*: exceptional source of yangambin and other furofuran lignans. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 71, n. 2, p. 231-238, 1999.

BARBOSA-FILHO, J. M. Lignanas, neolignanas e seus análogos. In: C.M.O. Simões et al. (eds.). **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Universidade UFRGS/ Ed. da UFSC, Porto Alegre, capítulo 22, Florianópolis, 2004.

BARBOZA, H. T. G. et al. Compostos organofosforados e seu papel na agricultura. **Revista Virtual de Química**, v. 10, n. 1, 2018.

BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.

BARNES, J. P.; PUTNAM, A. R. Role of benzoxazinones in allelopathy by rye (*Secale cereale* L.). **Journal of Chemical Ecology**, v. 13, n. 4, p. 889-906, 1987.

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

BARRETO, C. F. et al. Estudo das alterações morfo-histológicas submetidas ao extrato bruto etanólico de *Sapindus Saponaria* Lin (SAPINDACEAE). **Revista de Prologia Tropical**, v. 35, n. 1, p. 37–57, 2006.

BARROS, J. Â. C., CAMPOS, R. M. M., & MOREIRA, A. V. B. Antioxidant activity in wines made from jabuticaba and grape. **Journal of the Brazilian Society of Food and Nutrition**, v.35, n.1, 73- 83, 2010.

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

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

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (Frap) as a measure of antioxidant power: the frap assay. **Anal Biochem**, v.239, p.70-76, 1996.

BETIM, F. C. M. et al. *Ocotea nutans* (Nees) Mez (Lauraceae): chemical composition, antioxidant capacity and biological properties of essential oil. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 55, 2019.

BHAMINI, K.; KUMAR, A. Allelopathy: a natural and an environment-friendly unique alternative tool and their effect on fruit crops. In: KUMAR, A.; KUMAR, U. **Recent advances in Chemical Sciences and Biotechnology**. 1. ed. New Delhi: New Delhi Publishers, 2019. p. 179-187.

BI, H. et al. Analgesic effects of astilbin partially via calcium channels through regulation on CaMKII. **Food and Agricultural Immunology**, v. 30, n. 1, p. 309-319, 2019.

BISSET, J. A. Uso correcto de insecticidas: control de la resistencia. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, v. 54, n. 3, p. 202-219, 2002.

BORGES, R. A. et al. Mortalidade e alterações morfológicas provocadas pela ação inibidora do diflubenzuron na ecdise de larvas de *A. aegypti* (Diptera, Culicidae). **Revista de Patologia Tropical**, v. 33, n. 1, p. 91- 104, 2004.

BRAGA, I. A.; VALLE, D. et al. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. 2007. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v.16, n.4, p. 279-293, 2007.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopeia Brasileira**, vol. 1, 6. ed. Brasília, DF: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2019.

\_\_\_\_\_. **Dengue instruções para pessoal de combate ao vetor: manual de normas técnicas**. FUNASA. Brasília: Ministério da Saúde: Fundação Nacional de Saúde. 84 p., 2001.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Secretaria da Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília, 60 p., 2006.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. **Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo Aedes Aegypti (dengue, chikungunya e zika), semanas epidemiológicas 1 a 38, 2020**. Brasília, DF: Boletim epidemiológico, 51(41), out. 2020a.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. **Recomendações aos Agentes de Combate a Endemias (ACE) para adequação das ações de vigilância e controle de zoonoses frente à atual situação epidemiológica referente ao Coronavírus (COVID-19)**. Nota informativa n° 8, de 26 de março de 2020. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2020b.

BRITO, A. F. et al. Ação anti-cancerígena da quercetina no carcinoma hepatocelular: o papel do GLUT-1. **Revista Portuguesa de Cirurgia**, n. 25, p. 798-806, 2015.

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

BRUNETON, J. **Farmacognosia, Fitoquímica, Plantas medicinales**. 2. ed. Editora Acribia.Zaragoza. 2001, 1120p.

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.

BRUSTULIM, L. J. R. et al. *Ocotea porosa*: Anatomy and Histochemistry of Leaves and Stems, Chemical Composition, Cytotoxicity and Insecticidal Activities of Essential Oil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 63, 2020.

BURGER, W.C. A new genus of Lauraceae from Costa Rica, with comments on problems of generic and specific delimitation within the family. New York Botanical Garden, USA. **Brittonia**, v. 40, n.3, p.275-282, 1988.

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

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

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

CAO, G.; ALESSIO, H. M.; CUTLER, R. G. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. **Free radical biology and medicine**, v. 14, n. 3, p. 303-311, 1993.

CARDONA-OSPINA, J. A. et al. Dengue and COVID-19, overlapping epidemics? An analysis from Colombia. **Journal of Medical Virology**, v. 93, p. 522–527, 2021.

CARDOSO-CARRARO, C. J. et al. Flaxseed and human health: reviewing benefits and adverse effects. **Food Reviews International**, v. 28, n. 2, p. 203-230, 2012.

CARMO, F. M. S.; LIMA-BORGES, E. E.; TAKAKI, M. Allelopathy of Brazilian sassafras (*Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer) aqueous extracts. **Acta Botanica Brasilica**, v. 21, n. 3, p. 697-705, 2007.

CARRIL, E. P. U.; GARCÍA, A. A. Metabolismo secundario de plantas. **Reduca**, v. 2, n. 3, p. 119-145, 2009.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I. C. F. R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and chemical toxicology**, v. 51, p. 15-25, 2013.

CARVALHO, F. P. et al. The allelopathic effect of eucalyptus leaf extract on grass forage seed. **Planta Daninha**, v. 33, n. 2, p.193-201, 2015.

CARVALHO, O. V. et al. Potencial antiviral da quercetina sobre o parvovírus canino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.65, n.2, p. 353-358, 2013.

CASTELLANI, D.C.et al. Produção de óleo essencial em canela (*Ocotea odorifera* Vell) e guaçatonga (*Casearia sylvestris* Swartz) em função da época de colheita. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.8, p.104-107, 2006.

CASTRO, R. D.; LIMA, E. O. Atividade antifúngica dos óleos essenciais de sassafrás (*Ocotea odorifera* Vell.) e alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) sobre o gênero *Candida*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 2, p. 203-208, 2011.

CASIMIRO, G. S. et al. Allelopathic activity of extracts from different brazilian peanut (*Arachis hypogaea* L.) cultivars on lettuce (*Lactuca sativa*) and weed plants. **The Scientific World Journal**, v. 2017, 2017.

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

CERQUEIRA, F. M.; MEDEIROS, M. H. G.; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 441-449, 2007.

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

CHAU, D. T. M. et al. Chemical compositions, mosquito larvicidal and antimicrobial activities of leaf essential oils of eleven species of Lauraceae from Vietnam. **Plants**, v. 9, n. 5, p. 606, 2020.

CHAVERRI, C.; DÍAZ, C.; CICCÍÓ, J. F. Chemical Analysis of Essential Oils from *Ocotea gomezii* WC Burger and *Ocotea morae* Gómez-Laur.(Lauraceae) Collected



at" Reserva Biológica Alberto M. Brenes" in Costa Rica and their Cytotoxic Activity on Tumor Cell Lines. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 4, p. 741-745, 2011.

CHEN, F. et al. Astilbin inhibits high glucose-induced inflammation and extracellular matrix accumulation by suppressing the TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B pathway in rat glomerular mesangial cells. **Frontiers in pharmacology**, v. 9, 2018 b.

CHEN, K-C. et al. Flavonoids Luteolin and Quercetin Inhibit RPS19 and contributes to metastasis of cancer cells through c-Myc reduction. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 26, p. 1180- 1191, 2018 a.

CHEW, Y. L. et al. Assessment of phytochemical content, polyphenolic composition, antioxidante and antibacterial activities of Leguminosae medicinal plants in Peninsular Malaysia. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 11, n. 12, 2011.

CHON, S. U. et al. Allelopathic potential in lettuce (*Lactuca sativa* L.) plants. **Scientia Horticulturae**, v.106, n. 3, p. 309-317, 2005.

CHON, S.-U.; KIM, Y.-M.; LEE, J.-C. Herbicidal potential and quantification of causative allelochemicals from several Compositae weeds. **Weed research**, v. 43, n. 6, p. 444-450, 2003.

CHUNG, I. M.; AHN, L. K.; YUN, S. J. Assesment of allelopathic potential of barnyard grass (*Echinochloa crus-gall*) on rice (*Oriza sativa* L.) cultivars. **Crop Protection**, v. 20, p. 921-928, 2001.

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

COELHO, M. F. B. et al. Atividade alelopática de extrato de sementes de juazeiro Allelopathic activity of juazeiro seed extract. **Horticultura Brasileira**, v. 29, n. 1, p. 108-111, 2011.

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

CORBET, S. A. et al. Surface films as mosquito larvicides: partitioning the mode of action. **Entomologia Experimentaliset Applicata**, v. 94, p. 295-307, 2000.

CORDEL, G. A.; QUIRN-BEATTIE, M. L.; FARNSWORTH, N. R. The potential of alkaloids in drug discovery. **Phytotherapy Research**, Vol. 15, Pp. 183-205, 2001.

COSTA, I. F. B. et al. Antimycobacterial and nitric oxide production inhibitory activities of *Ocotea notata* from Brazilian restinga. **The Scientific World Journal**, v. 2015, 2015.

CRUZ-ORTEGA, R. et al. Effects of allelochemical stress produced by *Sicyos deppei* on seedling root ultraestructure of *Phaseolus vulgaris* and *Cucurbita ficifolia*. **Journal of Chemical Ecology**, v.24, n. 3, p. 2039-2057, 1998.

CUSHNIE, T. P. T.; LAMB, A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 26, n.5, p. 343-356, 2005.

DAI, D. N. et al. Chemical compositions, mosquito larvicidal and antimicrobial activities of essential oils from five species of *Cinnamomum growing wild* in north central Vietnam. *Molecules*, v. 25, n. 6, p. 1303, 2020.

DAI, J.; MUMPER, R. J. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules*, v.15, p. 7313-7352, 2010.

DAMASCENO, C. S. B. **Estudo fitoquímico, antioxidante, antibacteriano, toxicidade e identificação botânica de *Ocotea bicolor* Vattimo-Gil (LAURACEAE)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde – Universidade Federal do Paraná. 2017.

DANS, A. L. et al. Controversy and debate on dengue vaccine series—paper 1: review of a licensed dengue vaccine: inappropriate subgroup analyses and selective reporting may cause harm in mass vaccination programs. *Journal of clinical epidemiology*, v. 95, p. 137-139, 2018.

DÁVALOS, A.; GÓMEZ-CORDOVÉS, C.; BARTOLOMÉ, B. Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC– fluorescein) assay. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 52, n. 1, p. 48-54, 2004.

DAVID, J.M., YOSHIDA, M., E GOTTLIEB, O.R. Phenylpropanoid-catechins from bark of *Ocotea porosa*. *Phytochemistry*, v. 35, p. 545-546, 1994.

DAVIN, L. B.; LEWIS, N. G. Dirigent proteins and dirigent sites explain the mystery of specificity of radical precursor coupling in lignan and lignin biosynthesis. *Plant Physiology*, v. 123, n. 2, p. 453-461, 2000.

DE LUCA, V. et al. Mining the biodiversity of plants: a revolution in the making. *Science*, v. 336, p. 1658-1661, 2012.

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

DEWICK, P.M. Alkaloids. In: DEWICK, P.M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. Chichester, New York: John Wiley, 1997. p.270-371.

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

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

DIAS, J. F. G. et al. Contribution to the allelopathic study of *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss., Celastraceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.15, n. 3, p. 220-223, 2005.

DIAS, C. N.; MORAES, D. F. C. Essential oils and their compounds as *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) larvicides. **Parasitology research**, v. 113, n. 2, p. 565-592, 2014.

DIAS, L. A. S. et al. **Melhoramento genético do cacauero**. Viçosa: Ed. UFV, 2001.

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

DONG, L. et al. Astilbin from *Smilax glabra* Roxb. Attenuates inflammatory responses in complete Freund's adjuvant-induced arthritis rats. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, 2017.

DOSTÁL, J. Two Faces of Alkaloids. **Journal of Chemical Education**. v. 77, n. 8, p.993-998, 2000.

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

DUDONNE, S. et al. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 57, n. 5, p. 1768-1774, 2009.

EBRAHIMI, S. O.; REISI, S.; SHAREEF, S. miRNAs, oxidative stress, and cancer: A comprehensive and updated review. **Journal of cellular physiology**, v. 235, n. 11, p. 8812-8825, 2020.

EDWARDS, M. J.; JACOBS-LORENA, M. Permeability and disruption of the peritrophic matrix and caecal membrane from *Aedes aegypti* and *Anopheles gambiae* mosquito larvae. **Journal of Insect Physiology**, v. 46, p. 1313-1320, 2000.

FABRI, N. T. et al. Composition, antioxidant properties, and biological activities of the essential oil extracted from *Ocotea diospyrifolia* (Meisn.) Mez. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 55, 2019.

FENECH, M. Micronutrients and genomic stability: a new paradigm for recommended dietary allowances (RDAs). **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, n. 8, p. 1113-1117, 2002.

FERREIRA, A.G., AQUILA, M. E. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. **Revisa Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, p. 175-204, 2000.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.

FERREIRA, C.; DE-OLIVEIRA, A. C. A. X.; PAUMGARTTEN, F. J. R. Serum concentrations of DDT and DDE among malaria control workers in the Amazon region. **Journal of Occupational Health**, v. 53, n. 2, p. 115 - 122, 2011.

FERREIRA, I. C. F. R.; ABREU, R. Stress oxidativo, antioxidantes e fitoquímicos. **Bioanálise**, p. 32-39, 2007.

FIGUEIREDO FILHO, D. B. et al. Desvendando os mistérios do coeficiente de correlação de Pearson: o retorno. **Leviathan**, n. 8, p. 66-95, 2014.

FOGLIO, M.A., et al. Plantas Medicinais como Fonte de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar. **Multiciência**, 2006.

FONTEQUE, J. H., et al. Comparação entre duas metodologias para a realização do teste de redução do tetrazólio nitroazul (NBT) em caprinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, n. 1, p. 1-4, 2015.

FORBES-HERNÁNDEZ, T. Y. et al. Capacidad antioxidante total de la dieta vs. balance redox. QhaliKay. **Revista de Ciencias de la Salud**, v. 4, n. 1, p. 35-48, 2020.

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

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

FUJIWARA, G. M. **Desenvolvimento tecnológico, caracterização e avaliação de micropartículas flutuantes para veiculação de fitolarvicida**. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde – Universidade Federal do Paraná. 2017.

FUNASAKI, M. et al. Neolignans and sesquiterpenes from leaves and embryogenic cultures of *Ocotea catharinensis* (Lauraceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, p. 853-859, 2009.

GAMA, J. **Package “ecotoxicology” Type Package** Title Methods for Ecotoxicology. 2015.

GAO, Y. et al. Nonclinical safety of astilbin: a 4-week oral toxicity study in rats with genotoxicity, chromosomal aberration, and mammalian micronucleus tests. **Food and Chemical Toxicology**, v. 107, p. 1-9, 2017.

GARCEZ, F. R. et al. Cytotoxic aporphine alkaloids from *Ocotea acutifolia*. **Planta Medica**, v. 77, p. 383-387, 2011.

GARCEZ, W. S. et al. Indole alkaloid and other constituents from *Ocotea minarum*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, p. 1382-1386, 2005.

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

GATTI, A. B. et al. Atividade alelopática de extratos aquosos de *Aristolochia esperanzae* O. Kuntze na germinação e no crescimento de *Lactuca sativa* L. e *Raphanus sativus* L. **Acta Botanica Brasilica**, v. 18, n. 3, p. 459-472, 2004.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas Mediciniais: Fatores de Influência no Conteúdo de Metabólitos Secundários. **Química Nova**, v.30, n.2, p.374-381, 2007.

GONTIJO, D. C. et al. Identification of phenolic compounds and biologically related activities from *Ocotea odorifera* aqueous extract leaves. **Food chemistry**, v. 230, p. 618-626, 2017.

GOTTLIEB, O. R. Chemosystematics of the Lauraceae. **Phytochemistry**, v.1, n.5, p.1537-1570, 1972.

GREEN, T. P.; GALINIS, D. L.; WIEME, R. D. F. **Phytochemistry**. v.30, p. 1649–1652, 1991.

GRIBNER, C. et al. Characterization and identification of chemical constituents of *Ocotea paranaensis* Brotto, Baitello, Cervi, & EP Santos and their biological properties. **Natural Product Research**, p. 1-7, 2020b.

GRIBNER, C. et al. Chemical constituents of *Ocotea paranaensis* (Lauraceae) essential oil and their antioxidant, anticancer and antimicrobial properties. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 19, n. 5, p.495-507, 2020a.

GRZYBOWSKI, A. et al. The combined action of phytolarvicides for the control of dengue fever vector, *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 3, p. 549-557, 2012.

GUINAUDEAU, H.; LEBOEUF, M.; CAVÉ, A. Aporphine alkaloids V. **Journal of Natural Products**, v. 57, n. 8, p. 1033 – 1133, 1994.

GUTERRES, Z. R. et al. Mutagenicity and recombinogenicity of *Ocotea acutifolia* (Lauraceae) aporphinoid alkaloids. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 757, n. 1, p. 91-96, 2013.

HALLIWELL, B. Antioxidants in human health and disease. **Annual Review of Nutrition**, 16, 33-50, 1996.

\_\_\_\_\_. Biochemistry of oxidative stress. **Biochemical society transactions**, v. 35, n. 5, p. 1147-1150, 2007.

\_\_\_\_\_. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. **Nutrition reviews**, v. 70, n. 5, p. 257-265, 2012.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. The definition and measurement of antioxidants in biological systems. **Free radical biology & medicine**, v. 18, n. 1, p. 125-126, 1995.

HERNÁNDEZ, A. M.; PRIETO GONZÁLES, E. A. Plantas que contienen polifenoles. **Revista Cubana de Investigaciones Biomedica**, v.18, n. 1, p. 12-14, 1999.

INDERJIT, L. A. W.; STEPHEN, O. D. Challenges, achievements and opportunities in allelopathy research, **Journal of Plant Interactions**, v.1, n.2, p. 69-81, 2005.

INDRA, B. et al. Structure-activity relationship of ( $\pm$ )-nantenine derivatives in  $\alpha$ -1-adrenoreceptor activity. **European Journal of Pharmacology**, v. 437, n. 3, p. 173-178, 2002.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). **Agents Classified by the IARC**. Monographs, Volumes 1–113, 2015.

ISMAN, M. B. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. **Annual Review of Entomology**, v. 51, p. 45–66, 2006.

JIROVETZ, L. et al. Analysis of *Cinnamomum zeylanicum* Blume leaf oil from South India. **Journal of Essential Oil Research**, v. 13, n. 6, p. 442-443, 2001.

KAISER, S.; PAVEI, C.; GONZALES ORTEGA, G. Estudo da relação estrutura-atividade de saponinas hemolíticas e/ou imunoadjuvantes mediante uso de análise multivariada. **Revista brasileira de farmacognosia**, v. 20, n. 3, p. 300-309, 2010.

KAMETANI, T.; HONDA, T. The Alkaloids: Chemistry and Pharmacology. En: Brossi, A. (Ed.). Aporphine Alkaloids. **Academic Press**. 1985. 232 p.

KNOLL, M. F. et al. Effects of *Pterocaulon polystachyum* DC. (Asteraceae) on onion (*Allium cepa*) root-tip cells. **Genetics and Molecular Biology**, v.29, n.1, p. 539-542, 2006.

KOMALAMISRA, N. et al. Screening for larvicidal activity in some Thai plants against four mosquito vector species. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 36, n. 6, p. 1412, 2005.

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

KOULMAN, A. **A study of the biosynthesis, evolution, function and use of podophyllotoxin and related lignans**. Groningen: Stichting Regenboog Drukkerij, 2003.

KRUGER, P. et al. Neutrophils: Between host defence, immune modulation, and tissue injury. **PLoS Pathog**, v. 11, n. 3, p. e1004651, 2015.

KUMAR, G.; KARTHIK, L.; RAO, K. V. B. Hemolytic activity of Indian medicinal plants towards human erythrocytes: an in vitro study. **Elixir Applied Botany**, v. 40, p. 5534-5537, 2011.

LAKSHMI, K. V.; SUDHIKUMAR, A. V.; ANEESH, E. M. Larvicidal activity of phytoextracts against dengue fever vector, *Aedes aegypti*-A review. **Plant Science Today**, v. 5, n. 4, p. 167-174, 2018.

LARSON, A. J.; SYMONS, J. D.; JALILI, T. Therapeutic potential of quercetin to decrease blood pressure: review of efficacy and mechanisms. **Advances in nutrition**, v. 3, n. 1, p. 39-46, 2012.

- LEE, S. K. et al. Cytostatic mechanism and antitumor potential of novel 1H-cyclopenta[ $\beta$ ]benzofuran lignans isolated from *Aglaia elliptica*. **Chemico-Biological Interactions**, v. 115, n. 3, p. 215-228, 1998.
- LELIEFELD, P. H. The role of neutrophils in immune dysfunction during severe inflammation. **Critical Care**, v.20, n.1, p. 7, 2016.
- LEVINSKY, R. J. et al. Phorbol myristate acetate stimulated NBT test: a simple method suitable for antenatal diagnosis of chronic granulomatous disease. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 54, n. 2, p. 595-598, 1983.
- LI, N.; WU, J-L. et al. Bioactive lignans from *Peperomia duclouxii*. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 4, p. 544-548, 2007.
- LI, H. B. et al. Antioxidant properties in vitro and total phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants. **LWT-Food Science and Technology**, v. 41, n. 3, p. 385-390, 2008.
- LIU, J. et al. Characterizing the binding interaction of astilbin with bovine serum albumin: a spectroscopic study in combination with molecular docking technology. **RSC advances**, v. 8, n. 13, p. 7280-7286, 2018.
- LIMA, R. A.; PIRES, L. S. S.; VIEIRA, N. G. A educação ambiental e o uso de plantas medicinais utilizadas pela população do distrito de União Bandeirante-Rondônia. **Electronic Journal of Management, Education and Environmental Technology (REGET)**, v. 18, n. 4, p. 1351-1360, 2015.
- LÓPEZ, H.; VALERA, A. Lignans from *Ocotea foetens*. **Journal of Natural Products**, v. 58, n. 5, p. 782-785, 1995.
- LORENZ, C.; AZEVEDO, T. S.; CHIARAVALLOTTI-NETO, F. COVID-19 and dengue fever: A dangerous combination for the health system in Brazil. **Travel Medicine and Infectious Disease**, 101659, 2020.
- LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e cultivos de plantas arbóreas do Brasil**. 2 ed. São Paulo: Nova Odessa, 2002.
- LÜ, J.- M. et al. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 14, n. 4, p. 840-860, 2010.
- LUXIMON-RAMMA, A. et al. Antioxidant activities of phenolic, proanthocyanidin, and flavonoid components in extracts of *Cassia fistula*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 18, p. 5042-5047, 2002.
- LUZ, T. R. S. A. et al. Essential oils and their chemical constituents against *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) larvae. **Acta Tropica**, p. 105705, 2020.
- LV, K. et al. Study of pro-angiogenic activity of astilbin on human umbilical vein endothelial cells in vitro and zebrafish in vivo. **RSC Advances**, v. 9, n. 40, p. 22921-22930, 2019.

- MA, Y. et al. A novel combination of astilbin and low-dose methotrexate respectively targeting A2AAR and its ligand adenosine for the treatment of collagen-induced arthritis. **Biochemical pharmacology**, v. 153, p. 269-281, 2018.
- MACÍAS, 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**, Washington v. 48, n. 6, p. 2512-2521, 2000.
- MACÍAS, F. A. et al. Allelopathy as a new strategy for sustainable ecosystems development. **Biological sciences in Space**, v. 17, n. 1, p. 18-23, 2003.
- MACIEL, M. A. M., et al. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p.429-438, 2002.
- MACORIS, M. L. G. et al. Impact of insecticide resistance on the field control of *Aedes aegypti* in the State of São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 5, p. 573-578, 2014.
- MADRIÑÁN S. **Rhodostemonodaphne (Lauraceae)**, New York: New York Botanical Garden, 2004. (Flora Neotropica. Monograph, n. 92).
- MAGALHÃES, N. M. G.; SILVA, R. L.; ESPINDOLA, L. S. Registro e perfil ecotoxicológico de produtos para controle de *Aedes aegypti*. *Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência & Tecnologia*—**Visa em Debate**, 2020.
- MAGUIRE, J. D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v. 2, n. 1, p. 176-177, 1962.
- MARASCHIN-SILVA, F.; AQUILA, M. E. A. Potencial alelopático de espécies nativas na germinação e crescimento inicial de *Lactuca sativa* L. (Asteraceae). **Acta Botanica Brasílica**, v. 20, n. 1, p. 61-69, 2006.
- MARKERT, M.; ANDREWS, P. C.; BABIOR, B. M. Measurement of O<sub>2</sub> production by human neutrophils. The preparation and assay of NADPH oxidase-containing particles from human neutrophils. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 358-365, 1984.
- MARQUES, A. C. Importância econômica da família Lauraceae Lindl. **Floresta e Ambiente**, v.1, p.195-206, 2001.
- MARTENS, S.; MITHÖFER, A. Flavones and flavone synthases. **Phytochemistry**, v. 66, n. 20, p. 2399-407, 2005.
- MATALLANA-GONZÁLEZ, M. C. et al. Antioxidant phytochemicals in pulses and their relation to human health: A Review. **Current pharmaceutical design**, v. 26, n. 16, p. 1880-1897, 2020.
- MENUT, C. et al. Chemical and biological studies of *Ocotea comoriensis* bark essential oil. **Flavour and Fragrance journal**, v. 17, n. 6, p. 459-461, 2002.



MILLER, N. J. et al. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. **Clinical science**, v. 84, n. 4, p. 407-412, 1993.

MISHRA, A.; KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Scientific validation of the medicinal efficacy of *Tinospora cordifolia*. **The Scientific World Journal**, v. 2013, 2013.

MÖLLENBECK, S. et al. Chemical composition and analyses of enantiomers of essential oils from Madagascar. **Flavour and fragrance journal**, v. 12, n. 2, p. 63-69, 1997.

MOLISCH, Hans. Der Einfluss einer Pflanze auf die andere, Allelopathie. **Fischer Jena**, 1937.

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

MONTEIRO, F. J. C. **Monitoramento da dispersão de Aedes (Stegomyia) aegypti (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) e da dengue no município de Macapá, Amapá, Brasil**. Universidade Federal do Amapá, 2014.

MONTRUCCHIO, D. P.; CÓRDOVA, M. M.; SANTOS, A. R. S. Plant derived aporphinic alkaloid S-(+)-dicentrine induces antinociceptive effect in both acute and chronic inflammatory pain models: evidence for a role of TRPA1 channels. **PLoS One**, v. 8, n. 7, p. e67730, 2013.

MONTRUCCHIO, D. P. et al. Antinociceptive Effects of a Chloroform Extract and the Alkaloid Dicentrine Isolated from Fruits of *Ocotea puberula*. **Planta medica**, v. 78, n. 14, p. 1543-1548, 2012.

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

MORAIS L. C. S. L. et al. Further lignans from *Ocotea duckei*. **Pharmaceutical Biology**, v. 37, n. 2, p.144-147, 1999.

MOSS, G. P. Nomenclature of lignans and neolignans (IUPAC Recommendations 2000). **Pure and applied chemistry**, v. 72, n. 8, p. 1493-1523, 2000.

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

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, n. 1-2, p. 95-111, 2004.

NAKAHARA, T. et al. Astilbin from *Engelhardtia chrysolepis* enhances intestinal barrier functions in Caco-2 cell monolayers. **European journal of pharmacology**, v. 804, p. 46-51, 2017.

NAKASHIMA, K. et al. Total synthesis of (-)-(7S,10R)-calamenene and (-)-(7S,10R)-2-hydroxycalamenene by use of a ring-closing metathesis reaction. A comparison of the cis and trans-Isomers. **Molecules**, v. 7, n. 7, p. 517–527, 2002.

NAVARRO-SILVA, M. A.; MARQUES, F. A.; DUQUE, J. E. L. Review of semiochemicals that mediate the oviposition of mosquitoes: a possible sustainable tool for the control and monitoring of Culicidae. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 53, n.1, p.1-6, 2009.

NISHIDA, N. et al. Allelopathic effects of volatile monoterpenoids produced by *Salvia leucophylla*: inhibition of cell proliferation and DNA synthesis in the root apical meristem of *Brassica campestris* seedlings. **Journal of Chemical Ecology**, v. 31, p. 1187–1203, 2005.

OGUNDAJO, A. L.; ADENIRAN, L. A.; ASHAFI, A. O. Medicinal properties of *Ocotea bullata* stem bark extracts: phytochemical constituents, antioxidant and anti-inflammatory activity, cytotoxicity and inhibition of carbohydrate metabolizing enzymes. **Journal of integrative medicine**, v. 16, n. 2, p. 132–140, 2018.

OLIVEIRA, V. M. A. et al. In vitro screening of Amazonian plants for hemolytic activity and inhibition of platelet aggregation in human blood. **Acta Amazonica**, v. 39, n. 4, p. 973-980, 2009.

OLSZEWSKA, M. A.; MICHEL, P. Antioxidant activity of inflorescences, leaves and fruits of three *Sorbus* species in relation to their polyphenolic composition. **Natural Product Research**, v. 23, n.16, p. 1507-1521, 2009.

OSCAR, C. C. et al. Neolignans from fruits of *Ocotea veraguensis*. **Phytochemistry**, v.26, n.7, p.2037-2040, 1987.

OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; PRIOR, R. L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. **Journal of agricultural and food chemistry**, v.49, p. 4619-4626, 2001.

PARK, B. H.; FIKRIG, S. M.; SMITHWICK, E. M. Infection and nitroblue-tetrazolium reduction by neutrophils. A diagnostic acid. **The Lancet**, v. 292, n. 7567, p. 532-534, 1968.

PARK, H. H.; GOOD, R. A. NBT test stimulated. **Lancet**, London, v. 2, n. 7673, p. 616, 1970.

PATEL, R. V. et al. Therapeutic potential of quercetin as a cardiovascular agent. **European journal of medicinal chemistry**, v. 155, n.15, p. 889-904, 2018.

PAYET, B. et al. Assessment of antioxidant activity of cane brown sugars by ABTS and DPPH radical scavenging assays: determination of their polyphenolic and volatile constituents. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, n. 26, p. 10074-10079, 2005.

PEQUENO, N. F.; SOTO-BLANCO, B. Toxicidade in vitro de plantas tóxicas: avaliação do teste de ação hemolítica. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, n. 1, p. 45-48, 2006.

PEREIRA, R. V. et al. Evaluation of the chemical composition and antioxidant activity of extracts and fractions of *Ocotea notata* (Ness) Mez (Lauraceae). **Natural product research**, p. 1-4, 2019.

PÉREZ, E. G.; SÁEZ, J.; CASSELS, B. K. A convenient, renewable source of the anxiolytic proaporphine alkaloid glaziovine: *Duguetia vallicola* leaves. **Journal of the Chilean Chemical Society**, v. 50, n. 3, p. 45-53, 2005.

PÉREZ-NÁJERA, Viridiana Candelaria et al. *Smilax aristolochiifolia* root extract and its compounds chlorogenic acid and astilbin inhibit the activity of  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase enzymes. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2018, 2018.

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

PILON, A. C. et al. Metabolômica de plantas: Métodos e desafios. **Química Nova**, v. 43, n. 3, p. 329-354, 2020.

PINO, J. A. et al. Chemical composition and biological activities of essential oil from *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. leaves grown wild in Ecuador. **American Journal of Essential Oils and Natural Products**, v. 6, n. 1, p. 31-34, 2018.

PINTO, A.C.; et al. A. Produtos Naturais: Atualidade, Desafios e Perspectivas. **Química Nova**, v. 25, n. 1, p. 45-61, 2002.

PRICHOA, F. C. et al. Comparative allelopathic effects of *Cryptocarya moschata* and *Ocotea odorifera* aqueous extracts on *Lactuca sativa*. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 35, n. 2, p. 197-202, 2013.

PRIOR, R. L. Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage. **The American journal of clinical nutrition**, v. 78, n. 3, p. 570S-578S, 2003.

PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, n. 10, p. 4290-4302, 2005.

PROPHIRO, J.S. **Susceptibilidade de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) e de *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) (Diptera: Culicidae) a organofosforado e atividade inseticida de produtos de origem botânica**. Curitiba/PR, Universidade Federal do Paraná. Dissertação de Mestrado - Pós-Graduação em Ciências Biológicas: 122, 2008.

PULIDO, R.; BRAVO, L.; SAURA-CALIXTO, F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 48, n. 8, p. 3396-3402, 2000.

QUINET, A., et al. **Lauraceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2015.

Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB143>>. Acesso em: 29 mai 2018.

RAFFAELLI, B. et al. Enterolignans. **Journal of Chromatography, B**, v. 777, n. 1/2, p. 29-43, 2002.

RAKOTONDRAIBE, L. H. 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.

RAO, Y. R.; PAUL, S. C.; DUTTA, P. K. Major constituents of essential oils of *Cinnamomum zeylanicum*. **Indian perfumer**, v. 32, n. 1, p. 86-89, 1988.

R CORE TEAM. **R: a language and environment for statistical computing**. R Found. Stat. Comput. 2017.

RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine Journal**, v.26, p.1231-1237, 1999.

REGASINI, L. O. et al. Constituintes químicos das flores de *Pterogyne nitens* (Caesalpinioideae). **Química nova**, v. 31, n. 4, p. 802-806, 2008.

REN, R. et al. Neuroprotective effects of a standardized flavonoid extract of safflower against neurotoxin-induced cellular and animal models of Parkinson's disease. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 1-13, 2016.

REYNERTSON, K. A. et al. Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible Myrtaceae fruits. **Food chemistry**, v. 109, n. 4, p. 883-890, 2008.

RIGOBERT, A. et al. Chemical composition, antioxidant and antibacterial properties of essential oil from *Ocotea Auriculiformis* Kost. (Lauraceae) leaves, endemic of Madagascar. **European Scientific Journal**, v. 13, n. 33, p. 364-377, 2017.

RIZZINI, C.T.; MORS, W.B. **Botânica econômica brasileira**, 2.ed., Âmbito cultural, Rio de Janeiro, 1995, 56 p.

RODRIGUES, A. B. et al. Chemical Composition, Antimicrobial Activity, and Antioxidant Activity of *Ocotea minarum* (Nees & Mart.) Mez. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2019, 2019.

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

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

ROWNTREE, D. **Statistics without tears: a primer for non-mathematicians.** Michigan: Scribner Book Company, 1981.

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

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

SACCHETTI, G. et al. Essential oils of wild quixos. **Flavour and fragrance journal**, v. 21, n.4, p. 674-676, 2006.

SAMARASEKERA, R.; KALHARI, K. S.; WEERASINGHE, I. S. Insecticidal activity of essential oils of *Ceylon Cinnamomum* and *Cymbopogon* species against *Musca domestica*. **Journal of Essential Oil Research**, v. 18, n. 3, p. 352-354, 2006.

SANTANA, H.T. et al. Essential oils of leaves of Piper species display larvicidal activity against the dengue vector, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v.17, n.1, p.105-111, 2015.

SANTOS, J. L. et al. Oxidative stress biomarkers, nut-related antioxidants, and cardiovascular disease. **Nutrients**, v. 12, n. 3, p. 682, 2020.

SANTOS, S. O.; ALVES, M. V. Sinopse taxonômica da família Lauraceae na porção norte da Floresta Atlântica brasileira. **Revista brasileira de Biociências**, v. 11, n. 1, 2013.

SAUCEDO, É. M. **Estudo da Interação Entre Aedes aegypti e Acanthamoeba Polyphaga.** Dissertação de mestrado (Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2011.

SCALVENZI, L. Larvicidal activity of *Ocimum campechianum*, *Ocotea quixos* and *Piper aduncum* essential oils against *Aedes aegypti*. **Parasite**, v. 26, 23, 2019.

SEHLAPELO, B.M.; DREWES, S.E.; SANDOR P. **Phytochemistry**. v. 32, p. 1352-1353, 1993.

SELLARS, J. D.; STEEL, P. G. Advances in the synthesis of aryltetralin lignan lactones. **European journal of organic chemistry**, v. 2007, n. 23, p. 3815-3828, 2007.

SENANAYAKE, U. M.; LEE, T. H.; WILLS, R. B. H. Volatile constituents of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 26, n. 4, p. 822-824, 1978.

SENTHIL-NATHAN, S. A review of resistance mechanisms of synthetic insecticides and botanicals, phytochemicals, and essential oils as alternative larvicidal agents against mosquitoes. **Frontiers in physiology**, v. 10, p. 1591, 2020.

SERRA, S.; FUGANTI, C. Aromatic annulation on the p-menthane monoterpenes: enantiospecific synthesis of the trans and cis isomers of calamenene and 8-hydroxycalamenene. **Tetrahedron letters**, v. 46, n. 28, p. 4769-4772, 2005.

SETZER, W. N. et al. Inhibition of cruzain by *Ocotea* leaf essential oils from Monteverde, Costa Rica. **Pharmacology online**, v. 3, p. 785-793, 2006.

SHARMA, A. et al. Astilbin: A promising unexplored compound with multidimensional medicinal and health benefits. **Pharmacological research**, p. 104894, 2020.

SHARMA, P.; SHARMA, J. D. In vitro hemolysis of human erythrocytes—by plant extracts with antiplasmodial activity. **Journal of ethnopharmacology**, v. 74, n. 3, p. 239-243, 2001.

SHARMEEN, J. B. et al. Essential Oils as Natural Sources of Fragrance Compounds for Cosmetics and Cosmeceuticals. **Molecules**, v. 26, n. 3, p. 666, 2021.

SIANI, A. C. et al. Óleos essenciais: potencial antiinflamatório. **Biotecnologia: Ciência e Desenvolvimento**, v. 16, p. 38-43, 2000.

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

SILVA, C. B. ***Asemeia extraaxillaris* (Chodat) J.F.B. Pastore & J.R. Abbott (Polygalaceae) E *Microlobius foetidus* (Subsp. Paraguensis (Benth.) M.Sousa et G. Andrade) (Fabaceae-Mimosoideae): CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO FITOQUÍMICO E INVESTIGAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS (alelopática, antiploriferativa, antineoplásica, antimicrobiana, antioxidante, tóxica e larvicida)**. Curitiba/PR, Universidade Federal do Paraná. Tese de Doutorado - Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas: 318, 2014.

SILVA, D. D. da et al. Quantificação do linalol no óleo essencial da *Aniba duckei* utilizando uma nova coluna capilar de POLYH4-MD em cromatografia gasosa. **Química Nova**, v. 26, n.4, 2003.

SILVA, D. T. et al. Physicochemical characterization of leaf extracts from *Ocotea lancifolia* and its effect against wood-rot fungi. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 117, p. 158-170, 2017b.

SILVA, F. L. et al. Antioxidant and Cytotoxic Properties of Essential Oils from Native Brazilian Lauraceae Species. **Global Journal of Medical Research**, v. 19, 2019.

SILVA, I. G. et al. Coclaurine from *Ocotea duckei*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 30, n. 9, p. 881-883, 2002.

SILVA, J. K. et al. Chemical Diversity, Biological Activity, and Genetic Aspects of Three *Ocotea* Species from the Amazon. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 5, p. 1081, 2017a.

SIMAS N. K. et al. Natural products for dengue transmission control — larvicidal activity of *Myroxylon balsamum* (red oil) and of terpenoids and phenylpropanoids. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 46-49, 2004.

- SIMÕES, C.M.O.; SPITZER, V.; Óleos Voláteis. In: SIMÕES, C.M.O. et al., (orgs). **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5ª edição. Universidade UFRGS/ Ed. da UFSC, Porto Alegre. p.467, 2004.
- SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.
- SOLIS, P. N. et al. A new larvicidal lignan from Piper fimbriulatum. **Pharmaceutical Biology**, v. 43, n. 4, p. 378-381, 2005.
- SOUZA, F. N. et al. The innate immunity in bovine mastitis: the role of pattern-recognition receptors. **American Journal of Immunology**, v. 8, n. 4, p. 166-178, 2012.
- SOUZA, G. C. et al. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 90, n. 1, p. 135-143, 2004.
- SOUZA, L. J. **Dengue, zika e chikungunya: diagnóstico, tratamento e prevenção**. Rio de Janeiro: Rubio; 2016.
- SOUZA, M. A. et al. Atividade larvicida de óleos essenciais contra *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Projeto Farmacêutico Atual**, v. 26, 2020.
- SOUZA, T. M. et al. Insecticidal activity against *Aedes aegypti* of m-pentadecadienyl-phenol isolated from *Myracrodruon urundeuva* seeds. **Pest Management Science**, v. 68, p. 1380-1384, 2012.
- STRATIL, P.; KLEJDUS, B.; KUBÁŇ, V. Determination of total content of phenolic compounds and their antioxidant activity in vegetables evaluation of spectrophotometric methods. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 54, n. 3, p. 607-616, 2006.
- SUCUPIRA, N. R. et al. Métodos para determinação da capacidade antioxidante de frutos. **UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde**, v. 14, n. 4, 2012.
- TAKAKU, S.; HABER, W. A.; SETZER, W. N. Leaf essential oil composition of 10 species of *Ocotea* (Lauraceae) from Monteverde, Costa Rica. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, n. 8, p. 525-532, 2007.
- TAUIL, P.L. Perspectivas de controle de doenças transmitidas por vetores no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.39, n.3, p.275-277, 2006.
- THANIGAIVEL, A. et al. Efeito tóxico do óleo essencial e seus compostos isolados de *Sphaeranthus amaranthoides* Burm. f. contra o mosquito vetor da dengue *Aedes aegypti* Linn. **Pesticide biochemistry and physiology**, v. 160, p. 163-170, 2019.
- THE PLANT LIST. 2013. Disponível em: <http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Lauraceae/#statistics>. Acesso em: 29 jul. 2019.

THOMAS, J.; GREETHA, K.; SHYLARA, K. S. Studies on leaf oil and quality of *Cinnamomum zeylanicum*. **Indian Perfum**, v. 31, p. 249-251, 1987.

THOMPSON, J.D. et al. Qualitative and quantitative variation in monoterpene co-occurrence and composition in the essential oil of *Thymus vulgaris* chemotypes. **Journal of Chemical Ecology**, v.29, p. 859- 880, 2003.

THUAN, N. H. et al. Microbial production of astilbin, a bioactive rhamnosylated flavanone, from taxifolin. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 2, p. 36, 2017.

TORRES, J. P. M. et al. Persistent toxic substances in the Brazilian Amazon: contamination of man and the environment. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 6, p. 1175- 1179, 2009.

TROPICOS.ORG. **Missouri Botanical Garden**. Disponível em: <http://www.tropicos.org/Name/17803051> Acesso: 20/07/2018.

TSUJI, S.; KANEKO, K. Genetic Disorders and Oxidative Stress (Especially Chronic Granulomatous Disease). Springer New York. In: **Studies on Pediatric Disorders**, p. 315- 327, 2014.

UHLMANN, L. A. C.; OLIVEIRA, R. J.; SANTOS, M. G. Efeitos alelopáticos de extratos vegetais de *Hancornia speciosa* Gomes na germinação de *Lactuca sativa* L. **Revista Fitos**, v. 12, n. 2, p. 147-160, 2018.

VALENTOVA, K. et al. Antioxidant activity of extracts from the leaves of *Smallanthus sonchifolius*. **European Journal of Nutrition**. v. 42, p. 61-66, 2003.

VALOTTO, C. F. B. et al. Alterações morfo-histológicas em larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762)(Diptera, Culicidae) causadas pelo tanino catéquico isolado da planta do cerrado *Magonia pubescens* (Sapindaceae). **Revista de patologia tropical**, v. 39, n. 4, p. 309-321, 2010.

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

VAN DER WERFF, H.; RICHTER, H. G. Toward an improved classification of Lauraceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, 83, p. 409–418, 1996.

VATTIMO-GIL, I. Nota prévia sobre as espécies de *Ocotea* Aubl. que ocorrem no estado do Paraná. **Arquivos do Serviço Florestal**, v. 10, p. 109-123, 1956.

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

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



- VENDRAMIM, J.D.; CASTIGLIONI, E. Aleloquímicos, resistência de plantas e plantas inseticidas. In: GUEDES, J.C.; COSTA, I.D.; CASTIGLIONI, E. (Org.) **Bases e Técnicas do Manejo de Insetos**. Santa Maria: Pallotti, 2000. p.113-128.
- VIENNET, E. et al. Epidemiology of dengue in a high-income country: a case study in Queensland, Australia. **Parasites & vectors**, v. 7, n. 1, p. 379, 2014.
- VIRELLA, G.(ed.) **Medical Immunology**, 6 ed. New York, Informa. 2007.
- VILLAMIZAR, V. E. M. Metabolitos secundarios con actividad biológica (farmacológica), aplicación etnobotánica; y fotoquímica de algunas especies de los géneros: *cryptocarya*, *litsea*, *caryodaphnopsis*, *machilus* y *actinodaphne* (Lauraceae). **Duazary**, v. 7, n. 1, p. 152-170, 2010.
- VIZZOTO, M.; KROLOW, A. C.; WEBER, G. E. B. **Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado. 2010. 16 p.
- WALLACE, R. J. Antimicrobial properties of plant secondary metabolites. **Proceedings of the nutrition society**, v. 63, n. 4, p. 621-629, 2004.
- WANG, S. et al. Astilbin ameliorates cisplatin-induced nephrotoxicity through reducing oxidative stress and inflammation. **Food and chemical toxicology**, v. 114, p. 227-236, 2018.
- WANG, X. H. et al. Effect of particle size on in vitro and in vivo behavior of astilbin nanosuspensions. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 52, p. 778-783, 2019.
- WASICKY, R. Uma modificação do aparelho de clewenger para extração de óleos essenciais. **Revista da Faculdade de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo**, v.1, n.1, p. 1-112,1963.
- WEIR, T. L.; PARK, S. W.; VIVANCO, J. M. Biochemical and physiological mechanisms mediated allelochemicals. **Curr Opin in Plant Bio**, v.7, n. 4, p. 472-479, 2004.
- WERKA, J. S; BOEHME, A. K; SETZER, W. N. Biological activities of essential oils from Monteverde, Costa Rica. **Natural Product Communication**, v.2, n.12, p. 1215-1219, 2007.
- WINTERBOURN, C. C.; ANTHONY, J. K; MARK, B. H. Reactive oxygen species and neutrophil function. **Annual review of biochemistry**, v. 85, p. 765-792, 2016.
- WONG, S. P.; LEONG, L. P.; KOH, J. H. W. Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. **Food chemistry**, v. 99, n. 4, p. 775-783, 2006.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Dengue**: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. Genève: WHO, 2009.

- XU, W. A. et al. Study on the correlation between constituents detected in serum from Rhizoma *Smilacis Glabrae* and the reduction of uric acid levels in hyperuricemia. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 150, p. 747–754, 2013.
- YAMAGUCHI, K. K. L. et al. Chemical composition and platelet aggregation activity of essential oils of two species of the genus *Ocotea* (Lauraceae). **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 16, p. 518-523, 2013.
- YANKANCHI, S. R.; YADAV, O. V.; JADHAV, G. S. Synergistic and individual efficacy of certain plant extracts against dengue vector mosquito, *Aedes aegypti*. **Journal of Biopesticides**, v. 7, p. 22-8, 2014.
- YAO, L. H. et al. Flavonoids in Food and their Health Benefits. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 59, p. 113-122, 2004.
- YOUSEFI, S. et al. Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. **Cell Death Differ**, v. 16, p. 1438–44, 2009.
- 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.
- ZANIN, S. M. W.; LORDELLO, A. L. L. Alcalóides aporfinóides do gênero *Ocotea* (Lauraceae). **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 92, 2007.
- ZHANG, C. et al. Astilbin decreases proliferation and improves differentiation in haca keratinocytes. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 93, p. 713-720, 2017a.
- ZHANG, H. et al. Astilbin alleviates sepsis-induced acute lung injury by inhibiting the expression of macrophage inhibitory factor in rats. **Archives of pharmaceutical research**, v. 40, n. 10, p. 1176-1185, 2017b.
- ZHAO, J. et al. The inhibitory effect of astilbin on the arteriosclerosis of murine thoracic aorta transplant. **Journal of Huazhong University of Science and Technology [Medical Sciences]**, v. 29, n. 2, p. 212-214, 2009.
- ZHENG, D.; ZHANG, Q. F. Bioavailability Enhancement of Astilbin in Rats through Zein–Caseinate Nanoparticles. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 67, n. 20, p. 5746-5753, 2019.
- ZHENG, W.; WANG, S. Y. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 49, n. 11, p. 5165-5170, 2001.
- ZHENG, Z. G. et al. Macrophage biospecific extraction and HPLC–ESI–MSn analysis for screening immunological active components in *Smilacis Glabrae* Rhizoma. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 77, p. 44-48, 2013.
- ZHU, J., The anthocyanin cyanidin-3-o- $\beta$ -glucoside, a flavonoid, increases hepatic glutathione synthesis and protects hepatocytes against reactive oxygen species during hyperglycemia: involvement of a cAMP/PKA-dependent signaling pathway. **Free Radical Biology Medicine**, v. 52, n. 2, p. 314-327, 2012.

ZHU, Y. et al. Neuroprotective effects of Astilbin on MPTP-induced Parkinson's disease mice: Glial reaction,  $\alpha$ -synuclein expression and oxidative stress. **International immunopharmacology**, v. 66, p. 19-27, 2019.

ZIELINSKI, H.; KOZŁOWSKA H. Antioxidant Activity and Total Phenolics in Selected Cereal Grains and Their Different Morphological Fractions. **Journal of. Agriculture and. Food Chemistry**, v.48, n.6, p. 2008-2016, 2000.

ZOU, S. et al. Astilbin suppresses acute heart allograft rejection by inhibiting maturation and function of dendritic cells in mice. **In: Transplantation proceedings.** Elsevier, 2010. p. 3798-3802.

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

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

ZULUETA, A.; ESTEVE, M. J.; FRÍGOLA, A. ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. **Food Chemistry**, v. 114, n. 1, p. 310-316, 2009.

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



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

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

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


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

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

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

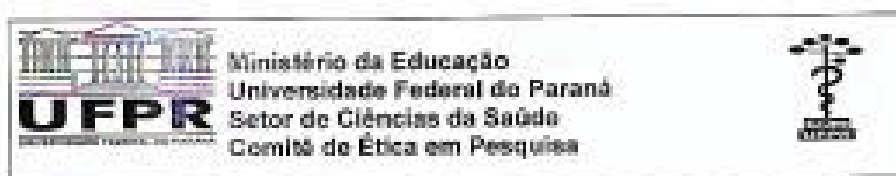
**Validade da Autorização: Cinco anos**, contados da assinatura. Em razão da continuidade do projeto de pesquisa, a instituição detentora desta autorização deverá enviar ao Ibama, a partir da emissão da licença, **relatório anual** sobre a execução das atividades de pesquisa, nos termos do Decreto nº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

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

  
Volney Zanardi Junior  
Presidente

Brasília, 17 de março de 2014.

## ANEXO 2 - APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA CEP/SD 1033.158.10.11



Curitiba, 01 de fevereiro de 2011

Ilmo(a) Sr.(a)  
**Obdulio Gomes Miguel**  
**Josiane de Fátima Gaspari Dias**

**Nesta**

Prezado(a) Pesquisador(a),

Comunicamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "Estudo de produtos naturais sobre a função dos neutrófilos humanos" está de acordo com as normas éticas estabelecidas pela Resolução CNS 196/96, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR, em reunião realizada no dia 01 de dezembro de 2010 e apresentou pendência(s). Pendência(s) apresentada(s), documento(s) analisado(s) e projeto aprovado em 01 de fevereiro de 2011.

Registro CEP/SD: 1033.158.10.11

CAAE: 0090.0.091.000-10

Conforme a Resolução CNS 196/96, solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos.

Data para entrega do relatório final ou parcial: 01/06/2011.

Atenciosamente

  
**Prof. Dr. Ida Cristina Gübert**  
 Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em  
 Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde

## ANEXO 3 - APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA 23075.027346/2013-18



Ministério da Educação  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
Setor de Ciências Biológicas  
Comissão de Ética no Uso de Animais  
(CEUA)



Nº 719

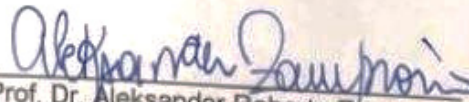
**CERTIFICADO**

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituído pela PORTARIA Nº 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento da CEUA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003 e considerando o contido no Regimento Interno da CEUA, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado, estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

**CERTIFICATION**

The Ethics Animal Experiment Committee of the Setor de Ciências Biológicas of the Federal University of Paraná, established by the DECREE Nº 787/03-BL on June 11th 2003, based upon the RESOLUTION Nº 01/03-BL from May 9th 2003, and upon the CEUA internal regiment, **CERTIFIES** that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the ethical principals established by the Experimental Animal Brazilian Council (COBEA), and with the requirements of the "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

**PROCESSO:** 23075.027346/2013-18**APROVADO:** 11/07/2013 – R.O. 06/2013**TÍTULO:** Ecologia e controle de Culicidae (Diptera) de relevância em saúde pública**AUTORES:** Mario Antonio Navarro da Silva, Anna Julia Pietrobon, Oscar Alexandre Aguirre Obando**DEPARTAMENTO:** Zoologia

  
Prof. Dr. Aleksander Roberto Zamprônio  
Coordenador da CEUA