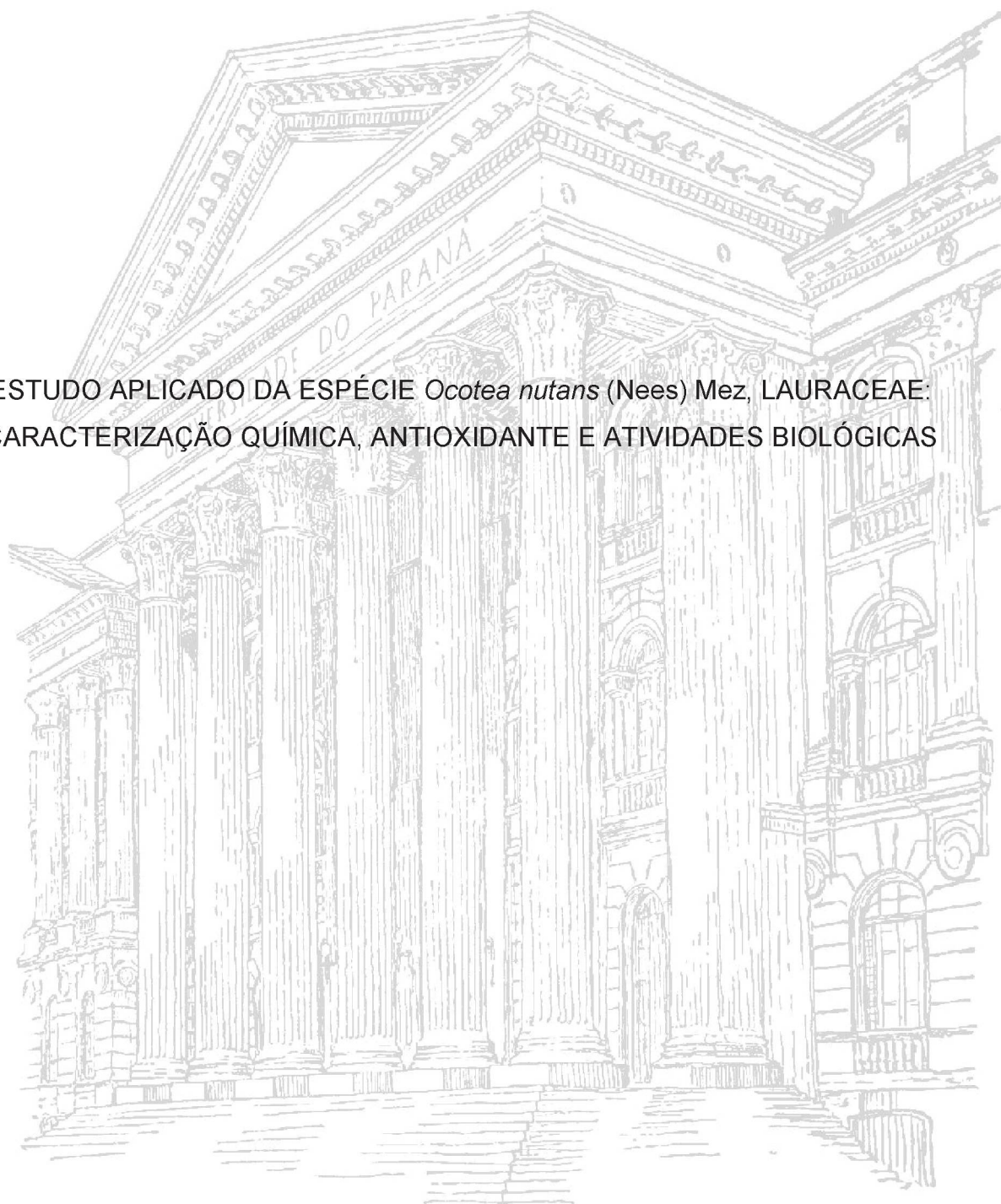


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FERNANDO CESAR MARTINS BETIM

ESTUDO APLICADO DA ESPÉCIE *Ocotea nutans* (Nees) Mez, LAURACEAE:
CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, ANTIOXIDANTE E ATIVIDADES BIOLÓGICAS



CURITIBA

2022

FERNANDO CESAR MARTINS BETIM

ESTUDO APLICADO DA ESPÉCIE *Ocotea nutans* (Nees) Mez, LAURACEAE:
CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, ANTIOXIDANTE E ATIVIDADES BIOLÓGICAS

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

Orientadora: Profa. Dra. Josiane de Fátima Gaspari Dias

Coorientadora: Profa. Dra. Juliana Bello Baron Maurer

Coorientadora: Profa. Dra. Sandra Maria Warumby Zanin

CURITIBA

2022

Betim, Fernando Cesar Martins

Estudo aplicado da espécie *Ocotea nutans* (Nees) Mez., Lauraceae [recurso eletrônico] : caracterização química, antioxidante e atividades biológicas /

Fernando Cesar Martins Betim – Curitiba, 2022.

1 recurso online: PDF.

Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2022.

Orientador: Profa. Dra. Josiane de Fátima Gaspari Dias

Coorientadores: Profa. Dra. Juliana Bello Baron Maurer

Profa. Dra. Sandra Maria Warumbi Zanin

1. *Ocotea*. 2. Óleos voláteis. 3. Toxicidade. 4. Antioxidantes. 5. Larvicidas. I. Dias, Josiane de Fátima Gaspari. II. Maurer, Juliana Bello Baron. III. Zanin, Sandra Maria Warumbi. IV. Universidade Federal do Paraná. V. 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
FARMACÉUTICAS - 40001016042P3

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação CIÊNCIAS FARMACÉUTICAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **FERNANDO CESAR MARTINS BETIM** intitulada: **ESTUDO APLICADO DA ESPÉCIE *Ocotea notans* (Nees) Mez, LAURACEAE: CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, ANTIOXIDANTE E ATIVIDADES BIOLÓGICAS**, sob orientação da Profa. Dra. JOSIANE DE FÁTIMA GASPARI DIAS, que após terem inquirido o aluno 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, 16 de Dezembro de 2022.

JOSIANE DE FÁTIMA GASPARI DIAS
Presidente da Banca Examinadora

CRISTIANE DA SILVA PAULA DE OLIVEIRA
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

WESLEY MAURÍCIO DE SOUZA
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

JANE MANFRON BÜDEL
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA)

VINÍCIUS SEDNARCZUK DE OLIVEIRA
Avaliador Externo (CENTRO UNIVERSITÁRIO INTERNACIONAL - UNINTER)

AGRADECIMENTOS

A Deus.

A minha mãe e ao meu pai por sempre apoiarem minhas escolhas, decisões e me ensinarem a ser sempre forte e não desistir dos meus sonhos. Hoje, eu, consegui chegar até aqui com muita luta. Espero que vocês estejam felizes aí de cima vendo essa conquista. Vocês vão fazer **MUITA** falta aqui nesse dia! Amo vocês – com saudades! ♥

Aos meus irmãos, Adilson, Gelson e Andréia, pela compreensão, incentivo, ajuda e também por fazerem com que meus dias se tornem melhores. Vocês, cada um do seu jeito, são grandes exemplos para mim. Amo vocês!

Aos meus cunhados, Marcos e Angela, que ao longo desses anos me viram crescer e todo o sempre se dispuseram a me ajudar no que eu precisei. Obrigado por fazerem parte da minha família!

Aos meus sobrinhos, Gabriel e Laura, a quem eu deposito todo o meu amor. Saibam que é por vocês que eu luto por um mundo melhor. Obrigado por fazer meus dias mais felizes. Amo vocês!

Aos meus amigos, em especial Cristiane Mendes, Susan Webber, Heloisa Fabri, Lays Testoni, Bruna Diene, Rosane Gomes, Olivia Motta, Isabella Prado, Amanda Cavalho, Franciele Moreira, Layla Chedid, Jafar Hussein, Marie Ferreira, Paola Ohrem, Walkiria Silva, Jônatas Coiado, Patrick Espíndola, Renata Lima, Alex Baurruk, Josiane Soares, Carlos Henrique Jesus, Kelli Nascimento, Fernanda Jefferson, Tiago Rocha, Caroline de Andrade, Reginaldo Menezes. Nossa amizade vai além desse mundo. Amo vocês!

Aos amigos que a pós-graduação me concedeu: Camila Freitas de Oliveira, Aline Bianchini, Ariane Gabriel, Maycon Ribas, Vanessa Barbosa, Angela Souza, Ligia Burci, Beatriz Hirota, Cristiane de Paula, Elisiane Sartor, Caroline Sette, Caroline Gribner, Paula Moura, Katlin Rech, Thays Mayumi, Edneia de Araujo, Thanise Pitelli, Vinicius Bednarczuk, Hayanna Santos, Camila Peitz, Déborah de Souza, Raquely Lenzi. Vocês foram essenciais para que esse sonho existisse. Guardo vocês sempre comigo, obrigado!

A Susan Webber de Souza minha amiga de vida, de duas graduações, de Mestrado e de Doutorado. Obrigado pela oportunidade de compartilhar a sua amizade ao longo desses anos e me acompanhar nas loucuras que escolhemos fazer. Chorei, sofri e ri em todo esse processo e se no final deu certo, eu confesso que, foi porque

você estava ao meu lado. Obrigado por tudo, me orgulho muito do que nos tornamos amiga. Amo você muito!

A Camila Freitas de Oliveira, minha eterna dupla. Ah Cami, eu não sei como começar a agradecer você amiga. Foi você que segurou na minha mão quando entrei no laboratório perdido sem conhecer ninguém e me ajudou tanto desde o início. Foi com você que tive as melhores risadas no dia-dia da rotina, foi você que me acolheu quando eu não sabia o que fazer no laboratório, foram com você às melhores discussões sobre nossos projetos, planejamentos de artigos e as técnicas laboratoriais. Dividi contigo os medos, as expectativas, as inseguranças e também as alegrias de artigos aceitos. Foi com você ao meu lado que surgiu esse sonho de doutorado, nossos planos de vida dentro e fora da vida acadêmica e até o ranço pelas mesmas pessoas. Você foi o presente **mais incrível** que toda essa doideira me proporcionou. Hoje só posso agradecer por tudo o que você me ajudou e sem pedir nada em troca. Você me ajudou por pura amizade, carinho e companheirismo. Espero que logo a gente esteja dando aulas juntos e dividindo o mesmo laboratório de pesquisa, ah, e que a gente seja vizinhos também. Sem você NADA disso seria possível. Obrigado pelo ser humano incrível e cheio de luz que és. Te amo amiga.

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

À minha orientadora Josiane de Fátima Gaspari Dias pelos ensinamentos, paciência, amizade e pelas conversas descontraídas que fizeram com que essa jornada fosse mais fácil. Desculpe as vezes que falhei e obrigado por corrigí-las sempre que conseguiu. Você foi fundamental para que eu chegasse até o fim desse processo. Eu só tenho gratidão por esses 7 anos sendo seu orientado. Obrigado!

À minha coorientadora Juliana Bello Baron Maurer pelos ensinamentos, paciência, amizade e pelas conversas descontraídas. Obrigado por me acolher em seu laboratório e me ajudar tanto. Gratidão por tudo. Obrigado!

À minha coorientadora Sandra Maria Warumby Zanin pelos ensinamentos, paciência, amizade e pelas conversas descontraídas. As tardes foram sempre alegres na sua presença. Os seus conselhos e seu carinho comigo jamais serão esquecidos. Gratidão a sra. e o seu Pedro. Obrigado!

Ao Profs. Obdulio Miguel, Marilis Miguel, Deise Montrucchio pelas incansáveis ajudas e ensinamentos, pelas risadas e brincadeiras e a contribuição ao andamento do trabalho.

A prof. Marilis Dallarmi Miguel pelo acolhimento ainda no mestrado aceitando ser minha orientadora. As conversas, os puxões de orelha, os ensinamentos, as risadas serão guardadas com muito carinho. Gratidão por acreditar no meu potencial e me ajudar. Obrigado!

A banca examinadora dessa tese de doutorado: Prof^a Jane Manfron, Prof^o Vinícius Bednarczuk de Oliveira, Prof^o Wesley Maurício de Souza, Prof^a Cristiane da Silva Paula de Oliveira e Prof^a Deise Prehs Montrucchio. Obrigado por aceitarem o convite para avaliação e as contribuições sugeridas.

Ao Núcleo de Estudos em Produtos Naturais e Farmacotécnica (NEPNF) pelo acolhimento ao longo desses 7 anos, pelo aprendizado, suporte e estrutura. Através dele conheci pessoas incríveis e que vou levar sempre comigo. Me perdoem por não citar todos, são muitos, mas todos tem um lugar especial guardado comigo.

Ao Núcleo Paranaense de Pesquisa Científica e Educacional de Plantas Medicinais (NUPPLAMED) pelo acolhimento ao longo desses 5 anos de Doutorado, pelo aprendizado, suporte e estrutura. Conheci pessoas incríveis e deixo aqui meus agradecimentos: Prof^a Juliana Bello Maurer, Prof^a Selma Faria Zawadzki Baggio, ao Luciano Campestrini, Hayanna Santos, Raquely Lenzi, Deborah Souza, Camila Peitz

Aos técnicos, Graça, Mauricio e Paulo, pelo auxílio e cordialidade. A secretaria do programa PPGCF: em especial a secretária Edneia Hitomi de Araujo.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela bolsa de doutorado cedida – código de financiamento 001.

E a todos aqueles que eventualmente não foram citados, mas que, com certeza, participaram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho

RESUMO

A espécie *Ocotea nutans* (Nees) Mez, pertencente à família Lauraceae, é encontrada no Paraná sendo endêmica da Floresta Ombrófila Mista. A ausência de trabalhos sobre essa espécie motivou o desenvolvimento desse estudo, que teve por objetivos investigar a composição química desta espécie vegetal verificando suas propriedades biológicas e antioxidantes. Através de técnica de ressonância magnética nuclear foram identificados os flavonoides vitexina e isovitexina e por cromatografia de fase gasosa acoplada ao espectrômetro de massas foram identificados os sesquiterpenos óxido de cariofileno e espatulenol como compostos majoritários da folha e caule, respectivamente. As análises de fenólicos totais destacaram as amostras EBF, FAEF, FAEC com alto teor desses compostos. As frações FAEF, FAEC, FCC foram as que apresentaram uma promissora capacidade antioxidante por meio dos métodos do radical DPPH, complexo fosfomolibdênio e azul da Prússia. Ao avaliar a atividade larvívora dos extratos, a FHC foi a que apresentou uma mortalidade acentuada em comparação com as outras frações. O óleo essencial do caule apresentou alta mortalidade das larvas quando comparado ao óleo essencial da folha, porém, nota-se elevada mortalidade para os dois óleos, sugerindo potencial para outros estudos.

Palavras-chave: *Ocotea*; óleos voláteis; toxicidade; antioxidantes; larvívora.

ABSTRACT

The species *Ocotea nutans* (Nees) Mez, belonging to the Lauraceae family, is found in Paraná and is endemic to the Mixed Ombrophylous Forest. The absence of study on this species motivated the development of this work, which aimed to investigate the chemical composition of this plant species, verifying its biological and antioxidant properties. Using the nuclear magnetic resonance, the flavonoids vitexin and isovitexin were identified, and by gas chromatography coupled to a mass spectrometer, the terpenes caryophyllene oxide and spathulenol were identified as major compounds in the leaf and stem, respectively. The total phenolic analysis highlighted the EBF, FAEF, FAEC samples with high phenolic content. The FAEF, FAEC, FCC fractions were the ones that showed a notable antioxidant capacity with the use of the DPPH radical, phosphomolybdenum complex and Prussian blue methods. When evaluating the larvicidal activity of the extracts, the FHC was the one that presented an accentuated mortality in comparison with the other fractions. The essential oil from the stem showed high larval mortality when compared to the leaf oil, however, mortality was observed for both oils, suggesting a potential for further studies.

Keywords: *Ocotea*; volatile oil; toxicity; antioxidants; larvicidal.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. ARTIGOS PUBLICADOS	13
2.1 ARTIGO 1 – <i>Ocotea nutans</i> (Nees) Mez: STRUCTURAL ELUCIDATION OF C-HETEROSIDES FLAVONOIDS AND EVALUATION OF THEIR ANTIOXIDANT AND ANTIBACTERIAL PROPERTIES FROM ETHYL ACETATE EXTRACT	13
2.2 ARTIGO 2 - PRELIMINARY EVALUATION OF THE LARVICIDAL ACTIVITY OF EXTRACTS AND FRACTIONS FROM <i>Ocotea nutans</i> (Nees) Mez AGAINST <i>Aedes aegypti</i>.....	15
3. ARTIGOS A PUBLICAR	16
3.1 CARACTERIZAÇÃO ANTIOXIDANTE E DETERMINAÇÃO DO TEOR DE COMPOSTOS FENOLICOS DOS EXTRATOS DE <i>Ocotea nutans</i> (Nees) Mez.....	16
3.2 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE LARVICIDA DO OLEO ESSENCIAL DE <i>Ocotea nutans</i> (Nees) Mez	26
CONSIDERAÇÕES FINAIS	37
REFERENCIAS.....	38
ANEXO A.....	43
ANEXO B.....	44

1. INTRODUÇÃO

A população utiliza as plantas medicinais, empiricamente, como remédios para determinadas finalidades terapêuticas desconhecendo o metabolismo e a biotransformação que ocorre no corpo humano (FRANCO; FRANCO, 2018).

A ampla utilização das plantas medicinais ocorre devido aos metabólitos produzidos, denominados substâncias ativas, que podem ser alcaloides, óleos essenciais, compostos fenólicos, polissacarídeos, entre outros (KOSEKI et al., 2016). Por meio dessas moléculas ativas e suas relações com as patologias é que ocorre o planejamento de novos fármacos. A identificação das substâncias bioativas aliada aos estudos farmacológicos, biológicos e toxicológicos são de extrema importância para a validação da eficácia e segurança, e para que possam ter sua utilização aprovada (BRASIL, 2013).

A utilização de plantas medicinais está ligada com a terapêutica de metabolitos secundários, embora estudos demonstrem a eficácia e importância terapêutica de compostos derivados do metabolismo primário (SIMOES, 2017).

Diversas famílias e gêneros de plantas vêm sendo utilizados visando à obtenção de macromoléculas bioativas. O gênero *Ocotea* Aubl. é descrito como promissor na obtenção de substâncias de interesse terapêutico (ZANIN; LORDELLO, 2007) apresentam interesse econômico na indústria química, farmacêutica, moveleira e alimentícia (MARQUES, 2001).

Atividades biológicas e farmacológicas foram evidenciadas em espécies de *Ocotea*, como anti-inflamatória (BARRERA; SUAREZ, 2011) cardiovascular (BARBOSA-FILHO et al., 2008), antiplaquetária e anti-trombótica (BALLABENI et al., 2007); citotóxica, antitumoral (GARCEZ et al., 2011) e antinociceptiva (MONTRUCCHIO et al., 2012). Os óleos essenciais do gênero apresentam atividades biológicas e farmacológicas, como antimicrobiana, tóxica (GARRETT et al, 2013), citotóxica (SILVA et al., 2008) anti-inflamatória e gastroprotetora (AMARAL, 2004).

A espécie *Ocotea nutans* (Nees) Mez é uma árvore endêmica do estado do Paraná. A descrição do seu perfil químico vai ao encontro com os metabólitos encontrados no gênero. Podem-se citar os compostos nitrogenados, fenólicos e

terpênicos. Através de microscopia eletrônica ficou evidenciado que a espécie apresenta de células secretoras de conteúdo oleífero e mucilaginoso, e estes, apresentam uma influência direta na produção de óleo essencial e mucilagem (BETIM et al., 2020).

A quantidade de células secretoras de conteúdo oleífero e mucilaginoso aliado as descrições do gênero, em relação às promissoras atividades biológicas e farmacológicas, e a escassez de informações sobre a espécie, justifica realizar a caracterização química do óleo essencial e dos extratos, atividade antioxidante e larvícida das frações e do óleo essencial provenientes da espécie *Ocotea nutans* (Nees) Mez (Lauraceae).

2. ARTIGOS PUBLICADOS

Esta seção apresenta os artigos desenvolvidos ao longo do Doutorado, considerando os publicados. A formatação desse capítulo de tese segue as normas da revista em que o respectivo artigo foi submetido. Os artigos estão disponíveis para consulta ao fim dessa tese.

2.1 ARTIGO 1 – *Ocotea nutans* (Nees) Mez: STRUCTURAL ELUCIDATION OF C-HETEROSIDES FLAVONOIDS AND EVALUATION OF THEIR ANTIOXIDANT AND ANTIBACTERIAL PROPERTIES FROM ETHYL ACETATE EXTRACT

Natural Product Research. <https://doi.org/10.1080/14786419.2021.1931184>

Ocotea nutans (Nees) Mez: elucidação estrutural de flavonoides C-heterosídeos e avaliação das propriedades antioxidante e antibacteriana do extrato acetato de etila.

Ocotea nutans (Nees) Mez: structural elucidation of c-heterosides flavonoids and evaluation of their antioxidant and antibacterial properties from ethyl acetate extract

Fernando Cesar Martins Betim^{1*}, Camila Freitas de Oliveira¹, Katlin Suellen Rech¹, Angela Maria Souza¹, Obdulio Gomes Miguel¹, Marilis Dallarmi Miguel¹, Deise Prehs Montrucchio¹, Juliana Bello Baron Maurer² Josiane de Fátima Gaspari Dias¹

¹*Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Department of Pharmacy, Federal University of Paraná (UFPR), 80210-170, Curitiba, Paraná, Brazil.*

²*Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Paraná (UFPR), 81531-980, Curitiba, Paraná, Brazil*

Abstract:

The *Ocotea* genus exhibits a variety of pharmacological, antibacterial and antioxidant effects. The aim of the present study was to evaluate the antioxidant potential and antibacterial properties of the ethyl acetate fraction of *Ocotea nutans* leaves. Isolation and identification of the phenolic compounds from the fraction was also carried out. The isolated compounds were characterized by one and two dimensional nuclear magnetic resonance analysis and identified as vitexin (1) and isovitexin (2). The ethyl acetate fraction of *Ocotea nutans* leaves demonstrated considerable antioxidant potential. The observed minimum inhibitory concentration of 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ was classified as a moderate antibacterial activity against *Enterococcus faecalis*. Findings from this study demonstrate the utility of this plant as a potential source of antioxidant and antibacterial agents.

Keywords: *Ocotea nutans*; vitexin, isovitexin, antibacterial; antioxidant.

2.2 ARTIGO 2 - PRELIMINARY EVALUATION OF THE LARVICIDAL ACTIVITY OF EXTRACTS AND FRACTIONS FROM *Ocotea nutans* (Nees) Mez AGAINST *Aedes aegypti*

Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine [online]. 2021, v. 54, e0576-2020. ISSN 1678-9849. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0576-2020>

Avaliação preliminar da atividade larvica dos extratos e frações de *Ocotea nutans* contra *Aedes aegypti*

Preliminary evaluation of the larvicidal activity of extracts and fractions from *Ocotea nutans* (Nees) Mez against *Aedes aegypti*

Fernando Cesar Martins Betim^[1], Camila Freitas de Oliveira^[2], Deise Prehs Montrucchio^[1], Obdulio Gomes Miguel^[1], Marilis Dallarmi Miguel^[1], Juliana Bello Baron Maurer^[3], Josiane de Fátima Gaspari Dias^[1]

[1] Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, Paraná, Brasil. [2] Departamento de Farmácia, Universidade Estadual do Centro Oeste (Unicentro), Guarapuava, Paraná, Brasil. [3] Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, Paraná, Brasil.

Abstract

Introduction: *Aedes aegypti* is the main dengue and yellow fever vector. Recently, plant-sourced larvicides have been gaining momentum. **Methods:** The hydroethanolic extracts and fractions of *Ocotea nutans* leaves and stem were bioassayed to determine the larvicidal efficacy of these samples. **Results:** S-HEX (hexane fraction from the stem crude extract) demonstrated high potential for the controlling third-stage larvae, with an LC₅₀ of 14.14 µg.mL⁻¹ required to inhibit 50% of treated larvae. **Conclusion:** Extracts from *O. nutans* were effective against third-stage larvae of *A. aegypti* after 24 h of exposure.

Keywords: *Ocotea nutans*, larvicidal potential, *Aedes aegypti*, Brazilian plant

3. ARTIGOS A PUBLICAR

Esta seção apresenta os artigos desenvolvidos ao longo do Doutorado, considerando os que serão encaminhados à publicação. A formatação desse capítulo de tese segue as normas da revista em que o respectivo artigo será submetido.

3.1 CARACTERIZAÇÃO ANTIOXIDANTE E DETERMINAÇÃO DO TEOR DE COMPOSTOS FENOLICOS DOS EXTRATOS DE *Ocotea nutans* (Nees) Mez

Caracterização antioxidante e determinação do teor de compostos fenolicos e dos extratos de *Ocotea nutans* (Nees) Mez

Fernando Cesar Martins Betim^[1], Juliana Bello Baron Maurer^[2], Josiane de Fátima Gaspari Dias^[1]

[1] Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, Paraná, Brasil. [2] Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, Paraná, Brasil.

Resumo

Espécies da família Lauraceae são utilizadas para tratamentos adjuvantes, como suplemento dietético, na medicina tradicional e na terapia de doenças relacionadas com o estresse oxidativo. O gênero *Ocotea* possui grande potencial para biossíntese de compostos que atuam na capacidade antioxidante gerando uma possível prevenção do estresse oxidativo. O objetivo desse estudo foi realizar a produção de extratos provenientes de *Ocotea nutans* (Nees) Mez e assim, testá-los frente os métodos do radical DPPH, complexo fosfomolibdênio e azul da Prússia e também realizar o conteúdo de fenólicos totais de cada amostra. Ao fim dos testes, nota-se que as frações acetato de etila da folha e do caule foram as que apresentaram maior capacidade antioxidante frente aos métodos testados. A fração acetato de etila da folha apresentou 512 mg.GAE.g⁻¹ em relação ao conteúdo de fenólicos totais. Os achados desse estudo demonstraram que as frações orgânicas da espécie possuem potencial antioxidante.

Introdução

O estresse oxidativo contribui para a patogênese de doenças humanas e muitas plantas são usadas para a terapia complementar de doenças relacionadas ao estresse oxidativo (Li, et al. 2019). O metabolismo secundário das plantas produzem moléculas bioativas (entre elas os compostos fenólicos) responsáveis pela capacidade antioxidante inibindo ou diminuindo o estresse oxidativo (Silva, et al. 2010). Assim, os compostos fenólicos podem ser explorados para prevenção de doenças associadas ao estresse oxidativo, distúrbios neurodegenerativos, cardiovasculares e ao envelhecimento cutâneo (Ganceviciene, et al. 2012), e podem ser importantes para funções realizadas no corpo humano (Petruk, et al. 2018).

As espécies de plantas pertencentes à família Lauraceae são utilizadas para tratamentos adjuvantes, como suplemento dietético, na medicina tradicional e na terapia de doenças relacionadas com o estresse oxidativo (Li, et al. 2019). Esta família apresenta importância econômica, particularmente os gêneros *Cinnamomum*, *Ocotea*, *Nectandra*, *Aniba*, *Persea* e *Laurus*, como fonte de moléculas bioativas, dentre esses destaca-se o gênero *Ocotea* que possui potencial de biossíntese de compostos fenólicos descritos na literatura (Garcez, et al., 2005; Garrett et al., 2012; Lugo et al., 2015).

Nesse contexto, devido a importância dos compostos fenólicos aliado à escassez de estudos de *Ocotea nutans* (Nees) Mez, o objetivo deste estudo foi realizar ensaios de caracterização antioxidante e concentração de compostos fenólicos totais dos extratos e frações da espécie.

Material e métodos

Material botânico

A espécie *Ocotea nutans* (Nees) Mez foi coletada no capão florestal do Centro de Ciências Florestais e da Madeira – capão do CIFLOMA, na cidade de Curitiba-PR, próximo as coordenadas 25°26'55"S 49°14'22"W. A identificação do material vegetal foi realizada pelo especialista Marcelo Leandro Brotto do Museu Botânico Municipal, por comparação com o representante

similar (voucher 56552) depositado no herbário UPCB da Universidade Federal do Paraná.

A pesquisa de *Ocotea nutans* possui cadastro das atividades de acesso ao patrimônio genético constante no processo de código A0EB51A no SisGen.

Obtenção de extratos e frações

As folhas e os caules de *Ocotea nutans* foram secos e triturados em moinho de facas e martelo. Para obtenção do extrato bruto foram utilizados 600g de folhas e caules secos. O material foi levado à extração, em separado, em aparelho de Soxhlet, sob contínuo refluxo, ao longo de 12 h à 80°C utilizando etanol 96°GL como solvente extrator. O extrato obtido foi filtrado e concentrado em evaporador rotativo com pressão reduzida à temperatura de 80°C e 90 rpm até a redução a 1/3 do seu volume inicial. Ao fim da extração foi obtido o extrato bruto da folha (EBF) e o extrato bruto do caule (EBC). Uma alíquota do extrato bruto da folha e do caule foi reservada, e o restante foi levado, em separado, ao fracionamento líquido-líquido em aparelho de Soxhlet modificado. O produto remanescente da última etapa de fracionamento foi denominado como fração residual.

Após o fracionamento foram obtidas quatro frações orgânicas do extrato bruto: fração hexano (FHF), fração acetato de etila (FAEF), fração clorofórmio (FCF) e a fração residual (FRF) provenientes do EBF e adicionalmente, fração hexano (FHC), fração acetato de etila (FAEC), fração clorofórmio (FCC) e a fração residual (FRC) provenientes do EBC.

Determinação do teor de fenólicos totais

A metodologia utilizada para avaliar o teor de fenólicos totais (TFT) foi o Folin-Ciocalteu (Singleton, 1999). Os extratos e frações foram diluídos em metanol PA e testados nas concentrações entre 40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 600 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. As amostras diluídas foram misturadas com reagente de Folin-Ciocalteu e água deionizada e deixadas em repouso durante 10 min. Na etapa seguinte adicionou-se solução aquosa de carbonato de sódio (10%). Após 30 minutos, à

temperatura ambiente, a absorbância das amostras foi medida em espectrofotômetro a 760 nm. O valor de TFT foi calculado usando uma curva de calibração construída com ácido gálico padrão. Os resultados foram expressos em miligramas de equivalentes de ácido gálico (mg.GAE.g⁻¹)

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

A análise foi realizada de acordo com Mensor et al (2001). A solução de DPPH• foi preparada a 0,03 mmol.mL⁻¹ em metanol absoluto no momento do ensaio. As amostras foram diluídas em metanol e as concentrações variaram de 5 µg.mL⁻¹ a 450 µg.mL⁻¹. Nos tubos contendo a amostra foi adicionado 1 mL da solução de DPPH•. Como padrão foi utilizado o ácido ascórbico (1,6 a 8 µg.mL⁻¹). Como branco foi utilizado 2,5 mL de metanol e 1 mL de DPPH•. A amostra foi deixada em contato com o DPPH• por 30 min, onde a absorbância foi medida em 518 nm, e o potencial antioxidante calculado. A capacidade dos extratos e frações em reduzir o radical livre foi calculada segundo a seguinte fórmula:

$$(1) \% \text{ inibição do DPPH} = 100 - (\text{Abs. amostra} - \text{Abs. branco}) \times 100 \text{ Abs. Controle}$$

A análise estatística para verificação da variância (ANOVA) foi aplicada juntamente com Duncan, o qual localizou a diferenças das amostras.

Formação do complexo fosfomolibdênio

Essa técnica foi realizada com base no método descrito por Prieto, Pineda e Aguilar (1999), com fundamento na redução do molibdênio (VI) em molibdênio (V) na presença de determinadas substâncias com capacidade antioxidante, formando um complexo verde entre fosfato/molibdênio (V). Para a realização deste método o reativo foi preparado através da adição de uma solução com fosfato de sódio 0,1 M (28 mL), molibdato de amônio 0,03 M (12 mL) e ácido sulfúrico 3 M (20 mL), completando com água q.s.p 100 mL preparado no momento de sua utilização. Como padrão foi utilizado o ácido ascórbico. Os extratos, frações e soluções utilizadas como padrão estavam na

concentração de 200 µg/mL em metanol (Bianco, 2003). Em um tubo de ensaio foi adicionado uma alíquota de 0,3 mL da amostra e adicionado 1 mL do reativo. O mesmo foi realizado para os padrões e para o controle negativo, constituído de 0,3 mL de metanol e 1 mL do reativo. Os tubos da análise foram levados ao banho-maria à 95°C por 90 min e após resfriados a temperatura ambiente a leitura realizada em 695 nm. As análises dos extratos, frações e padrões foram realizadas em triplicata. A capacidade antioxidante foi avaliada por meio da fórmula abaixo, sendo demonstrada a capacidade dos extratos e frações frente ao ácido ascórbico

AA% em relação ao ácido ascorbico = $\frac{\text{Abs. (amostra)} - \text{Abs. (branco)}}{\text{Abs. (vitamina C)} - \text{Abs. (Branco)}} \times 100$

Ensaio do poder redutor pelo complexo Azul da Prússia

No ensaio do poder redutor pelo complexo Azul da Prússia, os extratos e frações foram diluídos em água na concentração de 200 µg.mL⁻¹. Para a análise foram transferidos 1 mL das amostras para tubos de ensaio, juntamente com 2,5 mL de tampão fosfato de potássio (0,2 mol.L⁻¹) e 2,5 mL da solução de ferricianeto de potássio a 1,0%. A mistura foi incubada a 45°C durante 20 minutos e, depois, adicionado 2,5 mL de ácido tricloroacético a 1% aos tubos de ensaio. Aproximadamente 2,5 mL das soluções foram transferidas para tubos de ensaio e adicionados 1,5 mL de H₂O destilada, 1,0 mL de etanol PA e 0,5 mL de FeCl₃ à 1,0% (m/V) foram adicionados. A leitura foi realizada a 700 nm (Yen; Chen, 1995; Jayanthi; Lalitha, 2011).

Resultados e discussão

Na tabela 1 estão listados os resultados obtidos do potencial antioxidante dos extratos e frações de *O. nutans* e valor do teor de compostos fenólicos.

Tabela 1 – Potencial antioxidante e teor de compostos fenólicos e flavonoides

Amostras	TFT (mg EAG.g ⁻¹)	DPPH• IC ₅₀ (µg.mL ⁻¹)	Complexo fosfomolibdênio (%)	Complexo Azul da Prússia (%)
EBF	339,74	25,62 ± 0,85	25,62	43,34
FHF	59,61	89,21 ± 0,24	27,25	36,62
FCF	77,12	79,66 ± 0,09	25,91	30,99
FAEF	512,00	11,02 ± 0,11	67,49	76,56
FRF	53,01	156,64 ± 0,75	16,01	19,91
EBC	87,01	42,58 ± 0,54	35,08	42,33
FHC	55,51	62,18 ± 0,99	31,05	26,48
FCC	119,04	46,08 ± 0,98	51,75	63,31
FAEC	314,78	33,09 ± 0,35	49,37	64,22
FRC	63,54	109,08 ± 1,07	21,61	33,21
Ácido ascórbico	-	4,22 ± 0,04	100%	100%

LEGENDA: EBF - (extrato bruto da folha). FHF - (fração hexano da folha). FAEF - (fração acetato de etila da folha). FCF - (fração clorofórmio da folha). FRF - fração residual (FRF). EBC - extrato bruto do caule. FHC - fração hexano do caule. FAEC - fração acetato de etila do caule. FAEC - fração acetato de etila do caule. FCC - fração clorofórmio do caule. FRC - fração residual do caule. TFT – Teor de flavonoides totais.

Analisando os resultados, observa-se que todos os extratos e frações possuem alta concentração de compostos fenólicos, com destaque para as amostra EBF, FAEF, FAEC.

Autores indicam com frequência a presença de compostos fenólicos no gênero *Ocotea* (Garcez et al., 1995; Garcez et al., 2005; Garrett et al., 2012; Lugo et al., 2015). A quantidade de fenólicos totais em plantas é classificada como alta quando o valor de TFT é superior a 50 mg.EAG.g⁻¹ (Chew et al., 2011).

Os diferentes tipos de radicais livres e as suas diferentes formas de atuação nos organismos vivos dificultam o uso de um único método analítico simples e universal para detectar o potencial antioxidante e relacioná-la quantitativamente (Alves et al., 2010). Assim, tem-se utilizado vários métodos para avaliar o potencial de compostos antioxidante de compostos naturais,

correlacionando qualitativamente o resultado obtido com os sistemas geradores de radicais livres empregados nos testes. No estudo realizado, os testes utilizados apresentaram sensibilidade ao reagir com os radicais e as amostras testadas demonstraram apresentar qualitativamente um potencial antioxidante.

O método DPPH• avalia a capacidade da amostra em reduzir 50% do radical livre DPPH•, sendo este radical instável, que recebe o elétron da substância oxidante da fração e consequentemente oxida a substância alterando sua cor (Molyneux, 2004). As amostras EBF, FAEF e FAEC apresentaram uma maior capacidade antioxidante pelo método do DPPH• quando comparado ao ácido ascórbico. Rebouças et al. (2015) evidenciou a presença de potencial antioxidante pelo método DPPH• da fração acetato de etila de *Ocotea pulchella* (Nees) Mez ($IC_{50} = 4.2 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e a considerou como um potencial antioxidante elevado. Yamaguchi et al. (2012) demonstrou a presença de potencial antioxidante do extrato bruto das folhas ($IC_{50} = 8,21 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e dos caules ($IC_{50} = 9,08 \mu\text{g.mL}^{-1}$) de *Ocotea minor* Vicent.

O método de fosfomolibdenio possui a vantagem de avaliar a capacidade antioxidante de componentes lipofílicos e hidrofílicos presentes na amostra, ou seja, mede a capacidade antioxidante total (Prieto, Pineda; Aguilar et al., 1999). O método se baseia na redução de Mo (IV) para Mo (V) pelo analito da amostra e a subsequente formação de compostos de fosfato Mo (V) de coloração verde e com uma absorção máxima a 695 nm. No ensaio realizado as frações FAEF, FAEC, FCC foram as que apresentaram maior capacidade antioxidante quando comparado ao ácido ascórbico. Rebouças et al. (2015) relata a redução do complexo fosfomolibdenio na fração acetato de etila da folha de *Ocotea pulchella* (36,5% em relação ao ácido ascórbico)

O complexo redutor azul da Prússia baseia-se no método de redução de Fe^{3+} para Fe^{2+} . O resultado da oxirredução é presenciado pela formação do completo ferrocianeto redutor atribuindo coloração azul da Prússia em interação biológica com os grupamentos dos compostos fenólicos presentes na fração acetato de etila (Yen; Chen, 1995; Jayanthi; Lalitha, 2011). No ensaio realizado as amostras FAEF, FAEC, FCC foram as que apresentaram maior poder redutor quando comparado ao ácido ascórbico. Rebouças (2015) utilizou o método azul prussiano e relatou o potencial da fração acetato de etila da espécie *Ocotea pulchella* (26,1 % em relação ao ácido ascórbico).

As diferenças entre os resultados obtidos pelas três técnicas podem estar associadas aos mecanismos de ação envolvidos nos métodos e a hidro/lipofilicidade das substâncias antioxidantes. Relata-se também que a reatividade química do antioxidante e a interação do radical com seu alvo de oxidação dependem de fatores extrínsecos a técnica e devem ser avaliados conforme interesse do estudo realizado (Alves, et al., 2010)

Conclusão

Ao fim das análises realizadas, nota-se que todas as amostras testadas apresentaram um conteúdo de fenólicos totais em alta concentração. Nota-se também uma capacidade antioxidante nas amostras o que varia conforme o ensaio utilizado e sua capacidade de reagir com as frações. As frações acetato de etila da folha e do caule foram as que apresentaram maior sensibilidade e potencial antioxidante quando se leva em consideração os resultados nos três testes.

Referências

- Alves CQ, David JM, David JP, Bahia MV, Aguiar RM. (2010). Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. Química Nova, 2010; 33: 2202-2210.
- Carvalho JLS, Cunico MM, Dias JFG, Miguel MD, Miguel OG. Termoestabilidade de processos extrativos de *Nasturtium officinale* R. Br., Brassicaceae por sistema Soxhlet modificado. Química Nova. 2009; 32: 1031-1035.
- Chew YL, Chan EWL, Tan PL, Lim YY, Stanslas J, Goh JK. Assessment of phytochemical content, polyphenolic composition, antioxidant and antibacterial activities of Leguminosae medicinal plants in Peninsular Malaysia. BMC Complementary and Alternative Medicine, 2011; 11: 12
- Choi JS, Nurul-Islam M, Yousof-Ali M, Kim EJ, Kim YM, Jung HA. Effects of C-glycosylation on anti-diabetic, anti-Alzheimer's disease and anti-inflammatory potential of apigenin. Food and Chemical Toxicology, 2014; 64: 27-33.
- Demir-Özkay U, Can D. (2013). Anti-nociceptive effect of vitexin mediated by the opioid system in mice. Pharmacology Biochemistry and Behavior. 2013; 109: 23-30

- Dong L, Fan Y, Shao X, Chen Z. Vitexin protects against myocardial ischemia/ reperfusion injury in Langendorff-perfused rat hearts by attenuating inflammatory response and apoptosis. *Food Chem Toxicol.* 2011;49: 3211-6.
- Silva MLC, Costa RS, Santana AS, Koblitiz MGB, Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais *Semina: Ciências Agrárias*, 2010; 31: 669-682
- Ganceviciene R, Liakou AI, Theodoridis A, Makrantonaki E, Zouboulis CC. "Skin anti-aging strategies," *Dermato-Endocrinology*, 2012; 4: 308–319
- Garcez WS, Yoshida M, Gottlieb OR. Benzylisoquinoline alkaloids and flavonols from *Ocotea vellosiana*. *Phytochemistry*, 1995; 39: 815-816
- Garcez WS, Garcez FR, Silva IMGE, Shimabukuro AA. Indole alkaloid and other constituents from *Ocotea minarum*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 2005; 16: 1382-1386
- Garrett, R.; Romanos, M. T. V.; Borges, R. M.; Santos, M. G.; Rocha, L.; Silva, A. J. R. da. (2012) Antiherpetic activity of a flavonoid fraction from *Ocotea notata* leaves. *Revista Brasileira Farmacognosia*, 2012; 22: 306-313.
- He M, Min JW, Kong WL, He XH, Li JX, Peng BW. A review on the pharmacological effects of vitexin and isovitexin. *Fitoterapia*. 2016; 115 :74-85.
- Jayanthi P, Lalitha P. Reducing power of the solvent extracts of *Eichhornia crassipes* (mart.) Solms. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 2011; 3: 126-128
- Latha S, Daniel M. Phenolic antioxidants of some common pulses. *Journal of Food Science and Technology (India)*, 2001; 38: 272-273
- Li AL, Li GH, Li YR, Wu XY, Ren DM, Lou HX, Wang XN, Shen T. Lignan and flavonoid support the prevention of cinnamon against oxidative stress related diseases, *Phytomedicine*, 2019; 53: 143-153
- Li YL, Ma SC, Yang YT, Ye SM, But PP. Antiviral activities of flavonoids and organic acid from *Trollius chinensis* Bunge. *Journal of Ethnopharmacology*. 2002; 79: 365-368
- Lugo MCR. Metabolitos secundários aislados de hojas de *Ocotea heterochroma* (Lauraceae) [thesis] Colômbia.: Universidad Nacional de Colômbia; 2015
- Mensor LL, Menezes FS, Leitão GG, Reis AS, dos Santos TC, Coube, CS, Leitão SG. Screening of brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phyt.Res.* 2001; 15: 127-130.
- Molyneux P. The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Journal of Science and Technology*, 2004; 26: 211–219
- Pereira CAM, Vilegas JH, Mccullagh M. Distinction of the C-glycosylflavone isomer pairs orientin/isoorientin and vitexin/isovitexin using HPLC-MS exact mass measurement and in-source CID. *Phytochemical Analysis*, Inglaterra, 2005; 16: p. 295-301.

- Petruk G, Del Giudice R, Rigano MM, Monti DM. Antioxidants from Plants Protect against Skin Photoaging. *Oxid Med Cell Longev*. 2018; 2018: 1454936.
- Praveena R, Sadasivam K, Kumaresan R, Deepa V, Sivakumar R. Experimental and DFT studies on the antioxidant activity of a C-glycoside from *Rhynchosia capitata*. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2013; 103: 442-452
- Prieto P, Pineda M, Aguilar M. (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical biochemistry*, 1999; 269: 337–341
- Rebouças AC, da Silva CB, Dalarmi L, de Oliveira M, Rech KS, Dias JFG, Zanin SMW, Kerber VA, Miguel OG, Miguel MD. *In vitro* antioxidant action of the crude ethanolic extract from the leaves of *Ocotea pulchella* (Nees & Mart.) and their fractions. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2015; 9: 145-153
- Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in enzymology*. 1999; 299: 152- 172.
- Valente LMM, Alves FF, Bezerra GM, Almeida MBS, Rosario SL, Mazzei JL, d'Avila LA, Siani AC. (2006). Desenvolvimento e aplicação de metodologia por cromatografia em camada delgada para determinação do perfil de alcalóides oxindólicos pentacíclicos nas espécies sul-americanas do gênero *Uncaria*. *Revista Brasileira de Farmacog*. 2006; 16: 216-223
- Wagner H. *Plant Drugs analysis*. 2 ed. Berlin: Springer; 1996: 298-299, 319-319
- Yen GC, Chen HY. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* ,1995; 43: 27-32
- Yang SH, Liao PH, Pan YF, Chen SL, Chou SS, Chou MY. The Novel p53-Dependent Metastatic and Apoptotic Pathway Induced by Vitexin in Human Oral Cancer OC2 Cells. *Phytotherapy research*. 2013; 27: 1154-1161
- Zhang J, Yuan K, Zhou W, Zhou J, Yang P. Studies on the active components and antioxidant activities of the extracts of *Mimosa pudica* Linn. from southern China *Pharmacogn Mag*. 2011; 7: 35–39.
- Zucolotto SM, Fagundes C, Reginatto FH, Ramos FA, Castellanos L, Duque C, Schenkel EP. Analysis of C-glycosyl flavonoids from South American *Passiflora* Species by HPLC-DAD and HPLC-MS. *Phytochemical Analysis*, 2012; 23: 232-239.

3.2 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE LARVICIDA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Ocotea nutans* (Nees) Mez

Fernando Cesar Martins Betim^[1], Juliana Bello Baron Maurer^[2], Josiane de Fátima Gaspari Dias^[1]

[1] Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, Paraná, Brasil. [2] Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, Paraná, Brasil.

RESUMO

O gênero *Ocotea* Aubl. é o maior gênero entre as Lauraceae sendo que, no Brasil, 175 espécies são descritas. O óleo essencial do gênero é bastante utilizado com grandes potenciais descritos, como antioxidante, antibacteriano, citotóxico. A espécie *Ocotea nutans* (Nees) Mez é endêmica do Sul do Brasil e possui pouco estudo acerca do seu óleo essencial. O objetivo desse estudo é caracterizar quimicamente o óleo essencial obtido das folhas e caules e avaliar o potencial larvicida frente ao vetor *Aedes aegypti*. O óleo essencial extraído da folha apresentou composto majoritário o sesquiterpeno óxido de cariofileno, enquanto que o óleo extraído do caule evidenciou o sesquiterpeno espatulenol como composto principal. O resultado da atividade larvicida indicou potencial na mortalidade das larvas com $LC_{50} = 119,32 \mu\text{g.mL}^{-1}$ do óleo essencial da folha, e uma $LC_{50} = 39,32 \mu\text{g.mL}^{-1}$ do óleo essencial do caule. Os resultados obtidos indicam potencial larvicida e que estudos complementares podem ser realizados.

Introdução

Lauraceae Juss. é uma importante família de Angiospermas e compreende a 55 gêneros (Trofimov & Rohwer, 2020), ocorrendo em áreas tropicais, com poucos membros em regiões temperadas, e com 26 gêneros habitando o Brasil (Flora do Brasil, 2022a). O gênero *Ocotea* Aubl. consiste em aproximadamente 700 espécies e é o maior gênero entre as Lauraceae (Trofimov & Rohwer, 2020) sendo que, no Brasil, 175 espécies são descritas (Flora do Brasil, 2022a).

Óleo essencial do gênero *Ocotea* tem evidenciado atividades biológicas: cardiovascular (Barbosa-Filho *et al.*, 2008), antifúngica, antibacteriana (Garrett *et al.*, 2007), anti-inflamatória (Ballabeni *et al.*, 2010) (Ballabeni *et al.*, 2007) citotóxica (Gribner *et al.*, 2020) e larvicida (Damasceno, 2021).

A espécie *Ocotea nutans* (Ness) Mez, popularmente conhecida como canela ou canelinha, é uma árvore que mede de 10-30 m de altura e é frequentemente encontrada em Floresta Ombrófila Mista (Brotto, Cervi, Santos, 2013). Essa espécie nativa brasileira é distribuída geograficamente nos Estados do Paraná, São Paulo, Espírito Santo, Minas Gerais e Bahia (*Ocotea* in Flora do Brasil, 2022b).

No presente estudo, a composição química do óleo essencial das folhas e caules de *O. nutans* foi analisada por cromatografia em fase gasosa acoplada ao espectômetro de massas e as amostras testadas quanto ao seu potencial larvicida em *Aedes aegypti*.

Material e métodos

Material botânico

A espécie *Ocotea nutans* (Nees) Mez foi coletada no capão florestal do Centro de Ciências Florestais e da Madeira – capão do CIFLOMA, na cidade de Curitiba-PR, próximo as coordenadas 25°26'55"S 49°14'22"W. A identificação do material vegetal foi realizada, pelo especialista Marcelo Leandro Brotto do Museu Botânico Municipal, por comparação com o voucher 56552 depositado no herbário UPCB da Universidade Federal do Paraná.

A pesquisa com a espécie vegetal *Ocotea nutans*, possui cadastro das atividades de acesso ao patrimônio genético constante no processo de código A0EB51A no SisGen.

Extração do óleo essencial

Utilizou-se como método para a extração e obtenção do óleo essencial a hidrodestilação por arraste de vapor d'água, realizado em aparato de Clevenger (Brasil, 2019). As folhas e caules foram secos a temperatura ambiente (600 g), triturados e acondicionado, separadamente, em balão de fundo redondo de 3000 mL, adicionando-se quantidade suficiente de água destilada (5 a 10 vezes o seu peso) para cobrir o material e permitir a extração. O balão foi conectado ao equipamento e submetido a uma temperatura em torno de 100°C, com tempo de extração de 6 h. Ao término de cada extração foram obtidas duas alíquotas de óleo essencial proveniente de cada amostra, sendo então nomeadas como: óleo essencial da folha (OEF) e óleo essencial do caule (OEC). Logo, anotou-se o volume de óleo obtido pela leitura no tubo com escala de graduação. O óleo essencial obtido de cada amostra foi armazenado em freezer para conservação.

O rendimento foi calculado em mililitros (mL) de óleo essencial por 100 g do vegetal (mL%), conforme preconiza a Farmacopeia Brasileira (Brasil, 2019).

Cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM)

As análises foram realizadas com a injeção de 0,02 µL de óleo essencial, diluído em 1mL de hexano grau HPLC, em equipamento de Cromatografia em Fase Gasosa acoplado à Espectrômetria de Massas (GC-MS/MS), marca SHIMADZU® (Quioto, Quioto, Japão) (modelo GC-2010Plus), detector de massas do tipo triplo quadrupolo (modelo TQ8040 com ionização por elétrons) e injetor automático (modelo AOC-5000 Plus). A coluna instalada foi uma Coluna capilar DB-5 (Agilent Technologies, Santa Clara, Califórnia, EUA), fase estacionária não polar (5%-Phenyl)-methylpolysiloxane), comprimento 30 m, diâmetro interno 0,25 mm, espessura do filme 0,25 µm. A programação do equipamento partiu da temperatura de injeção a 250 °C, modo

de injeção split, utilizando hélio como gás de arraste, pressão de 59.0 kPa, com vazão do gás de arraste em 1.02 mL.min⁻¹ e com o forno com temperatura inicial de 60°C, com taxa de aquecimento de 3 K.min⁻¹, com isoterma final a 250°C por 5 min.

A composição química dos óleos essenciais foram determinadas por comparação dos espectros de massas obtidos das substâncias analisadas bem como através da comparação de seus índices de retenção com os encontrados em literatura (ADAMS, 2017; National Institute of Standards and Technology-NIST, 2022 e The Human Metabolome Database-HMDB, 2022).

Avaliação da atividade larvicida em Aedes aegypti

A metodologia utilizada foi adaptada de Who (2005), Fujiwara et al. (2017) e Betim et al. (2021). Para a avaliação da atividade larvicida, ovos de *A. aegypti* (cepa Rockefeller cedida pela Fundação Oswaldo Cruz) foram eclodidos em laboratório a 25 ± 3°C, umidade relativa de 80%, em estufa B.O.D. e alimentados com ração para peixes (Aldonbasic, complexo MEP 200) até o terceiro estágio de desenvolvimento larval. As amostras foram diluídas em 0,5% de polissorbato 80 em concentrações de 1000, 100, 10 µg.mL⁻¹. Após a eclosão, 10 larvas foram tratadas com os controles água, polissorbato 80 e com as amostras por 24 h. Posteriormente as larvas vivas e mortas foram contadas para cada tratamento. O teste foi conduzido em triplicata (30 larvas para cada concentração de amostra).

O método probito (Finney, 1971) foi usado para determinar os valores da concentração letal (LC₅₀ e LC₉₀), que corresponde a intervalos de confiança de 95%. Todas as análises estatísticas foram realizadas usando IBM SPSS Statistics versão 20.0 (IBM Corp., Armonk, NY, EUA).

Resultados e discussão

O rendimento do óleo essencial de *Ocotea nutans*, obtido por meio de hidrodestilação por arraste de vapor d'água em aparelho de Clevenger foi de 0,14% (m/v) em relação s folhas e de 0,23% (m/v) em relação ao caule. O rendimento foi semelhante ao relatado para outras espécies do gênero, tais

como: *Ocotea notata* (Nees & Mart.) Mez 0,12% (p/V) (Garrett et al.,2007), *Ocotea leucoxylon* (Sw.) Laness. 0,13% (p/V), *Ocotea minor* Vicent. 0,11% (p/V) (Yamaguchi, 2011) e *Ocotea nigrescens* Vicent. 0,23% (p/V). Fatores ambientais a que as espécies vegetais estão sujeitas como luz, temperatura e umidade, origem botânica e quimiotipo têm demonstrado influenciar significativamente a produção de compostos voláteis, alterando o rendimento e a composição (Simões, et al . 2017)

O cromatograma obtido a partir da análise de CG/EM do óleo essencial de folhas e de caule de *Ocotea nutans* está disponível em Anexo 1 . A identificação dos compostos foi efetuada por comparação com os espectros da biblioteca NIST 2014 (banco de dados do sistema) e por comparação com espectros de referências bibliográficas descritos por Adams (2017). Os compostos químicos identificados na composição química dos óleos essenciais, por análise em CG/EM estão descritos na tabela 1.

Tabela 1 - Compostos químicos do óleo essencial de *Ocotea nutans* identificados por CG-EM

Compostos*	RI ^a	% RA ^b		Identificação
		Folha	Caule	
Terpine-4-ol	1178	0,33	-	RI, MS
<iso-> Mentol	1184	0,26	-	RI, MS
Mirtenol	1193	0,29	-	RI, MS
Cumin-aldeído	1239	0,46	-	RI, MS
<trans> ascaridol-glicol	1241	0,23	-	RI, MS
N/I	1274	0,37	-	RI, MS
Etil-2-octanoato	1282	0,31	-	RI, MS
γ - elemeno	1343	-	0,48	RI, MS
silfineno	1344	0,44	-	RI, MS
α-cubebeno	1348	0,50	-	RI, MS
α-metil-benzil-butirato	1364	-	0,39	RI, MS
Ciclosativeno	1366	0,38	-	RI, MS
Hidroxi-citronelol	1371	-	0,50	RI, MS
α – ylangeno	1372	0,48	-	RI, MS
α – copaeno	1384	-	0,47	RI, MS
β – burboneno	1385	0,39	-	RI, MS
Z-cariofileno	1413	-	0,79	RI, MS
α – gurjuneno	1415	0,78	-	RI, MS
E – cariofileno	1428	-	3,53	RI, MS
β – copaeno	1430	3,50	-	RI, MS
Neril-acetona	1436	-	1,67	RI, MS
<(Z)-β-> farneseno	1438	1,78	-	RI, MS

<α-> himachaleno	1451	0,62	0,36	RI, MS
<(2Z,6E)> - 1-dodecadienal	1453	-	1,60	RI, MS
Allo-aromadendreno	1455	1,63	-	RI, MS
<α – neo-> - cloveno	1466	-	0,62	RI, MS
Cis- muurola 3,5-dieno	1468	0,28	-	RI, MS
<9-epi-(E)->cariofileno	1469	-	0,62	RI, MS
Cadina-1(6),4-iene<trans->	1471	0,61	-	RI, MS
Etil-cinamato	1473	-	0,53	RI, MS
α - acoradieno	1475	0,84	-	RI, MS
α - macrocarpeno	1476	-	1,04	RI, MS
γ - muuroleno	1478	1,86	3,72	RI, MS
Geranil propanoato	1480	3,50	-	RI, MS
β - chamigreno	1482	-	0,97	RI, MS
N/I	1484	0,84	-	RI, MS
γ – gurjuneno	1486	0,71	-	RI, MS
N/I	1489	-	0,75	RI, MS
γ – himachaleno	1491	0,71	-	RI, MS
N/I	1492	-	0,65	RI, MS
α - amorfeno	1494	0,66	-	RI, MS
α - zingibereno	1504	-	2,02	RI, MS
β - macrocarpeno	1505	1,10	-	RI, MS
β – himachaleno	1506	0,80	-	RI, MS
α - mureleno	1508	0,55	0,61	RI, MS
Epizonareno	1511	0,43	-	RI, MS
<trans-> calameneno	1512	-	2,05	RI, MS
δ - amorfeno	1514	2,05	0,85	RI, MS
<trans> calameneno	1517	0,71	0,47	RI, MS
Italiceno	1519	0,45	1,37	RI, MS
B - curcumeno	1521	1,30	-	RI, MS
Nootkateno	1528	0,34	-	RI, MS
Cadina-1,4-diene<trans->	1534	-	0,83	RI, MS
A - calacoreno	1536	0,88	-	RI, MS
Liguloxido	1539	-	0,97	RI, MS
Sesquisabineno	1541	1,10	-	RI, MS
Veltonal	1542	-	3,06	RI, MS
N/I	1544	2,63	-	RI, MS
Elemol	1549	-	1,09	RI, MS
N/I	1552	0,74	-	RI, MS
N/I	1556	0,38	1,09	RI, MS
Ocidentalol	1558	1,35	0,73	RI, MS
N/I	1560	0,61	-	RI, MS
N/I	1566	0,54	-	RI, MS
Maaliol	1569	-	4,58	RI, MS
Germacreno D	1571	4,40	-	RI, MS
Espatuleno	1574	-	21,82	RI, MS
Cariofileno óxido	1576	21,02	-	RI, MS
Dendrolasin	1580	-	0,78	RI, MS
Himachaleno-epoxido	1584	-	1,98	RI, MS
Neril-isovalerato	1593	2,96	1,76	RI, MS

Ledol	1596	-	0,98	RI, MS
Cubeban-11-ol	1598	1,21	-	RI, MS
Globulol	1601	-	3,00	RI, MS
Juniperol	1603	2,84	-	RI, MS
Fokienol	1604	-	0,72	RI, MS
N/I	1606	0,70	-	RI, MS
Geraniol-2-metil butanoato	1607	-	0,90	RI, MS
Guaiol	1610	1,28	-	RI, MS
γ - himachaleno	1620	-	3,02	RI, MS
Cubenol	1622	2,86	-	RI, MS
Cedrol	1624	-	1,27	RI, MS
Pentanoato	1627	1,35	-	RI, MS
Silfiperfol-6-em-5-ono	1629	-	1,73	RI, MS
Citronelil pentanoato	1631	1,61	-	RI, MS
Cadinol	1634	-	1,88	RI, MS
Eromoligenol	1637	1,03	-	RI, MS
γ – muuroleno	1639	-	1,44	RI, MS
γ – eudesmol	1641	1,25	-	RI, MS
Cariofileno óxido	1643	-	1,52	RI, MS
<1,7-diepi- α >cedrenal	1648	-	5,53	RI, MS
α - cedro-8(15)-en-9-ol	1651	5,04	-	RI, MS
N/I	1652	-	0,74	RI, MS
agarospirol	1655	-	0,77	RI, MS
Isoamil-geranoato	1657	1,40	-	RI, MS
Eudesmol<dihydro->	1662	-	2,43	RI, MS
N/I	1665	-	3,91	RI, MS
Bisabol-11-ol <(E)->	1668	5,61	-	RI, MS
Khusinol	1682	-	0,79	RI, MS
Alohimachalol	1683	1,43	-	RI, MS
N/I	1688	-	0,75	RI, MS
Juniperol acetato	1691	0,62	-	RI, MS
caforeno	1692	-	2,38	RI, MS
Farnesol <2,3 dihidro>	1694	2,11	-	RI, MS
<(2Z,6Z)->Farnesol	1704	-	0,89	RI, MS
Acorenona B	1705	1,09	-	RI, MS
Criptomeriona	1721	0,47	-	RI, MS
Vetiselinenol	1731	-	0,27	RI, MS
N/I	1733	0,27	-	RI, MS
Isovalencenol - E	1797	0,25	-	RI, MS
N/I	1815	0,24	-	RI, MS
Etileno brassilato	2007	0,25	-	RI, MS
Total		92,69	91,78	

* Nome dos compostos descritos em Adams, 2017

^a Índice de retenção em relação a *n*-alcanos na coluna capilar

^b Pico área relativa em relação ao total da amostra

^c Identificação: MS, comparação do espectro de massas com a biblioteca MS; RI, comparação com o índice de retenção da bibliografia.

O óleo essencial da folha após análise por CG/EM apresentou 67 compostos químicos, sendo identificados 57 compostos representando 92,69%

do total dos componentes presentes no óleo essencial. O óleo essencial do caule apresentou 55 compostos na análise por CG/EM e foram identificados 48 compostos representando 91,78% do total dos componentes presentes no óleo essencial.

Os óleos essenciais são metabólitos secundários terpênicos extraídos de estruturas das plantas, com composição química complexa e que as ajudam na adaptação ao meio inserido e contra o ataque de patógenos (Miranda et. al, 2016). Esses óleos possuem importância econômica com espécies utilizadas na culinária, indústria farmacêutica e química, sendo geralmente os componentes de ação terapêutica de plantas medicinais (Simões, 2017)

As estruturas químicas de seus componentes são formadas por carbono, hidrogênio e oxigênio, dando origem a complexa mistura de substâncias, havendo predominância de uma a três substâncias que caracterizam a espécie vegetal em questão (Simões, 2017). Essas substâncias apresentam estruturas diversas como ácidos carboxílicos, alcoóis, aldeídos, cetonas, ésteres, fenóis e hidrocarbonetos dentre outras, cada qual com sua característica aromática e ação bioquímica específica (Simões, 2017).

Os compostos terpênicos de várias espécies de *Ocotea*, têm como componentes majoritários: α -pineno, β -pineno, β -elemeno, β -cariofileno, α -humuleno, germacreno D, γ -cadineno, δ -cadineno e α -cadinol (Takaku et al., 2007). Ainda, esses nove compostos são comuns a outros gêneros da família Lauraceae, como *Cinnamomum*, *Laurus*, *Aniba*, *Nectandra* e *Persea*. Os compostos supracitados foram encontrados no óleo essencial de *O. nutans* o que revela a estreita relação quimiotaxonomica entre *O. nutans* e outras espécies de *Ocotea*. Isso é típico dos óleos essenciais de várias espécies de *Ocotea* da América do Sul (Chaverri et al., 2011).

Efeitos larvicidas pronunciados foram observados no óleo essencial das folhas e dos caules. O óleo essencial da folha demonstrou atividade para controlar larvas de terceiro estágio com $LC_{50} = 119,32 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (necessário para inibir 50% das larvas tratadas), enquanto que o óleo essencial do caule demonstrou alto potencial larvicida com $LC_{50} = 39,92 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Scalvenzi et al. (2019) demonstrou pronunciada atividade larvicida em *Aedes aegypti* com o óleo essencial de *Ocotea quixos* (Lam.) Kostern com $LC_{50} = 75,5 \text{ ppm}$. Os óleos essenciais possuem pronunciadas atividades larvicidas

devido sua composição química a base de terpenoides. Os terpenos e derivados possuem características lipossolúveis e há uma correlação de influência na mortalidade das larvas (Simões, 2017).

Conclusão

A análise dos óleos essenciais de *Ocotea nutans* levou a identificação dos componentes da folha e do caule representando respectivamente 92,69% e 91,78% em relação ao conteúdo total de componentes. A avaliação da atividade larvicida demonstrou que o óleo essencial da espécie apresenta um alto potencial de mortalidade das larvas sendo considerado um bom agente larvicida. O presente estudo contribui para o enriquecimento de informações químicas e biológicas da espécie *Ocotea nutans*.

Referências

- Adams RP. Identification of essential oils components by gas chromatography mass spectroscopy. 5.ed. Illinois: Allured Publishing Corporation, Carol Stream, 804p, 2017.
- Ballabeni V, Tognolini M, Bertoni S, Bruni R, Guerrini A, Rueda GM, Barocelli E. Antiplatelet and antithrombotic activities of essential oil from wild *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. (Lauraceae) calices from Amazonian Ecuador. *Pharmacological Research* 2007,55(1): 23-30
- Ballabeni V, Tognolini M, Giorgio C, Bertoni S, Bruni R, Guerrini A, Barocelli E. *Ocotea quixos* Lam. essential oil: *In vitro* and in vivo investigation on its anti-inflammatory properties. *Fitoterapia* 2010,81(4):289-295.
- Barbosa-Filho, JM, Cunha RM, Dias CS, Athayde-Filho PF, Silva MS, Cunha EVL, Machado MIL, Craveiro AA, Medeiros IA. GC-MS analysis and cardiovascular activity of the essential oil of *Ocotea duckei*. *Rev Bras Farmacog* 2008, 18(1): 37-41
- Brasil. Farmacopéia Brasileira. 6 ed. Volume 1. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: ANVISA. 2019
- Brotto ML, Cervi AC, Santos EP. O gênero *Ocotea* (Lauraceae) no estado do Paraná, Brasil. *Rodriguésia* 2013; 64: 495-525
- Chaverri C, Díaz C, Cicció, J. Chemical Analysis of Essential Oils from *Ocotea gomezii* W.C. Burger and *Ocotea morae* Gómez-Laur. (Lauraceae) Collected at for natural products with antimicrobial activity: A review of the literature. *J Ethnopharmacol* 2011, 23:127-129
- Fujiwara GM, Annies V, de Oliveira CF, Lara RA, Gabriel MM, Betim FCM, Nadal JM, Farago PV, Dias JF, Miguel OG, Miguel MD, Marques FA, Zanin SM. Evaluation of larvicidal activity and ecotoxicity of linalool, methyl cinnamate and methyl cinnamate/linalool in combination against *Aedes aegypti*. *Ecotoxicol Environm Saf.* 2017;139:238-244.
- Garrett R, Cruz RA, Guerra MS, Gattuso M, Rocha L. Atividade antibacteriana do óleo essencial de *Ocotea notata* guiada pelo ensaio de toxicidade sobre *Artemia salina* Leach. *Boletín Latinoamericano y del Caribe Plantas Medicinales y Aromaticas (BLACPMA)*, 2007; 6 (6):344-345.
- Gribner C, Rech KS, Moura PF, Rigoni, AAR, Gatto LJ, Veiga A, Kerber VA, Miguel MD, Miguel OG, JFG. Characterization and identification of chemical constituents of *Ocotea paranaensis* Brotto, Baitello, Cervi, & E.P. Santos and their biological properties. *Nat Prod Res* 2020, 1–7
- Miranda, CASF, Cardoso MG, Batista LR, Rodrigues LMA, Figueiredo ACS. Óleos essenciais de folhas de diversas espécies: propriedades antioxidantes e

antibacterianas no crescimento espécies patogênicas. Revista Ciência Agronômica [online] 2016, 47:1, pp. 213-220.

Ocotea in Flora do Brasil 2022a em construção. [Jardim Botânico do Rio de Janeiro]; [updated 2022 Nov 03; cited 2022 Nov 03]. Available from: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB8440>.

Ocotea in Flora do Brasil 2022b em construção. [Jardim Botânico do Rio de Janeiro]; [update 2022 Nov 12; cited 2022 Nov 12]. Available from: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB8475>

Scalvenzi L, Radice M, Toma L, Severini F, Boccolini D, Bella A, Guerrini A, Tacchini M, Sacchetti G, Chiurato M, Romi R, Di Luca M. Larvicidal activity of *Ocimum campechianum*, *Ocotea quixos* and *Piper aduncum* essential oils against *Aedes aegypti*. Parasite 2019; 26:23

Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. Farmacognosia – do produto natural ao medicamento. Porto Alegre: Editora Artemed 2017, 486p.

Takaku S, Haber WA, Setzer, WN. Leaf essential oil composition of 10 species of *Ocotea* (Lauraceae) from Monteverde, Costa Rica. Biochem Syst Ecol 2007; 35: 525-532

Trofimov, D., Rohwer, J. G. Towards a phylogenetic classification of the *Ocotea* complex (Lauraceae): an analysis with emphasis on the Old World taxa and description of the new genus *Kuloa*. Bot. J Linn. Soc 2020. 192, 510-535.

World Health Organization (WHO). Guidelines for Laboratory and Field Testing of Mosquito Larvicides. World Health Organization, 2005. Geneva

Yamaguchi KKL. Estudos biológicos dos extratos e composição química dos óleos essenciais de espécies da família Lauraceae. [dissertation]. Manaus: Universidade Federal do Amazonas; 2011.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ao fim do estudo, relatou-se pela primeira vez a ocorrência dos isômeros vitexina e isovitexina na espécie *Ocotea nutans*, e também no gênero *Ocotea*.

O resultado da análise por CG/EM levou a caracterização do óleo essencial da espécie, descrevendo os compostos majoritários e minoritários. Ao fim foram identificados 92,69% dos compostos do óleo essencial da folha e como composto majoritário o óxido de cariofileno que possui 21,02% da composição do óleo. O caule teve 91,78% dos compostos identificados e como composto majoritário o espatulenol com 21,82% da composição do óleo.

Todos os extratos testados em *Aedes aegypti* tiveram um potencial larvicida, com pronunciada atividade na fração hexano do caule, que apresentou maior mortalidade e menor LC_{50} , quando comparado as outras concentrações. A atividade larvicida do óleo essencial demonstrou potencial para a folha e para o caule.

O teor de compostos fenólicos foi estimado pela primeira vez nessa espécie e tiveram resultados promissores, principalmente no EBF, FAEF e FAEC.

A capacidade antioxidante pela técnica do radical DPPH indicou que EBF, FAEF e FAEC possuem a melhor capacidade antioxidante quando testadas por esse método. Pela técnica do complexo fosfomolibdênio e azul da Prússia, o destaque ficou por conta de EBF, FAEF e FAEC que apresentaram o melhor potencial por ambas as técnicas.

REFERENCIAS

- ADAMS R.P. **Identification of essential oils components by gas chromatography mass spectroscopy**. 5.ed. Illinois: Allured Publishing Corporation, Carol Stream, 804p, 2017.
- ALVES, C.Q.; DAVID, J.M.; DAVID J.P., BAHIA, M.V.; AGUIAR, R.M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, 2010; 33: 2202-2210.
- BALLABENI, V.; TOGNOLINI M., BERTONI S., BRUNI R., GUERRINI, A., RUEDA G.M., BAROCELLI E.. Antiplatelet and antithrombotic activities of essential oil from wild *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. (Lauraceae) calices from Amazonian Ecuador. **Pharmacological Research** 2007,55(1): 23-30
- BALLABENI, V.; TOGNOLINI, M.; GIORGIO, C.; BERTONI, S.; BRUNI, R.; GUERRINI; BAROCELLI, E. *Ocotea quixos* Lam. essential oil: *In vitro* and in vivo investigation on its anti-inflammatory properties. **Fitoterapia** 2010,81(4):289-295.
- BARBOSA-FILHO, J.M.; CUNHA, R.M.; DIAS, C.S.; ATHAYDE-FILHO, P.F.; SILVA, M.S.; CUNHA, E.V.L.; MACHADO, M.I.L.; CRAVEIRO, A.A.; MEDEIROS, I.A. GC-MS analysis and cardiovascular activity of the essential oil of *Ocotea duckei*. **Rev Bras Farmacog** 2008, 18(1): 37-41
- BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**. 6 ed. Volume 1. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: ANVISA. 2019
- BROTTO, M.L.; CERVI, A.C.; SANTOS, E.P. O gênero *Ocotea* (Lauraceae) no estado do Paraná, Brasil. **Rodriguésia** 2013; 64: 495-525
- CARVALHO, J.L.S.; CUNICO, M.M.; DIAS, J.F.G; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G. Termoestabilidade de processos extrativos de *Nasturtium officinale* R. Br., Brassicaceae por sistema Soxhlet modificado. **Química Nova**. 2009; 32: 1031-1035.
- CHAVERRI, C.; DÍAZ, C.; CICCIO, J. Chemical Analysis of Essential Oils from *Ocotea gomezii* W.C. Burger and *Ocotea morae* Gómez-Laur. (Lauraceae) Collected at for natural products with antimicrobial activity: A review of the literature. **J Ethnopharmacol** 2011, 23:127-129
- CHEW, Y.L.; CHAN, E.W.L.; TAN, P.L.; LIM, Y.Y.; STANSLAS, J.; GOH, J.K. Assessment of phytochemical content, polyphenolic composition, antioxidant and antibacterial activities of Leguminosae medicinal plants in Peninsular Malaysia. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, 2011; 11: 12
- CHOI, J.S.; NURUL-ISLAM, M.; YOUSOF-ALI, M.; KIM, E.J.; KIM, Y.M.; JUNG, H.A. Effects of C-glycosylation on anti-diabetic, anti-Alzheimer's disease and anti-inflammatory potential of apigenin. **Food and Chemical Toxicology**, 2014; 64: 27-33.

DEMIR-ÖZKAY, U.; CAN, O.D. Anti-nociceptive effect of vitexin mediated by the opioid system in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**. 2013; 109: 23-30

DONG, L.; FAN, Y.; SHAO, X.; CHEN, Z. Vitexin protects against myocardial ischemia/reperfusion injury in Langendorff-perfused rat hearts by attenuating inflammatory response and apoptosis. **Food Chem Toxicol**. 2011;49: 3211-6.

FUJIWARA, G.M.; ANNIES, V.; DE OLIVEIRA, C.F.; LARA, R.A.; GABRIEL, M.M.; BETIM, F.C.M.; NADAL, J.M.; FARAGO, P.V.; DIAS, J.F.G.; MIGUEL, O.G.; MIGUEL, M.D.; MARQUES, F.A.; ZANIN, S.M. Evaluation of larvicidal activity and ecotoxicity of linalool, methyl cinnamate and methyl cinnamate/linalool in combination against *Aedes aegypti*. **Ecotoxicol Environm Saf**. 2017;139:238-244.

GANCEVICIENE, R.; LIAKOU, A.I.; THEODORIDIS, A.; MAKRANTONAKI, E.; ZOUBOULIS, C.C. "Skin anti-aging strategies," **Dermato-Endocrinology**, 2012; 4: 308–319

GARCEZ, W.S.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O.R. Benzylisoquinoline alkaloids and flavonols from *Ocotea vellosiana*. **Phytochemistry**, 1995; 39: 815-816

GARCEZ, W.S.; GARCEZ, F.R.; SILVA, L.M.G.E.; SHIMABUKURO, A.A. Indole alkaloid and other constituents from *Ocotea minarum*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 2005; 16: 1382-1386

GARRETT, R.; CRUZ, R.A.; GUERRA, M.S.; GATTUSO, M.; ROCHA, L. Atividade antibacteriana do óleo essencial de *Ocotea notata* guiada pelo ensaio de toxicidade sobre *Artemia salina* Leach. **Boletim Latinoamericano y del Caribe Plantas Medicinales y Aromaticas (BLACPMA)**, 2007; 6 (6):344-345.

GARRETT, R.; ROMANOS, M. T. V.; BORGES, R. M.; SANTOS, M. G.; ROCHA, L.; SILVA, A. J. R. DA. Antiherpetic activity of a flavonoid fraction from *Ocotea notata* leaves. **Revista Brasileira Farmacognosia**, 2012; 22: 306-313.

GRIBNER, C.; RECH, K.S.; MOURA, P.F.; RIGONI, A.A.R.; GATTO, L.J.; VEIGA, A.; KERBER, V.A.; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G.; DIAS, J.F.G. Characterization and identification of chemical constituents of *Ocotea paranaensis* Brotto, Baitello, Cervi, & E.P. Santos and their biological properties. **Nat Prod Res** 2020, 1–7

HE, M.; MIN, J.W.; KONG, W.L.; HE, X.H.; LI, J.X.; PENG, B.W. A review on the pharmacological effects of vitexin and isovitexin. **Fitoterapia**. 2016; 115 :74-85.

JAYANTHI, P.; LALITHA, P. Reducing power of the solvent extracts of *Eichhornia crassipes* (mart.) Solms. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, 2011; 3: 126-128

LATHA, S.; DANIEL, M. Phenolic antioxidants of some common pulses. **Journal of Food Science and Technology (India)**, 2001; 38: 272-273

LI, A.L.; LI, G.H.; LI, Y.R.; WU, X.Y.; REN, D.M.; LOU, H.X.; WANG, X.N.; SHEN, T. Lignan and flavonoid support the prevention of cinnamon against oxidative stress related diseases, **Phytomedicine**, 2019; 53: 143-153

LI, Y.L.; MA, S.C.; YANG, Y.T.; YE, S.M.; BUT, P.P. Antiviral activities of flavonoids and organic acid from *Trollius chinensis* Bunge. **Journal of Ethnopharmacology**. 2002; 79: 365-368

LUGO, M.C.R. **Metabolitos secundários aislados de hojas de *Ocotea heterochroma* (Lauraceae)** [thesis] Colômbia.: Universidad Nacional de Colômbia; 2015

MENSOR, L.L.; MENEZES, F.S.; LEITÃO, G.G.; REIS, A.S.; DOS SANTOS, T.C.; COUBE, C.S.; LEITÃO, S.G. Screening of brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phyt.Res.** 2001; 15: 127-130.

MIRANDA, C.A.S.F.; CARDOSO, M.G.; BATISTA, L.R.; RODRIGUES, L.M.A.; FIGUEIREDO, A.C.S. Óleos essenciais de folhas de diversas espécies: propriedades antioxidantes e antibacterianas no crescimento espécies patogênicas. **Revista Ciência Agronômica** [online] 2016, 47:1, pp. 213-220.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Journal of Science and Technology**, 2004; 26: 211–219

***Ocotea in Flora do Brasil* 2022a em construção.** [Jardim Botânico do Rio de Janeiro]; [updated 2022 Nov 03; cited 2022 Nov 03]. Available from: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB8440>.

***Ocotea in Flora do Brasil* 2022b em construção.** [Jardim Botânico do Rio de Janeiro]; [update 2022 Nov 12; cited 2022 Nov 12]. Available from: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB8475>

PEREIRA, C.A.M.; VILEGAS, J.H.; MCCULLAGH, M. Distinction of the C-glycosylflavone isomer pairs orientin/isoorientin and vitexin/isovitexin using HPLC-MS exact mass measurement and in-source CID. **Phytochemical Analysis**, Inglaterra, 2005; 16: p. 295-301.

PETRUK, G.; DEL GIUDICE, R.; RIGANO, M.M.; MONTI, D.M. Antioxidants from Plants Protect against Skin Photoaging. **Oxid Med Cell Longev.** 2018: 1454936.

PRAVEENA, R.; SADASIVAM, K.; KUMARESAN, R.; DEEPA, V.; SIVAKUMAR, R. Experimental and DFT studies on the antioxidant activity of a C-glycoside from *Rhynchosia capitata*. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2013; 103: 442-452

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex:

specific application to the determination of vitamin E. **Analytical biochemistry**, 1999; 269: 337–341

REBOUÇAS, A.C.; DA SILVA, C.B.; DALARMI, L.; DE OLIVEIRA, M.; RECH, K.S.; DIAS, J.F.G.; ZANIN, S.M.W.; KERBER, V.A.; MIGUEL, O.G.; MIGUEL, M.D. *In vitro* antioxidant action of the crude ethanolic extract from the leaves of *Ocotea pulchella* (Nees & Mart.) and their fractions. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 2015; 9: 145-153

SCALVENZI, L.; RADICE, M.; TOMA, L.; SEVERINI, F.; BOCCOLINI, D.; BELLA, A.; GUERRINI, A.; TACCHINI, M.; SACCHETTI, G.; CHIURATO, M.; ROMI, R.; DI LUCA, M. Larvicidal activity of *Ocimum campechianum*, *Ocotea quixos* and *Piper aduncum* essential oils against *Aedes aegypti*. **Parasite** 2019; 26:23

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia – do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre: Editora Artemed 2017, 486p.

SILVA, M.L.C.; COSTA, R.S.; SANTANA, A.S.; KOBLITZ, M.G.B. **Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais** Semina: Ciências Agrárias, 2010; 31: 669-682

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

TAKAKU, S.; HABER, W.A.; SETZER, W.N. Leaf essential oil composition of 10 species of *Ocotea* (Lauraceae) from Monteverde, Costa Rica. **Biochem Syst Ecol** 2007; 35: 525-532

TROFIMOV, D., ROHWER, J. G. Towards a phylogenetic classification of the *Ocotea* complex (Lauraceae): an analysis with emphasis on the Old World taxa and description of the new genus *Kuloa*. **Bot. J Linn. Soc** 2020. 192, 510-535.

VALENTE, L.M.M.; ALVES, F.F.; BEZERRA, G.M.; ALMEIDA, M.B.S.; ROSARIO, S.L.; MAZZEI, J.L.; D'AVILA, L.A.; SIANI, A.C. Desenvolvimento e aplicação de metodologia por cromatografia em camada delgada para determinação do perfil de alcaloides oxindólicos pentacíclicos nas espécies sul-americanas do gênero *Uncaria*. **Revista Brasileira de Farmacog**. 2006; 16: 216-223

WAGNER, H. **Plant Drugs analysis**. 2 ed. Berlin: Springer; 1996: 298-299, 319- 319

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Guidelines for Laboratory and Field Testing of Mosquito Larvicides. World Health Organization, 2005. Geneva

YAMAGUCHI, K.K.L. **Estudos biológicos dos extratos e composição química dos óleos essenciais de espécies da família Lauraceae.**

[dissertation]. Manaus: Universidade Federal do Amazonas; 2011.

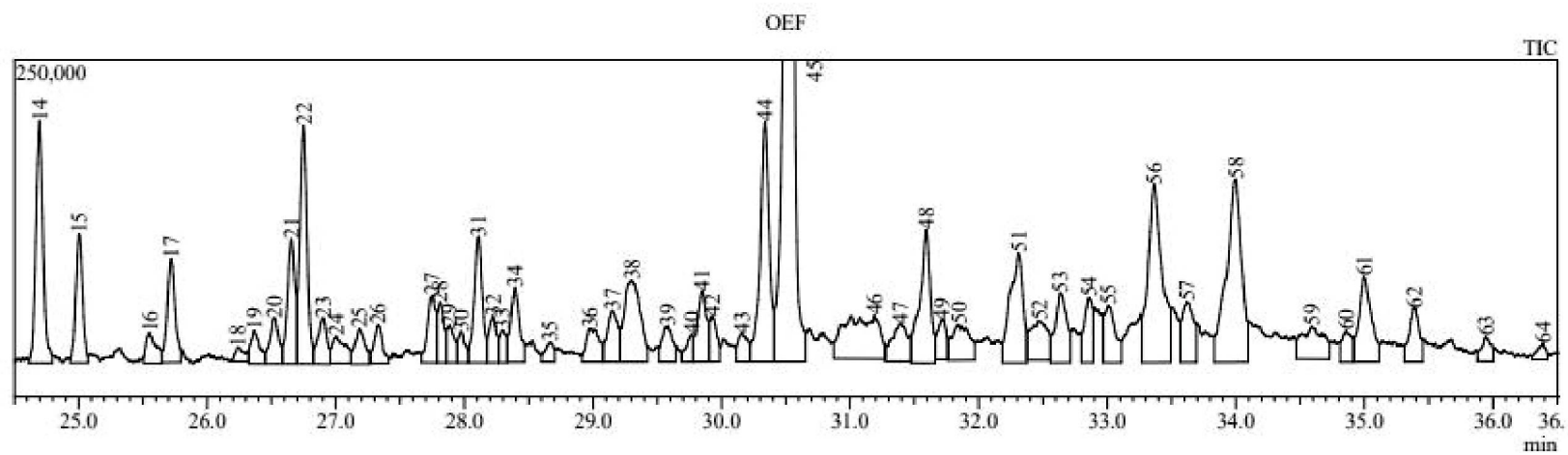
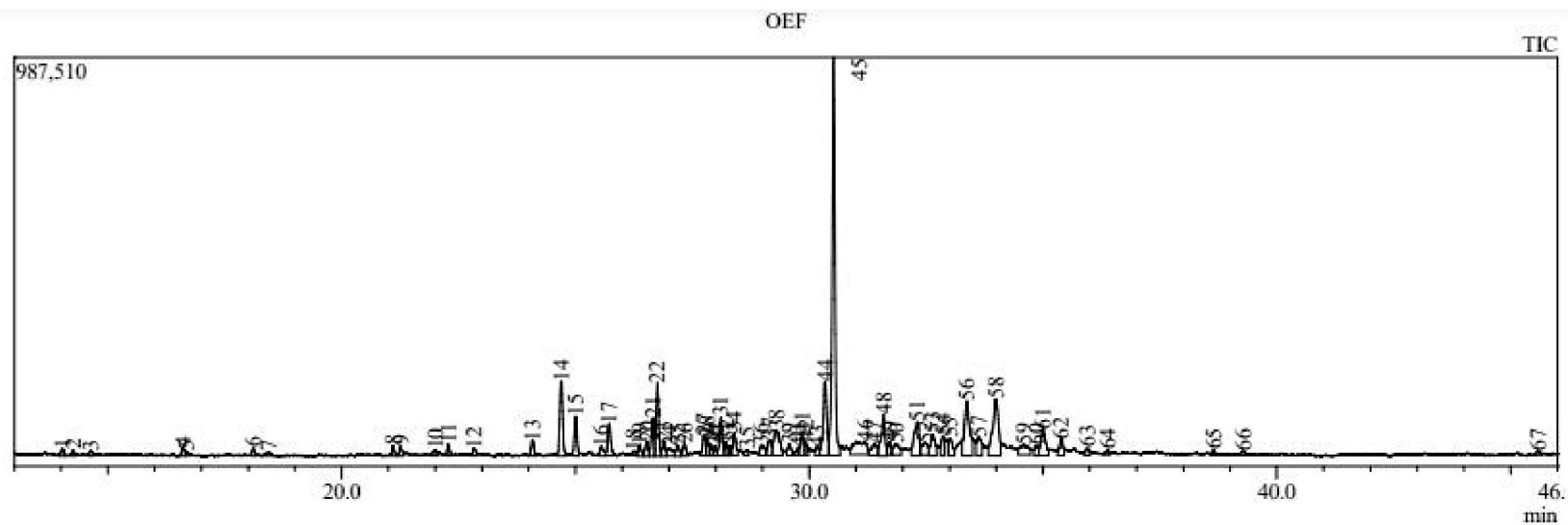
YEN, G.C.; CHEN, H.Y. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 1995; 43: 27-32

YANG, S.H.; LIAO, P.H.; PAN, Y.F.; CHEN, S.L.; CHOU, S.S.; CHOU, M.Y. The Novel p53 Dependent Metastatic and Apoptotic Pathway Induced by Vitexin in Human Oral Cancer OC2 Cells. **Phytotherapy research**. 2013; 27: 1154-1161

ZHANG, J.; YUAN, K.; ZHOU, W.; ZHOU, J.; YANG, P. Studies on the active components and antioxidant activities of the extracts of *Mimosa pudica* Linn. from southern China. **Pharmacogn Mag**. 2011; 7: 35–39.

ZUCOLOTTO, S.M.; FAGUNDES, C.; REGINATTO, F.H.; RAMOS, F.A.; CASTELLANOS, L.; DUQUE, C.; SCHENKEL, E.P. Analysis of C-glycosyl flavonoids from South American *Passiflora* Species by HPLC-DAD and HPLC-MS. **Phytochemical Analysis**, 2012; 23: 232-239.

ANEXO A



ANEXO B

