



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA TERRA**  
**PROGRAMA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**  
**MESTRADO EM QUÍMICA**

**ESTUDOS BIOLÓGICOS DOS EXTRATOS E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS  
ÓLEOS ESSENCIAIS DE ESPÉCIES DA FAMÍLIA LAURACEAE**

**KLENICY KAZUMY DE LIMA YAMAGUCHI**

**MANAUS - 2011**

KLENICY KAZUMY DE LIMA YAMAGUCHI

ESTUDOS BIOLÓGICOS DOS EXTRATOS E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS  
ÓLEOS ESSENCIAIS DE ESPÉCIES DA FAMÍLIA LAURACEAE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Química, área de concentração Química Orgânica.

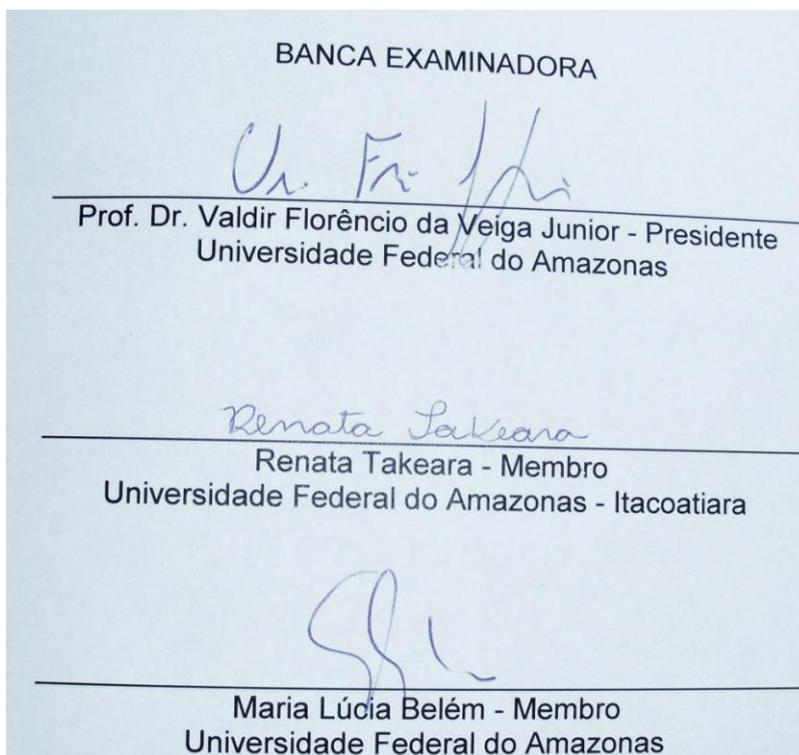
Orientador: Prof<sup>o</sup> Dr Valdir Florêncio da Veiga Junior

# KLENICY KAZUMY DE LIMA YAMAGUCHI

## ESTUDOS BIOLÓGICOS DOS EXTRATOS E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE ESPÉCIES DA FAMÍLIA LAURACEAE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Química, área de concentração Química Orgânica.

Aprovada em 02 de agosto de 2011.



*À minha amada mãe, Auxiliadora Yamaguchi por todo o carinho e amor destinados a mim. Ela que abriu mão da minha companhia em prol da minha educação, sempre esteve presente em minha vida. Dedico-a todas as vitórias conquistadas ao longo dos anos.*

## AGRADECIMENTOS

O mestrado é um momento em que o tempo passa muito rápido, acompanhado de disciplinas, experimentos e prazos. Os ensinamentos adquiridos durante todos esses 24 meses não podem ser mensurados nem expressos apenas nos resultados e discussão deste trabalho. Mas na tentativa de demonstrá-los, eis meus agradecimentos:

À **Deus** por tantas bênçãos concedidas ao longo da minha vida. A todas as oportunidades que tive de crescer como pessoa e da força nos momentos mais difíceis, sempre colocando na minha vida sinais de Seu infinito amor e de suas orientações;

À minha família, alicerce fundamental no decorrer dessa caminhada, em especial, à meus pais **Katsuo e Auxiliadora Yamaguchi** por terem me dado uma base de educação, caráter e amor. Vocês são a árvore e eu, apenas um fruto que reflete a criação que vocês deram para a nossa família.

Ao meu companheiro de mestrado, arquiteto querido, **Kendy Yamaguchi** por compartilhar comigo os mais diversos momentos durante o mestrado;

À minha amada irmã, **Kenne Yamaguchi**, que mesmo estando em Coari (assim como toda a família) sempre esteve perto de mim me dando força para continuar seguindo em frente;

Aos meus cunhados **Antônia e Miro Yamaguchi**, por me apoiarem e sempre terem palavras de conforto e incentivo;

Aos meus padrinhos, **Cosmo, Geralda e Mariza**, à minha tia **Nely**, meus tios e primos por sempre torcerem por mim e pela energia positiva que vocês enviaram (e enviam) me dando força em todas as situações;

Aos meus amigos antigos, **Enio, Daiana Góes. Leandro e Fernando Brasil**. Nessa correria que é o mestrado, vocês sempre estiveram comigo. As ligações, mensagens e visitas me fortaleceram e fizeram com que eu sempre me sentisse amada;

### À minha família científica:

Vocês são o presente que Deus me deu. Eu não teria como selecionar tão bem pessoas tão especiais como vocês.

Professor **Valdir Veiga Junior**, por ser muito mais que um orientador, por ser um pai. Sempre com seu ombro amigo, seu abraço acolhedor e seus valorosos conselhos me acompanhando desde a iniciação científica. Realmente fazer ciência não é fácil, mas um dia eu aprendo!

**Joelma Alcântara**, minha mãe, minha amiga, minha cara metade. Sua sinceridade ÚNICA reflete a grandeza que és. Os conselhos, os incentivos, as brincadeiras e os momentos de descontração foram situações que guardarei para sempre. Obrigada pelos valorosos momentos ao seu lado;

**Priscilla Oliver e Lidiam**, não há como agradecer em algumas palavras todo o carinho que sinto. Vocês são a sorte que a vida me deu. Minhas irmãs do coração que somente Deus, com todo o seu amor poderia me dar;

**Milena Campelo, Paula Barbosa e Luciana Freire**, obrigada por todo o companheirismo que nos acompanham desde a graduação. Vocês sempre estiveram ao meu lado.

**Igor e Carol, Priscila e Victor, André e Érika**, obrigada pelos momentos compartilhados. Fico feliz por tê-los perto de mim e pelas experiências adquiridas;

Ao **grupo de pesquisa Q-Bioma** como um todo, a todos os membros. Somos uma família científica e mesmo com todas as diferenças, a união sempre prevalecerá.

À todos os meus companheiros de mestrado em Química, em especial, **Nerilson Masques**. Obrigada pela companhia e amizade durante todo o curso. Somente a gente sabe quantas noites passamos em claro estudando para fazer as listas, acordando com olheiras e madrugando para não perdermos os horários. Você é muito importante na minha vida;

Aos professores **Afonso Duarte e Rita Nunomura** pela amizade, carinho, valorosos conselhos e incentivos. Vocês moram no meu coração. Obrigada por estarem na minha vida.

Professores **Marcos e Cristine Machado** pelo exemplo de profissionais que são sempre esforçando-se e pensando na qualidade da aprendizagem. Acompanhá-los nas disciplinas me ajudou muito no perfil de profissional que quero ser;

Aos professores **Ary Cavalcante e Roberto Castilho** por todos os conselhos e incentivos.

Ao **Hector Koolen** por toda a paciência acompanhando-me no espectrômetro de massa e pelas dicas e incentivos nos experimentos;

**A pessoa que hoje eu sou traz um pouco de cada um de vocês!!!**

*Para ser grande, sê inteiro: nada  
Teu exagera ou exclui.  
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és  
No mínimo que fazes.  
Assim em cada lago a lua toda  
Brilha, porque alta vive.*

*Fernando Pessoa*

## RESUMO

A família Lauraceae é uma das famílias mais importantes na floresta amazônica apresentando um número expressivo de espécies com diversas utilizações devido a qualidade dos seus produtos naturais. Quimicamente as espécies desta família caracterizam-se pela presença de alcalóides, neolignanas, flavonóides, terpenos e fenilpropanóides. Este estudo contribui para a análise do perfil químico dos três gêneros *Endlicheria*, *Ocotea* e *Rhodostemonodaphne* através da varredura dos extratos brutos auxiliando no direcionamento das investigações químicas sobre a composição dos extratos e óleos essenciais, contribuindo para a triagem de gêneros e das espécies promissoras. Neste trabalho foi realizado prospecção fitoquímica, análise do perfil alcaloídico por cromatografia em camada delgada (CCD) e espectrometria de massa (EM) dos extratos etanólicos, identificação dos constituintes do óleo essencial e verificação das atividades anticolinesterásica, antioxidante e citotóxica dos extratos etanólicos das espécies *E. citriodora*, *E. sericea*, *O. minor*, *O. ceanothifolia*, *O. leucoxyton*, *R. recurva* e *R. crenaticupula*. As espécies foram coletadas na Reserva Ducke, em Manaus e separadas para obtenção de óleos essenciais e extratos etanólicos. Estes foram analisados quanto as atividades química/biológicas e submetidos a partições ácido-base para obtenção de frações enriquecidas de alcalóides. O perfil alcaloídico foi analisado por CCD utilizando reveladores específicos e por EM. Os óleos essenciais foram analisados por CG-DIC e CG-EM. Confirmou-se que a pronunciada presença de alcalóides no gênero *Ocotea* e em baixas concentrações nas espécies de *Endlicheria* e *Rhodostemonodaphne*. Na espectrometria de massa os picos  $m/z$  de 300 e 330 estiveram presentes na maioria das frações e podem corresponder a alcalóides do tipo benzilisoquinolínicos e aporfínicos. Os rendimentos dos óleos essenciais obtidos por hidrodestilação em clewenger modificado variaram de 0,02% a 4,29%, sendo *Endlicheria citriodora* a espécie que apresentou maior rendimento, 2,5% nos galhos e 4,3% nas folhas, tendo como constituinte majoritário, o geranato de metila (acima de 93%), elucidado por CG-DIC, CG-EM, RMN<sup>1</sup>H e RMN<sup>13</sup>C. Os óleos essenciais das outras espécies apresentaram rendimento inferior a 1% e como constituinte majoritário o cariofileno e seu óxido. A atividade antioxidante foi avaliada através da capacidade seqüestrante do radical estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH<sup>•</sup>), utilizando quercetina como padrão externo, expressos como valores de concentração eficiente (CE<sub>50</sub>). Os extratos de *Ocotea minor* foram os que apresentaram maior potencial antioxidante (CE<sub>50</sub>=7,31 ± 0,32 µg/mL). A análise qualitativa da atividade anticolinesterase foi realizada de acordo com o método de Ellman (modificado), com resultados negativos para inibição da enzima acetilcolinesterase. Os galhos das três espécies de *Ocotea* apresentaram resultado positivo. A atividade antitumoral foi avaliada contra quatro linhagens de células (leucemia, mama, cólon e glioblastoma) segundo o método de Mossman. Nenhum dos extratos testados apresentou atividade citotóxica pronunciada.

Palavras-chave: Floresta Amazônica; Lauraceae; alcalóide; óleo essencial.

## ABSTRACT

The family Lauraceae is one of the most important families in the Amazon rainforest featuring an significant number of species with different uses due to the quality of products natural. The species this family are Chemically characterized by the presence of alkaloids, neolignans, flavonoids, terpenes and phenylpropanoids. This study contributes to the analysis of the chemical profile of the three genera *Endlicheria*, *Ocotea* and *Rhodostemonodaphne* about directing the investigations on the chemical composition of extracts and essential oils, contributing to the screening of promising genera and species. This work was carried out prospecting phytochemical , alkaloid profile analysis by thin layer chromatography (TLC) and mass spectrometry of the ethanol extracts, identification of the essential oil and analysis of activities: anticholinesterase, antioxidant and cytotoxic of ethanolic extracts of *E. citriodora*, *E. sericea*, *O. minor*, *O. ceanothifolia*, *O. leucoxydon*, *R. recurva* and *R. crenaticupula*. The species were collected in Reserva Ducke, in Manaus. The material was separated to obtain essential oils and ethanolic extracts. These were analyzed for chemical / biological activities and subjected to acid-base partition to obtain enriched fractions of alkaloids. The alkaloid profile was analyzed by mass spectrometry and TLC with revealing specific. The essential oils were analyzed by GC-FID and GC-MS. It was confirmed the high presence of alkaloids in the genus *Ocotea* and low in species *Endlicheria* and *Rhodostemonodaphne*. In mass spectrometry the peaks  $m/z$  300 and 330 were present in most fractions and may correspond to the type alkaloids Benzylisoquinolines and Aporphines. The yields of essential oils obtained by hydrodistillation in Clevenger modified ranged from 0.02% to 4.29%. The specie *Endlicheria citriodora* was the highest yield, 2.5% in the branches and 4.3% in the leaves. The Methyl geranate was the major constituent, (above 93%), elucidated by GC-FID, GC-MS RMN<sup>1</sup>H and RMN <sup>13</sup>C. The essential oils from other species showed less than 1% yield and caryophyllene and its oxide were the major constituents. The antioxidant activity was assessed by sequestering ability of the stable radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH<sup>\*</sup>), using quercetin as external standard, expressed as effective concentration values (EC<sub>50</sub>). The extracts of *Ocotea minor* presented the best antioxidant potential (EC<sub>50</sub> = 7.31 ± 0.32 µg / mL). Qualitative analysis of anticholinesterase activity was performed according to the method of Ellman (modified), with negative results for inhibiting the enzyme acetylcholinesterase. The branches of the three species of *Ocotea* were positive. The antitumor activity was evaluated against four cell lines (leukemia, breast, colon and glioblastoma) by the method of Mossman. None of the extracts tested showed pronounced cytotoxic activity.

Keywords: Amazon forest; Lauraceae; alkaloid; essential oil.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mapa da distribuição geográfica da família Lauraceae

Figura 2: Alcalóides encontrados em Laruraceae

Figura 3: biossíntese das lignanas e das neolignanas

Figura 4: Esqueletos clássicos de neolignanas

Figura 5: Exemplos de neolignanas encontradas em Lauraceae

Figura 6: Estrutura de alguns alcalóides

Figura 7: Rota biossintética dos alcalóides benziltetrahydroisoquinolínicos

Figura 8: Estrutura básica dos flavonóides

Figura 9: Biossíntese geral dos flavonóides

Figura 10: Formação de compostos fenilpropanóides

Figura 11: Formação de compostos terpênicos

Figura 12: Exemplos de monoterpenos e sesquiterpenos

Figura 13: Distribuição das espécies do Gênero *Endlicheria*

Figura 14: Estruturas isoladas de *Endlicheria sericeae*

Figura 15: Distribuição das espécies do Gênero *Rhodostemonodaphne*

Figura 16: Distribuição das espécies do Gênero *Ocotea*

Figura 17: Principais fontes de espécies reativas e o mecanismo de defesa

Figura 18: Estruturas químicas de alguns antioxidantes obtidos pela dieta

Figura 19: Radical livre 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) e sua forma reduzida

Figura 20: Tipos de câncer mais incidentes, estimados para 2002, na população brasileira

Figura 21: Estruturas químicas de algumas substâncias com atividade cancerígenas derivadas de fontes vegetais

Figura 22: Estrutura química de 5,5'-ditiobis (ácido-2 nitrobenzóico)

Figura 23: Procedimento para análise quantitativa da atividade antioxidante

Figura 24: Procedimento para o ensaio de citotoxicidade em *Artemia salina*

Figura 25 a 31: Placas cromatográficas das frações alcaloídicas

Figura 32: Placa cromatográfica com extrato das folhas e galhos das espécies de Lauraceae e do padrão quercetina antes a adição da solução de DPPH

Figura 33: Placa cromatográfica com extrato das folhas e galhos das espécies de Lauraceae e do padrão quercetina após a adição da solução de DPPH

## LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 01: Ciclo biossintético dos metabólitos secundários

Esquema 02: Mecanismo de início e propagação da lipoperoxidação ( LH: ácido graxo insaturado; L': radical lipídico; LOO': radical peroxila e LOOH: hidroperóxido lipídico)

Esquema 03. Reação do  $\alpha$ -tocoferol (sendo R, a sua cadeia lateral) com radicais peroxila (LOO $\cdot$ ), formando hidroperóxidos lipídicos (LOOH) e sua regeneração pela vitamina C, originando o radical ascorbila

Esquema 04: Representação esquemática dos diferentes tipos de cromatografia.

Esquema 05: Fluxograma do procedimento de extração utilizado para obtenção dos extratos e dos óleos essenciais

Esquema 06: Obtenção da fração alcaloídica

## LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Espécies de *Ocotea* e seus usos populares

Tabela 02: Alguns alcalóides do gênero *Ocotea*

Tabela 03: Atividades farmacológicas de algumas espécies de *Ocotea*

Tabela 4a: Peso do material utilizado para extração a frio em etanol.

Tabela 4b: Rendimento dos extratos das espécies de Lauraceae.

Tabela 05: Prospecção fitoquímica para alcalóides, compostos fenólicos e flavonóides

Tabela 06: Análise das frações alcaloídicas por espectrometria de massas.

Tabela 07: Comparação dos íons moleculares com algumas fórmulas moleculares de alcalóides isolados em Lauraceae

Tabela 08: Rendimento dos óleos essenciais (%)

Tabela 09: Composição percentual dos óleos essenciais de *Endlicheria citriodora*

Tabela 10: Resultados experimentais de RMN ( $\delta$  em ppm, CDCl<sub>3</sub>, 500MHz)

Tabela 11: Composição percentual dos óleos essenciais de *Endlicheria sericea*

Tabela 12: Composição percentual dos óleos essenciais de *Ocotea ceanothifolia*

Tabela 13: Composição percentual dos óleos essenciais de *Ocotea leucoxylon*

Tabela 14: Composição percentual dos óleos essenciais de *Ocotea minor*

Tabela 15: Composição percentual dos óleos essenciais de *R.crenaticupula*

Tabela 16: Composição percentual dos óleos essenciais de *Rhodostemonodaphne recurva*

Tabela 17: Resultado do teste qualitativo de atividade antioxidante qualitativa das folhas e dos galhos finos e do padrão quercetina

Tabela 18: Resultado do teste quantitativo de atividade sequestrante do radical livre DPPH das folhas e dos galhos finos e do padrão quercetina. Dados Quantitativos em  $\mu\text{g/mL}$

Tabela 19: Resultado do teste qualitativo de inibição da enzima AChE

Tabela 20: Resultado as avaliação de toxicidade em *Artemia salina*

## SUMÁRIO

1 Introdução.....	16
2 Objetivos	
2.1 Geral.....	18
2.2 Específicos.....	18
3 Revisão da bibliográfica	
3.1 Produtos Naturais e a diversidade biológica no Brasil.....	19
3.2 Família Lauraceae Jussieu.....	22
3.2.1 Metabólitos secundários .....	25
3.2.1.1 Neolignanas.....	28
3.2.1.2 Alcalóides.....	32
3.2.1.3 Flavonóides.....	35
3.2.1.4 Terpenóides e Fenilpropanóides.....	38
3.2.2 Gêneros.....	43
3.2.2.1 <i>Endlicheria</i> Nees.....	43
3.2.2.2 <i>Rhodostemonodaphne</i> Roher & Kubitzki.....	44
3.2.2.3 <i>Ocotea</i> Aublet.....	46
3.3 Atividades química/biológicas.....	51
3.3.1 Atividades Antioxidantes .....	51
3.3.1.1 Radicais Livres.....	51
3.3.1.2 Antioxidantes.....	54
3.3.1.3 Avaliação das atividade Antioxidante utilizando radical livre DPPH.....	56
3.3.2 Citotoxicidade .....	58
3.3.2.1 Letalidade em <i>Artemia salina</i> Leach.....	58
3.3.2.2 Citotoxicidade em células tumorais.....	60
3.3.3 Ensaio de inibição da enzima acetilcolinesterase.....	63
3.4 Métodos cromográficos.....	67
3.4.1 Cromatografia em Camada Delgada.....	68
3.4.2 Cromatografia Gasosa.....	69

4 Metodologia	
4.1 Coleta.....	70
4.2 Obtenção dos extratos.....	71
4.3 Prospecção.....	72
4.3.1 Fenóis.....	72
4.3.2 Flavonóides.....	72
4.3.3 Alcalóides.....	72
4.4 Frações alcaloídicas.....	73
4.4.1 Obtenções da fração alcaloídica.....	73
4.4.2 Análise da fração alcaloídica por CCD.....	74
4.4.3 Análise da fração alcaloídica por espectrometria de massa.....	74
4.5 Óleo essencial.....	75
4.5.1 Extração do óleo.....	75
4.5.2 Análise dos óleos essenciais.....	75
4.5.2.1 Análise em CG-DIC.....	75
4.5.2.2 Análise em CG-EM.....	76
4.5.2.3 Análise por RMN.....	76
4.5.3 Identificação dos constituintes dos óleos essenciais.....	76
4.6 Testes Químico/biológicos.....	78
4.6.1 Ensaio de atividade inibidora da enzima acetilcolinesterase.....	78
4.6.2 Análise da atividade antioxidante frente ao radical livre DPPH.....	78
4.6.2.1 Análise qualitativa da atividade antioxidante.....	79
4.6.2.2 Análise quantitativa da atividade antioxidante.....	79
4.6.3 Ensaio de letalidade sobre <i>Artemia Salina</i> Leach.....	81
4.6.4 Atividade citotóxica em células tumorais .....	81
5 Resultados e discussão.....	83
5.1 Rendimento do extrato.....	83
5.2 Prospecção Fitoquímica.....	84
5.3 Fração Alcaloídica.....	86
5.3.1 Rendimento da Partição.....	86
5.3.2 Análise por CCD.....	87
5.3.3 Análise por espectrometria de massa.....	96
5.4 Óleo essencial.....	101

5.4.1 Rendimento.....	101
5.4.1.1 <i>Endlicheria</i> .....	102
5.4.1.2 <i>Ocotea</i> .....	105
5.4.1.3 <i>Rhdostemonodaphne</i> .....	110
5.5 Atividades Química/biologias.....	114
5.5.1 Atividade antioxidante.....	114
5.5.1.1 Qualitativa.....	116
5.5.1.2 Quantitativa.....	116
5.5.2 Atividade citotóxica.....	121
5.5.2.1 Letalidade em <i>Artemia Salina</i> .....	121
5.5.2.2 Citotóxica em células de linhagem tumoral.....	121
5.5.3 Atividade inibidora da enzima acetilcolinesterase.....	122
.	
6 Considerações finais .....	125
7 Referências bibliográficas .....	127
8 Anexos.....	146

## INTRODUÇÃO

As plantas constituem uma das mais importantes fontes de substâncias químicas orgânicas, apresentando variadas classes com interesses científicos devido às suas propriedades biológicas e químicas. Na busca por novos fármacos, os produtos naturais destacam-se pela diversidade estrutural e, assim, as plantas são candidatas importantes para a prospecção de novos compostos bioativos (Giordani *et al*, 2008).

Verifica-se que a Amazônia, mesmo possuindo uma grande diversidade biológica, apresenta poucos estudos em relação à quantidade de espécies presentes nas florestas (Nodori & Guerra, 2004).

A família Lauraceae destaca-se na Floresta Amazônica pelo endemismo e uso econômico em virtude da boa qualidade da madeira, do alto valor comercial que alcançam seus óleos essenciais (Quinet & Andreatta, 2002) e da presença de uma importante classe de metabólitos que são os alcalóides, responsáveis por diversas atividades terapêuticas. Mais de 400 alcalóides já foram identificados em 189 espécies de Lauraceae. Segundo Zanin e Lordello (2007), cerca de 54 alcalóides aporfinóides com pronunciada bioatividade foram isolados no gênero *Ocotea*. Dentre as atividades biológicas mais citadas pode-se destacar a capacidade antioxidante, atividade antiinflamatória, analgésica e cardiovascular.

Lauraceae apresenta espécies utilizadas em grande escala como o abacate (*Persea americana*), a canela (*Cinnamomum verum*) e espécies aromáticas utilizadas para perfumaria como as extraídas de canela-sassafrás (*Ocotea odorífera*) e pau rosa (*Aniba rosaeodora*), sendo dessa forma utilizada internacionalmente.

Considerando as pesquisas em isolamento de compostos bioativos e a importância da família Lauraceae na Floresta Amazônica, uma pesquisa sobre espécies desta família que ainda não foram analisadas cientificamente torna-se importante para a investigação de novas substâncias presentes nos extratos e na composição química de óleos essenciais. Neste trabalho serão analisadas sete espécies de Lauraceae distribuídas em três gêneros *Endlicheria*, *Ocotea* e *Rhodostemonodaphne* visando desvendar parte da imensa diversidade biológica da floresta Amazônica e buscando a possibilidade de serem observadas atividades biológicas pronunciadas.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

- Descrever a composição química dos óleos essenciais e atividades químicas e biológicas de extratos etanólicos de espécies da família Lauraceae.

### 2.2 Objetivos específicos

- Verificar a presença de alcalóides através de métodos de prospecção dos extratos etanólicos, comparando os diferentes extratos das plantas estudadas;
- Analisar o perfil das frações alcaloídicas através de espectrometria de massa;
- Analisar o perfil cromatográfico (CG-DIC e CG-EM) dos óleos essenciais das cascas, folhas e galhos das sete espécies;
- Verificar as atividades inibidora da enzima acetilcolinesterase, antioxidante frente ao radical livre DPPH e citotóxica sobre *Artemia salina* e células de linhagem tumoral dos extratos etanólicos.

## 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 3.1 Produtos Naturais e a diversidade biológica no Brasil

A natureza tem produzido a maioria das substâncias orgânicas conhecidas. Dentre os diversos reinos da natureza, o reino vegetal é o que tem contribuído de forma mais significativa para o fornecimento de metabólitos secundários, muitos destes de grande valor agregado devido As suas aplicações como medicamentos, cosméticos, alimentos e agroquímicos (Phillipson & Anderson, 1998).

A espécie humana se aproveita de uma fração muito pequena das plantas com as quais sempre conviveu e que a antecedem no planeta Terra. O reino vegetal ainda permanece como uma grande incógnita cujos mistérios começam a serem desvendados. Não pode existir vida na terra sem a presença de plantas e, estudá-las, sob qualquer que seja a ótica científica, é parte do domínio da química de Produtos Naturais (Pinto *et al*, 2002).

Os produtos naturais são utilizados desde tempos imemoriais na busca por alívio e cura de doenças pela ingestão de ervas e folhas talvez tenha sido uma das primeiras formas de utilização de produtos naturais. A natureza sempre despertou no homem um fascínio encantador, não só pelos recursos oferecidos para sua alimentação e manutenção, mas por ser sua principal fonte de inspiração e aprendizado (Viegas Jr & Bolzani, 2006).

Ao longo do tempo a humanidade selecionou apenas cerca de 300 plantas para a alimentação e, de um pouco mais de uma centena, obteve princípios ativos puros para o tratamento de doenças. Estes números são bem modestos quando se está diante de um universo superior a 250.000 espécies de plantas superiores.

Verifica-se que as atividades da fitoquímica podem contribuir significativamente para a concretização do desenvolvimento sustentável de um país através da investigação da flora, da divulgação e geração de novos conhecimentos e da formação de recursos humanos qualificados (Braz Filho, 2010).

A preocupação com a busca de aplicação para as moléculas isoladas de fontes naturais através do seu uso como modelos químicos para a indústria é uma nova tendência, que enfatiza a realização de trabalhos em colaboração. O valor potencial da biodiversidade brasileira encarada como fonte de produtos de alto valor agregado, requer políticas que garantam a sua exploração de forma racional (Pinto *et al*, 2002).

Estima-se a existência de 250.000 espécies de plantas superiores. Cerca de 80% da população dos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento continuam completamente dependentes da medicina caseira utilizando vegetais para as necessidades primárias de saúde. Tem sido estimado que somente de 5-15% destas espécies foram investigadas, restando uma fonte natural de inúmeros organismos vivos contendo significativo número de substâncias inéditas e forte potencial de produtos naturais bioativos, incluindo-se fontes de matérias-primas para o desenvolvimento de novos fármacos (Braz Filho, 2010).

A magnitude da biodiversidade brasileira não é conhecida com precisão tal a sua complexidade, estimando-se a existência de mais de dois milhões de espécies distintas de plantas, animais e microorganismos (Nodari & Guerra, 2004).

Só um trabalho científico integrado de todos os grupos existentes no país poderá, num tempo limite, propiciar o conhecimento real da diversidade química dos ambientes tropicais e auxiliar nos estudos futuros sobre o perfil metabólico e

associações com perfil macromolecular das espécies de interesse de nossa biota (Pinto, *et al*, 2002).

Nesse contexto, a varredura dos extratos brutos antes do isolamento é uma metodologia que auxilia no direcionamento das investigações químicas sobre a composição dos extratos bem como contribuindo para a triagem de gêneros e espécies promissoras. Esse perfil caracteriza o grupo de pesquisa Q-Bioma, um grupo de pesquisa fitoquímico da Universidade Federal do Amazonas que visa inicialmente analisar o perfil dos extratos para posteriormente selecionar as frações de interesse.

### 3.2 Família Lauraceae Jussieu

A família Lauraceae é apontada no Brasil como uma das mais representativas, tanto em número de indivíduos quanto em riqueza de táxons, nos inventários florísticos e fitossociológicos realizados em áreas de florestas bem preservadas do país (Vattimo-Gil, 1959; Kurtz, 2000) sendo considerada uma das famílias mais primitivas pertencentes à divisão Magnoliophyta ( Marques *et al.*, 2001). Possuem distribuição pan tropical sendo bem representadas na América, Ásia Tropical, Austrália e Madagascar e no sul da África, conforme a figura 1. Possuem cerca de 50 gêneros e 2500 espécies, sendo que no Brasil existem cerca de 400 espécies distribuídas em 25 gêneros, contribuindo assim com cerca de 16% do total dessas espécies (Barroso *et al.*, 2002). Nas Américas ocorrem cerca de 29 gêneros e 900 espécies. A família é freqüente em florestas tropicais, com algumas espécies habitando grandes altitudes, mas a grande diversidade ocorre em terras baixas da Amazônia e América Central (Rohwer, 1993).



Figura 1 – Mapa da distribuição geográfica da família Lauraceae. FONTE: Missouri Botanical Garden.

A família Lauraceae é uma das que apresenta maior importância econômica em todo o mundo com um número expressivo de espécies que apresentam uma grande diversidade de usos, com destaque para as que possuem utilização medicinal e na

indústria, sendo utilizada na culinária, na fabricação de papel, marcenaria e construção civil, na indústria química e na medicina popular (Marques, 2001).

O potencial econômico das espécies dessa família é conhecido desde os tempos remotos, através de documentos da China de 2800 a.C., onde já era empregado o óleo de *Cinnamomum camphora* (L.) J.Presl e de outras espécies deste gênero na medicina (Sangirardi Jr., 1984). Segundo Quinet (2002), as folhas de *Laurus nobilis* L., o loureiro, eram utilizadas pelos antigos gregos e romanos para confeccionar coroas, com as quais se homenageavam guerreiros e atletas vitoriosos, e estão entre os condimentos mais conhecidos da culinária de todo o mundo. Os primeiros registros relativos à utilização das espécies desta família influenciaram o nome de muitos gêneros que fazem uma alusão àquela época como o gênero *Phoebe* que tem seu nome relacionado ao deus Apolo e *Laurus* L. que vêm do celta “laus” e significa louvor em grego (Barroso *et al.*, 2002).

A casca ou o fruto de algumas espécies são usadas como condimentos (*Dicypellium caryophyllaceum*) ou para fazer chá (*Licaria puchury-major* e *Aniba canelilla*). Espécies utilizadas em grande escala são o abacate (*Persea americana*), a canela (*Cinnamomum verum*) e o louro (*Laurus nobilis*). A madeira de Lauraceae é amplamente explorada em diversas regiões. Na Amazônia, a itaúba (*Mezilururs* spp.) é a madeira preferida para construção de embarcações devido a sua alta durabilidade e resistência. Diversas outras espécies constituem o principal produto madeireiro comercializados em Manaus sob o nome de “louro” (Ribeiro *et al.*, 1999).

O alto valor econômico das espécies tem levado a uma exploração crescente ao longo dos anos (Marques, 2001). O interesse econômico nos óleos essenciais é devido ao uso industrial, podendo-se destacar espécies dos gêneros *Ocotea*,

*Nectandra* e *Aniba*, conhecidas popularmente como canelas, loureiros e pau-rosa, respectivamente (Ribeiro *et al.*, 1999).

A extração de linalol, principal componente do óleo essencial de *Aniba rosaeodora* Ducke, utilizado como fixador na indústria de perfumes, segundo Rizzini e Mors (1995), deu-se inicialmente como subproduto da indústria de cânfora, no Japão, devido o mesmo ser um componente do óleo volátil da madeira canforeira. Em 1925, descobriu-se em Juriti Velho (Pará) a árvore conhecida na região como pau-rosa. Este nome popular refere-se ao odor da madeira, a qual, quando recentemente cortada, exala delicado perfume. Verificou-se, em seguida, que tal cheiro era devido ao óleo essencial desta madeira, que encerra linalol como componente principal. Desde então, se desenvolveu naquela localidade uma indústria extrativa para a obtenção do mencionado óleo. Esta indústria tomou tal vulto que figurou, durante muitos anos, entre as mais prósperas da Amazônia. Ainda na década de 1960 produziam-se entre 300 e 400 toneladas de óleo essencial de pau-rosa por ano, sacrificando para tanto 50.000 toneladas de madeira.

A exploração de *Aniba rosaeodora* Ducke fez com que essas espécies fossem levadas próximas a extinção devido o óleo essencial de pau-rosa localizar-se no terceiro lugar na pauta de exportação da região Amazônica, cabendo a borracha e à castanha, o primeiro e o segundo lugares, respectivamente (Marques, 2001).

As espécies da família Lauraceae, principalmente pertencentes aos gêneros *Nectandra*, *Licaria*, *Ocotea* e *Aniba* apresentaram um novo grupo de compostos secundários. As neolignanas descobertas por um dos consolidadores da fitoquímica brasileira, o professor Otto Gottlieb na década de 1970, (Gottlieb & Yoshida, 1978) apresentam muitas atividades biológicas, entre elas a atividade antitumoral.

### 3.2.1 Principais Metabólitos secundários encontrados em Lauraceae

Dá-se o nome de metabolismo ao conjunto de reações químicas que continuamente estão ocorrendo em cada célula. A presença de enzimas específicas garante certa direção a essas reações, estabelecendo o que se denomina de rotas metabólicas. Essas reações visam, primariamente, ao aproveitamento de nutrientes para satisfazer as exigências fundamentais da célula: energia (derivada basicamente de ATP), poder redutor (NADPH) e biossíntese das substâncias essenciais à sua sobrevivência (macromoléculas celulares) (Santos, 2004).

De acordo com a teoria evolucionista, todos os seres vivos derivam de um precursor comum, do qual conservam algumas características. Os processos essenciais à vida e comuns aos seres vivos, têm sido definidos como metabolismo primário. Basicamente, todos os organismos convivem com os mesmos tipos de metabólitos primários e segundo Gottlieb *et al.* (1996), os metabolismos primários são reações fornecedoras de matérias primas e de energia para a formação dos metabólitos secundários, designados especiais.

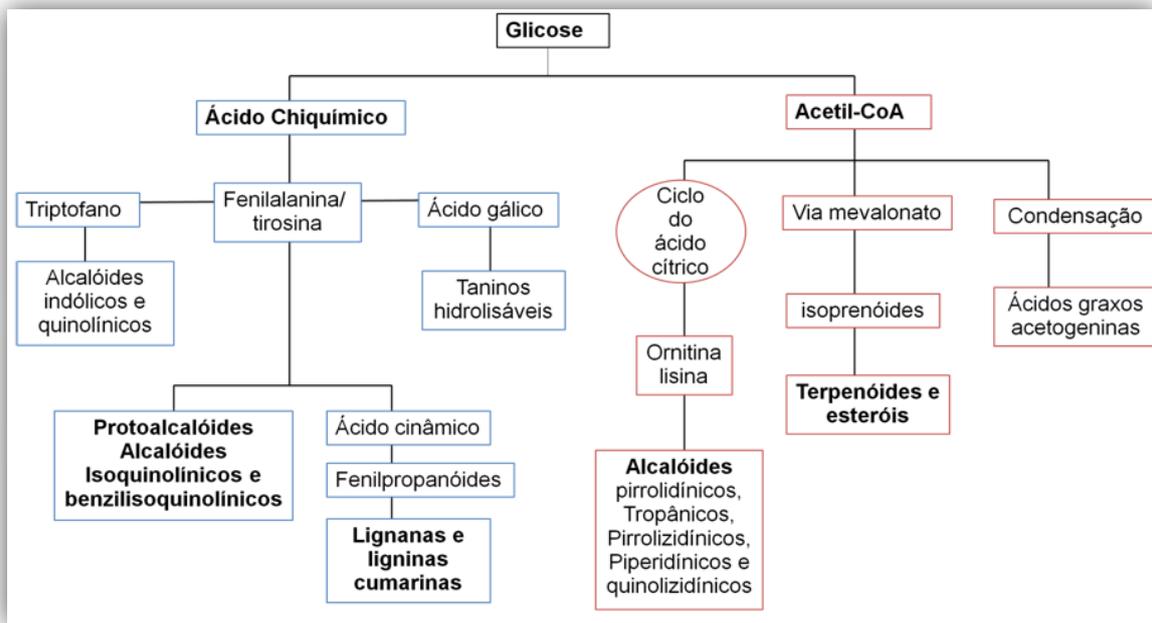
Vegetais, microorganismos e, em menor escala, animais, apresentam todo um arsenal metabólico (enzimas, coenzimas e organelas) capazes de produzir, transformar e acumular inúmeras outras substâncias não necessariamente relacionadas de forma direta à manutenção da vida do organismo produtor. Nesse grupo, encontram-se substâncias cuja produção e acumulação estão restritas a um número limitado de organismos, com bioquímica e metabolismo específicos e únicos, caracterizando-se como elementos de diferenciação e especialização (Wink, 1990).

Os metabólitos secundários são conhecidos como metabólitos especiais, cujos produtos, embora não necessariamente essenciais para o organismo produtor, garantem vantagens para sua sobrevivência e para a perpetuação de sua espécie, em seu ecossistema (Santos, 2004).

Os metabólitos especiais são específicos das espécies e participam das interações intra e intercelular do próprio organismo ou com células de outros organismos, atuam em processos vitais como mediadores em interações ecológicas, como por exemplo, a defesa contra herbívoros e microorganismos, a proteção contra raios UV, atração de polinizadores ou animais, dispersores de sementes e em interações alelopáticas ( Santos, 2004; Cechinel Filho & Bresolin, 2003).

Embora classificadas como sendo ou do metabolismo primário ou do especial, as reações bioquímicas não ocorrem independentemente em um mesmo produtor. Alterações no primeiro podem afetar profundamente o segundo e, embora o reverso não seja verdadeiro. Além disso, muitos metabólitos especiais são formados por seqüência de reações análogas àquelas do metabolismo primário. Portanto, a linha divisória entre metabolismo primário e especiais não é nítida (Dewick, 2002). No esquema 1 pode ser visualizada a origem de todos os metabólitos especiais a partir do metabolismo da glicose, por meio de intermediários principais, o ácido chiquímico e o acetato.

De forma geral, os mais importantes grupos de metabólitos secundário vegetal citam-se tradicionalmente os alcalóides, os terpenóides e os flavonóides. Verifica-se na família Lauraceae a prevalência de monoterpenos e sesquiterpenos, encontrados nos óleos essenciais, alcalóides e neolignanais encontrados nos extratos.



Esquema 01: Via biossintética dos metabólitos especiais. Fonte: Santos, 2004.

A família Lauraceae caracteriza-se quimicamente por apresentar, em sua composição alcalóides isoquinolínicos, indólicos e triptofânicos (Figura 2). Dentre os alcalóides isoquinolínicos, os aporfínóides representam um grupo grande e ainda em expansão comumente encontrado nas mais diversas espécies de Lauraceae.

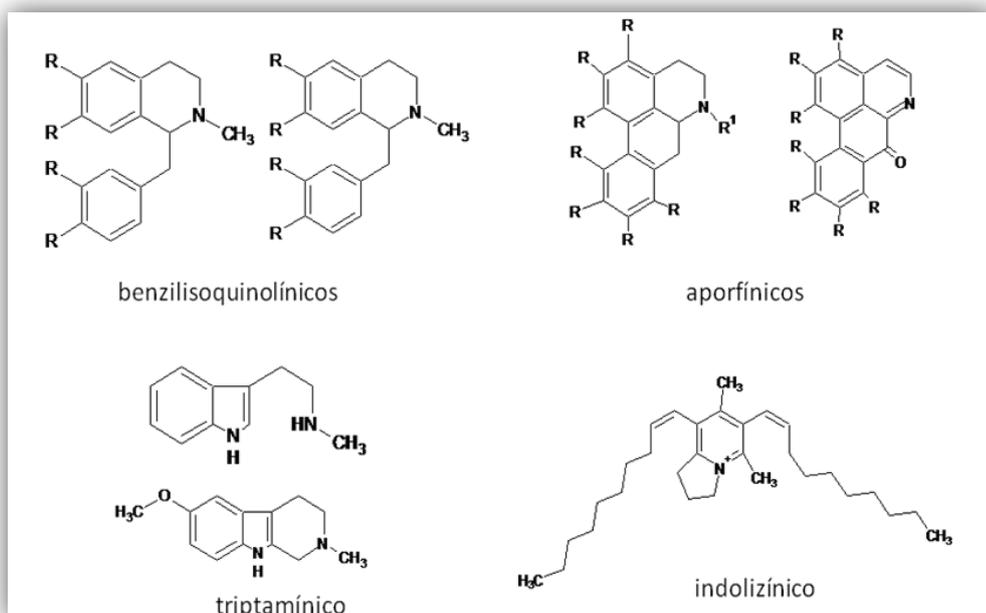


Figura 2: Alcalóides encontrados em Lauraceae

### 3.2.1.1 Neolignanas

As lignanas são substâncias que se depositam nas paredes das células vegetais, conferindo a estas, notável rigidez. Constituem de 15-35% da matéria seca dos troncos das gimnospermas e angiospermas, além de serem constituintes da parede celular de tecidos associados a caule, folha e raiz de todas as plantas vasculares. A quantidade de lignanas existentes na superfície da terra é imensa, inferior apenas à quantidade de carboidratos. Dada esta importância, compreende-se facilmente porque a ocorrência, função, formação, estrutura, reações e a utilização de lignanas recebem tanta atenção (Barbosa Filho, 2004).

As lignanas são macromoléculas, polímeros de unidades básicas de *n*-propilbenzenos C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>, que são ligadas pelo carbono β de suas cadeias laterais (C<sub>3</sub>). São dímeros formados através do acoplamento oxidativo de alcoóis cinâmicos entre si ou destes com ácidos cinâmicos. Esse termo, criado em 1942 por Haworth, se prestava muito bem para as poucas substâncias descritas àquela época. Estruturalmente, os dois resíduos *n*-propilbenzênicos apresentam o carbono gama (C-9) oxigenado (Gottlieb & Yoshida, 1984).

As neolignanas (do grego *néos* = novo, moderno) surgiram por causa da crescente variabilidade estrutural em relação a definição de Haworth que ficou limitada. Isso fez com que Gottlieb, em 1978, denominasse os dímeros oxidativos de alilfenóis ou de propenilfenóis, entre si ou cruzados e não apresentam o carbono gama (C-γ) oxigenado de neolignanas (Barbosa Filho, 2004; Gottlieb, 1984).

O processo geral de biossíntese dos lignóides (neolignana e lignana) é mostrado a seguir na figura 3, envolvendo os metabólitos primários finais da via metabólica do chiquimato. Lignóide é uma designação genérica que caracteriza micromoléculas, cujo esqueleto é formado exclusivamente pelo grupo fenilpropânico

$(C_6-C_3)_n$ , sendo  $n$  restrito a poucas unidades, 1, 2, 3 etc. As lignanas apresentam como precursores monoméricos ácidos cinâmicos ou alcoóis cinâmicos, enquanto as neolignanas apresentam como precursores monoméricos propenilbenzenos ou alilbenzenos (Barbosa Filho, 2004).

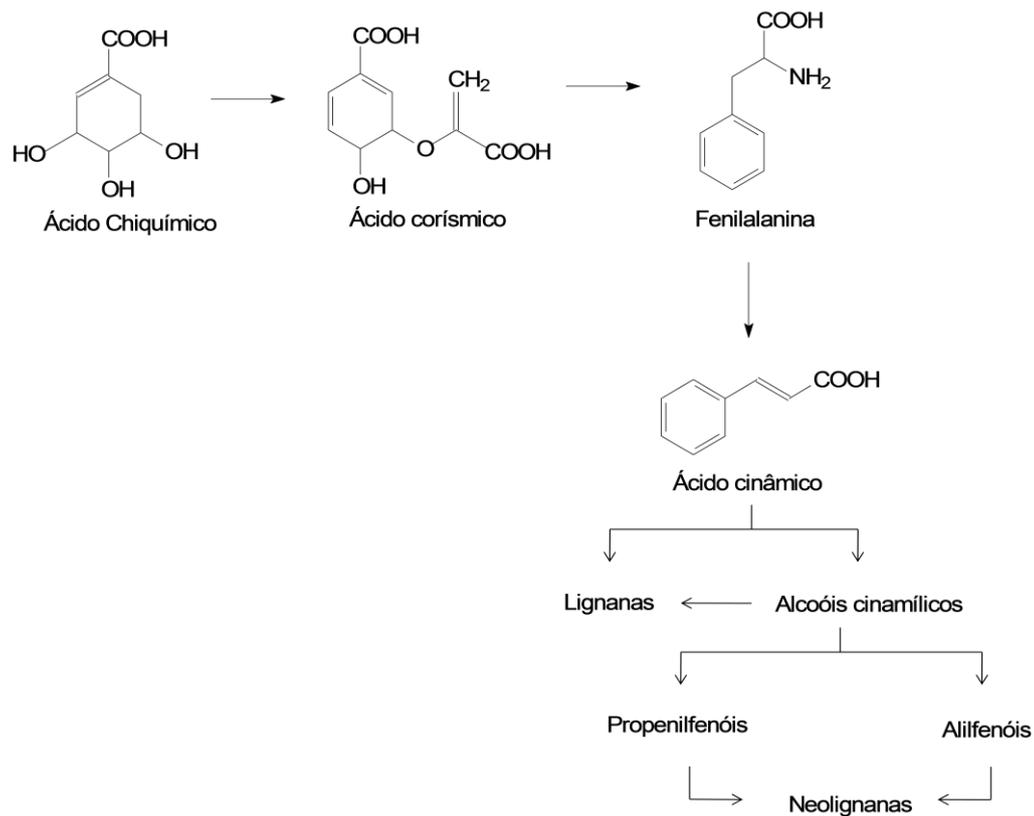


Figura 3: biossíntese das lignanas e das neolignanas. Fonte: Barbosa Filho, 2004.

As Lignanas e neolignanas desempenham importante papel na defesa das plantas, atuando como agentes antimicrobianos, antifúngicos e insetífugos. As neolignanas acumulam em madeiras como resposta a ferimentos mecânicos ou ao ataque de microorganismos e que exibem propriedades de defesa contra insetos. Por terem atividade antitumoral e antiviral, as neolignanas despertam grande interesse farmacológico (Robbers *et al.*, 1997). A figura 04 mostra os tipos estruturais das neolignanas mais representativos e sua designação de acordo com trabalhos de revisão de Gottlieb (1978) e Gottlieb e Yoshida (1984).

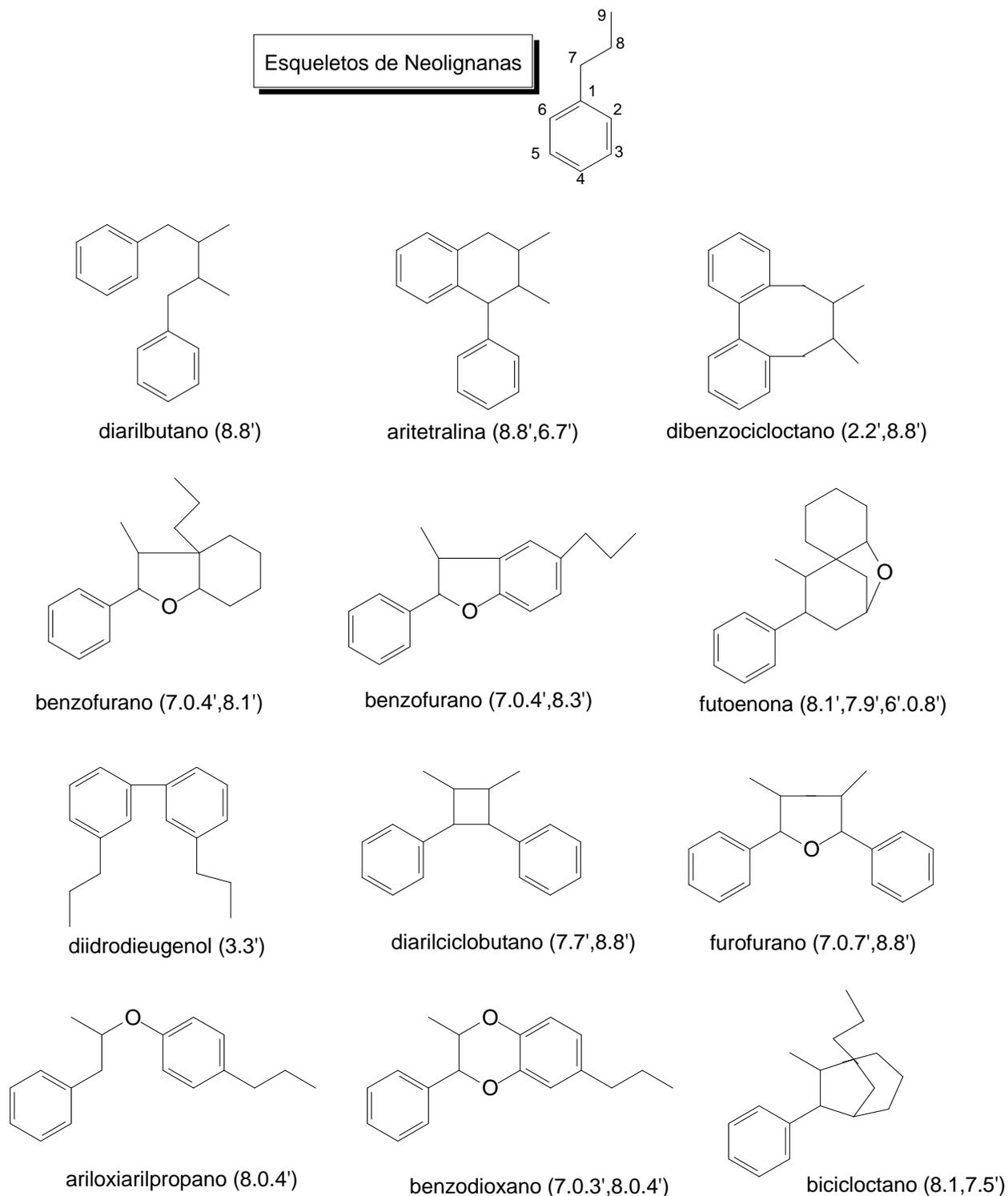


Figura 4: Esqueletos clássicos de neolignanas. Fonte: Barbosa Filho, 2004.

As lignanas são solúveis em solvente apolares, tais como éter de petróleo e análogos, principalmente se a porção do anel estiver metoxilada, como acontece na maioria das vezes. As neolignanas geralmente se apresentam como óleos de alta viscosidade e apresentam média polaridade (Barbosa Filho, 2004).

No Brasil, o grupo de pesquisa liderado pelo professor Otto Gottlieb contribuiu significativamente para o conhecimento da química das neolignan. A família Lauraceae foi a mais estudada, principalmente os gêneros *Aniba*, *Licaria*, *Nectandra* e *Ocotea*, com quase duas centenas de substâncias inéditas registradas na literatura. Numa avaliação aproximada, já foram isoladas por volta de 700 lignóides, dos quais 270 são neolignanas (figura 5) (Barbosa Filho, 2004).

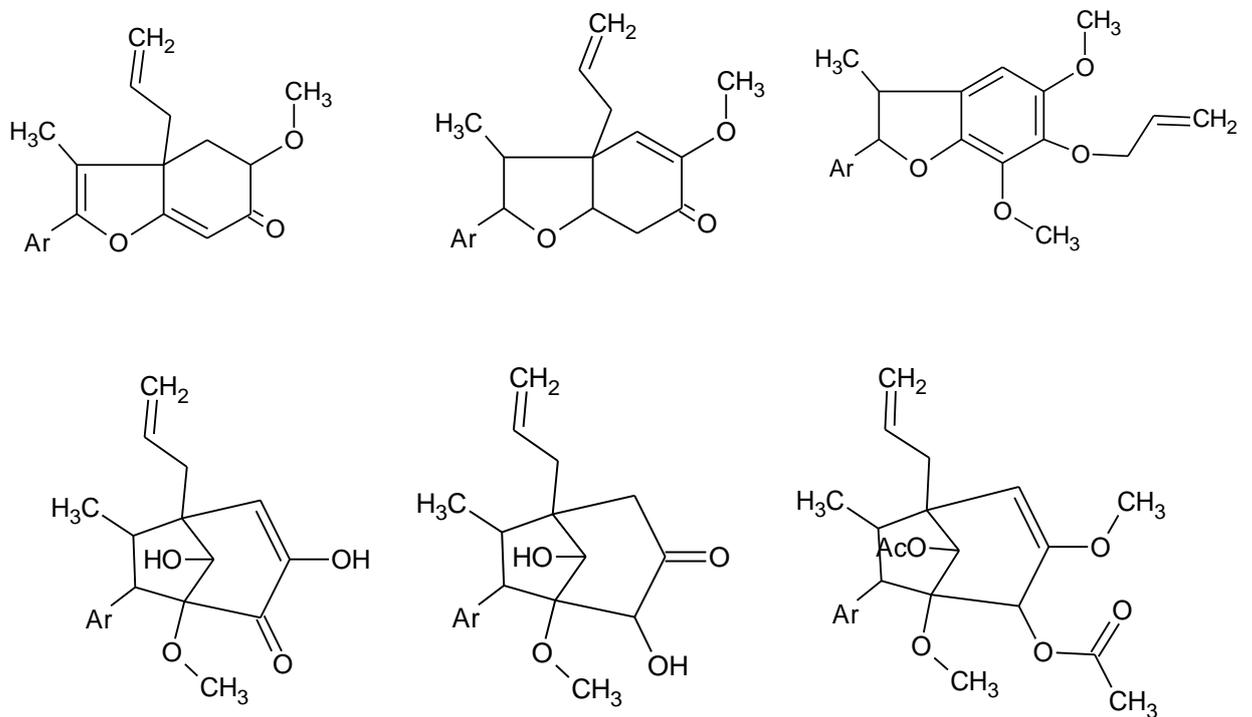


Figura 5: Exemplos de neolignanas encontradas em Lauraceae.

### 3.2.1.2 Alcalóides

O isolamento das primeiras substâncias puras do reino vegetal ocorreu no Século XIX. Este século caracterizou-se pelos trabalhos de extração, principalmente de ácidos orgânicos e de bases orgânicas, as quais mais tarde receberam a denominação de alcalóides (Almeida *et al.*, 2009).

Os extratos de plantas contendo alcalóides são utilizados como medicamentos, venenos e poções mágicas desde os primórdios da civilização. Desta maneira é difícil estabelecer a origem correta da descoberta destas substâncias. Registros indicam que o ópio era utilizado pelos Sumérios há 4000 anos a.C. devido as suas propriedades soporíficas e analgésicas (Hostettman *et al.*, 2003).

São compostos nitrogenados que têm na sua estrutura, além de carbono e hidrogênio, usualmente também oxigênio. Sua basicidade típica é no entanto, muito variável, pois depende dos agrupamentos adjacentes, ao nitrogênio. Quando o nitrogênio pertence a uma amida, por exemplo, a presença da carbonila torna o alcalóide praticamente neutro. São encontrados predominantemente nas angiospermas e em menor extensão em microorganismos e animais ( Dewick, 2002; Henriques *et al*, 2004; Cunha *et al.*, 2005).

A presença de alcalóides pode ser assinalada em ampla gama de atividades biológicas, como analgésicos e narcóticos (morfina, codeína), estimulantes SNC (estricnina, brucina), elevação na pressão sanguínea (efedrina) ou queda da hipertensão arterial (reserpina). Na verdade, os alcalóides são capazes de exercer diversas de atividades fisiológicas (Robbers *et al*, 1997). Alguns exemplos de alcalóides são apresentados na figura 6:

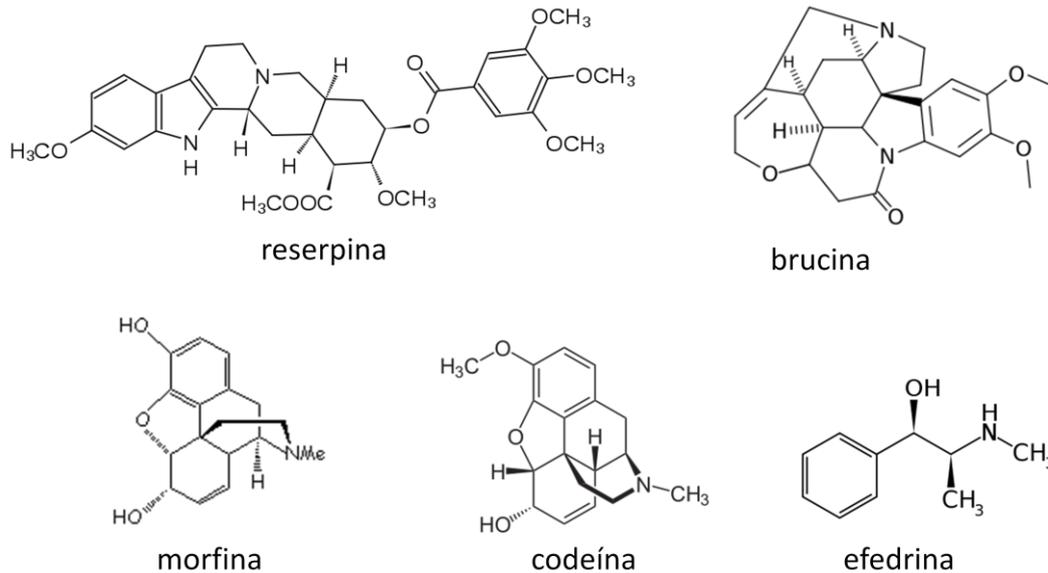


Figura 6: Estrutura de alguns alcalóides.

Os alcalóides, assim como outras aminas, formam sais duplos com compostos de mercúrio, ouro, platina e outros metais pesados. Esses sais duplos em geral são obtidos como precipitados, e muitos deles são característicos em microcristalografia. Os reagentes alcaloídicos comuns são o de Wagner (iodo em iodeto de potássio), de Mayer (cloro-iodo mercurato de potássio) e Dragendorff (iodo bismutato de potássio) (Robbers *et al.*, 1997).

Os alcalóides 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. A maioria deriva de aminoácidos alifáticos, aromáticos como a fenilalanina ou a tirosina, ou do triptofano (Dewick, 2002).

A família Lauraceae caracteriza-se quimicamente pela ocorrência freqüente de alcalóides, sendo predominante a ocorrência de alcalóides indolizínico, benzilisoquinolínico, triptamínico e aporfinoídes (Cordell *et al.*, 2001). Na figura 7 verifica-se a rota biossintética dos alcalóides benziltetrahydroisoquinolínicos.

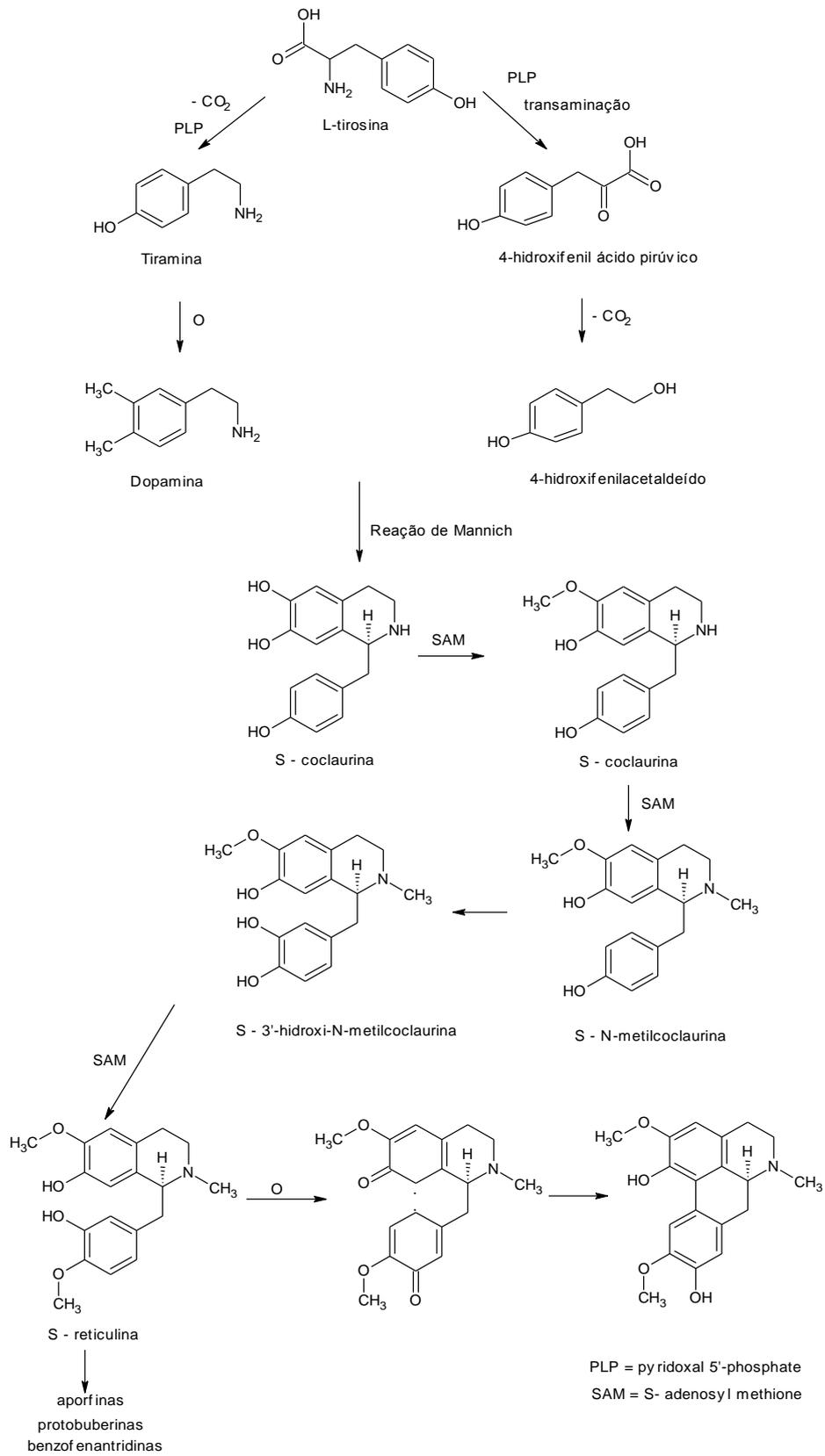


Figura 7 - Rota biossintética dos alcalóides benziltetrahydroisoquinólicos. Fonte: Dewick, 2002.

### .2.1.3 Flavonóides

Os flavonóides representam um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem natural. Essa classe de compostos é amplamente distribuída no reino vegetal e sua presença parece estar relacionada com funções de defesa (proteção contra raios ultravioletas, ações antifúngica e antibacteriana) e de atração de polinizadores (Zuanazzi & Montanha, 2004).

De forma geral são moléculas de baixo peso molecular caracterizados por apresentarem dois núcleos fenólicos ligados por uma cadeia de três carbonos. A estrutura básica dos flavonóides consiste num núcleo flavano, constituído de quinze átomos de carbono arranjados em três anéis ( $C_6-C_3-C_6$ ), sendo dois anéis fenólicos (ou metoxilados) substituídos (**A** e **B**) e um pirano (cadeia heterocíclica **C**) acoplado ao anel A (Figura 8) (Cunha *et al.*, 2005).

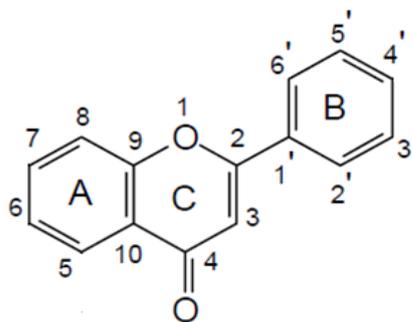


Figura 08: Estrutura básica dos flavonóides

As várias classes de flavonóides diferem no nível de oxidação e no modelo de substituição da cadeia heterocíclica C. Algumas classes de flavonóides de interesse são flavonas, flavonóis, flavanonas, flavan-3-ol, isoflavonas, antocianidinas e flavanolol (Di Carlo *et al.*, 1999)

O esqueleto básico dos flavonóides resulta de rotas biossintéticas separadas: a do ácido chiquímico e a do acetato, via ácido malônico. A primeira origina

fenilalanina, o precursor do ácido cinâmico, que por sua vez, origina o ácido cumárico, responsável por um dos anéis aromáticos (anel B) e a ponte de três carbonos. A segunda, resulta no outro anel aromático (anel A) do esqueleto básico dos flavonóides (Dewick, 2002; Santos, 2004) (Figura 9).

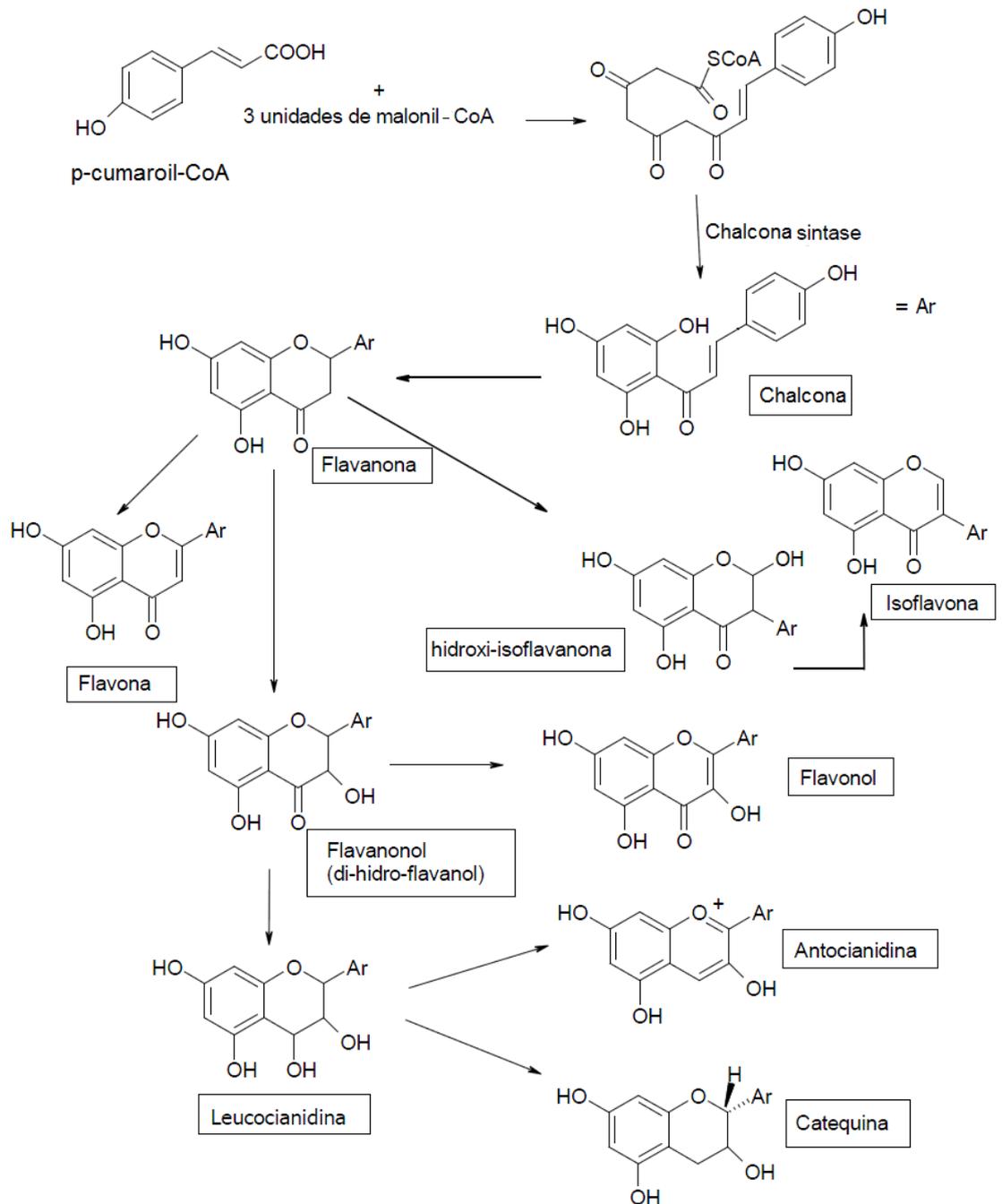


Figura 9: biossíntese geral dos flavonóides

Flavonóides geralmente ocorrem em plantas como derivados glicosilados, contribuindo para a coloração do azul, do vermelho e do laranja nas folhas, flores e frutos. Também estão associados com diferentes propriedades biológicas. Foram atribuídas diferentes funções na natureza a vários flavonóides: compostos antimicrobianos, produtos do estresse de metabólitos ou moléculas sinalizadoras (Robbers et al., 1997).

### 3.2.1.4 Terpenóides e fenilpropanóides

Ao longo da evolução as espécies vegetais desenvolveram vias metabólicas que lhes permitiam sintetizar uma grande diversidade de metabólitos especiais. Entre esses metabólitos incluem-se alguns compostos de baixo peso molecular que, voláteis, são percebidos pelo sistema olfativo como substâncias dotadas de aromas, sendo usualmente designados como compostos aromáticos. As plantas que os produzem e acumulam em quantidades apreciáveis são, por isso, denominadas plantas aromáticas (Cunha *et al.*, 2005).

Estas substâncias voláteis e odoríferas, produzidas em misturas complexas, são geralmente lipofílicas e líquidas que podem ser isoladas na forma de um óleo denominado óleo essencial (Simões & Spitzer, 2004).

Os componentes químicos dos óleos essenciais podem ser divididos em duas grandes classes, com base na biossíntese que lhes deu origem: (1) derivados de terpenóides, formados através da via ácido mevalonato-acetato, via fosfato desoxixilulose e (2) fenilpropanóides formados através da via do chiquimato (Robbers *et al.*, 1997).

Os fenilpropanóides são formados via ácido chiquímico que por sua vez é formado a partir da condensação do fosfoenolpiruvato e da eritrose-4-fosfato. O ácido chiquímico é responsável pela formação das duas unidades básicas dos fenilpropanóides, o ácido cinâmico e o ácido p-cumarico que por meio de redução, oxidação e ciclização formam os alilbenzenos, aldeídos aromáticos, propenilbenzenos e cumarinas (Simões & Spitzer, 2004) conforme a figura 10.

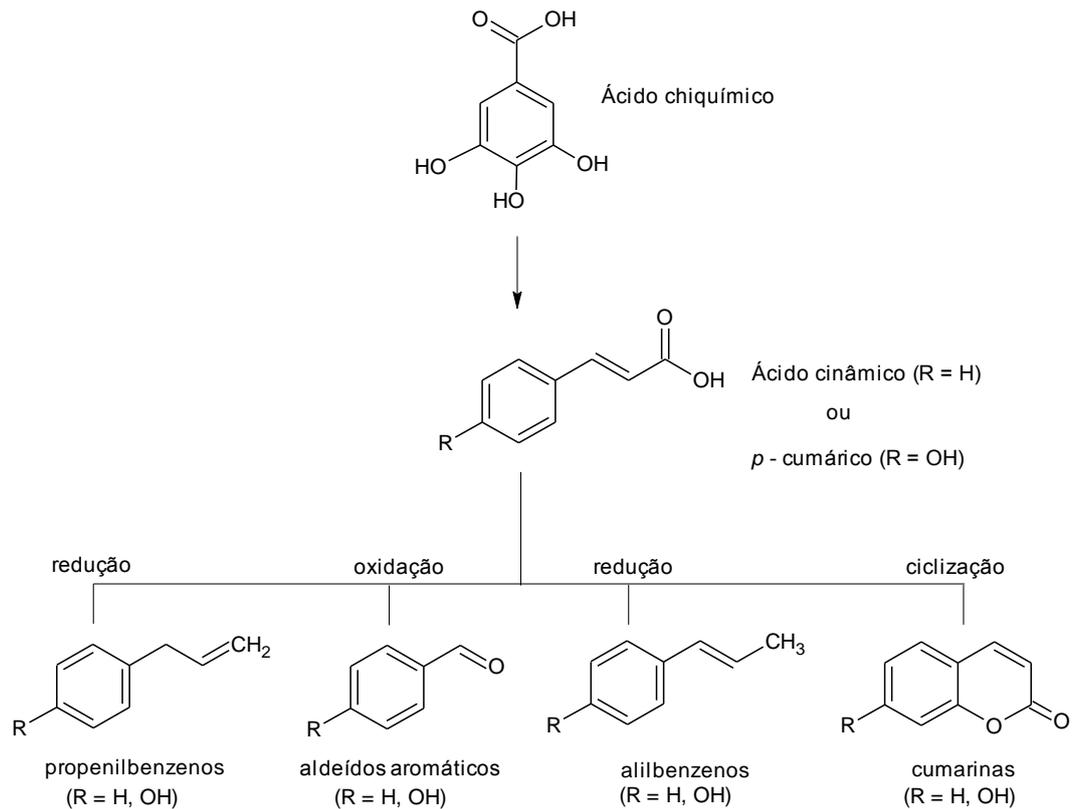


Figura 10 : Formação de compostos fenilpropanóides

Os terpenóides constituem uma grande variedade de moléculas, sendo esse termo empregado para designar todas as substâncias cuja origem biossintética deriva de unidades do isopreno. A unidade isoprenica, por sua vez, origina-se a partir do ácido mevalônico e a via da eritrose. Os compostos terpênicos mais freqüentes nos óleos voláteis são os monoterpenos (cerca de 90% dos óleos voláteis) e os sequiterpenos (Simões & Spitzer, 2004). Na figura 11 pode-se visualizar a formação de compostos terpênicos.

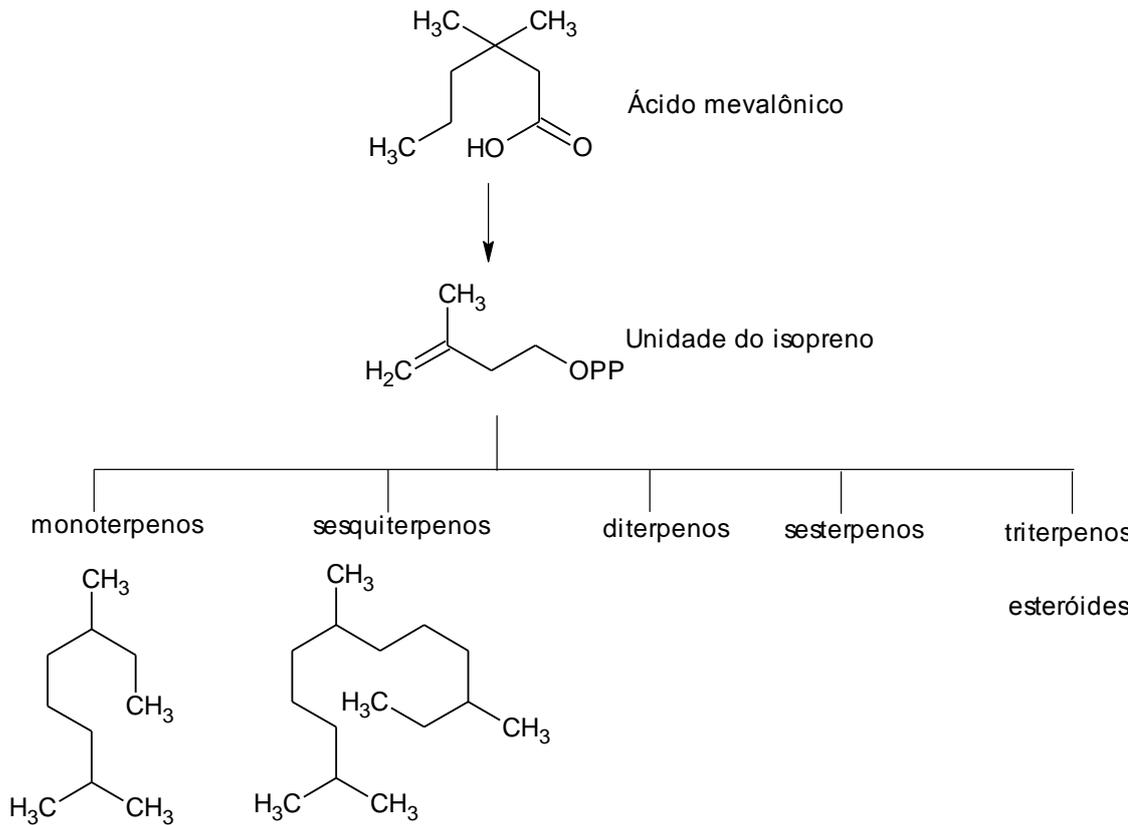


Figura 11 : Formação de compostos terpênicos

Seus constituintes variam desde hidrocarbonetos, alcoóis, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas, até compostos contendo enxofre. Na mistura, tais compostos apresentam-se em diferentes concentrações; normalmente, um deles é o composto majoritário, existindo outros em menores teores e alguns em baixíssimas quantidades (Simões & Spitzer, 2004). Na Figura 12 pode visualizar alguns exemplos de monoterpenos e sesquiterpenos encontrados em óleos essenciais.

Embora a constituição química dos óleos essenciais seja muito diferenciada, são observadas algumas propriedades físicas em comum. Possuem odores característicos, alto índice de refração e a maioria é opticamente ativa, sendo sua rotação específica muitas vezes uma propriedade útil do ponto de vista de

caracterização. São imiscíveis com água, mas são solúveis em éter, álcool e na maioria dos solventes orgânicos (Robbers, 1997).

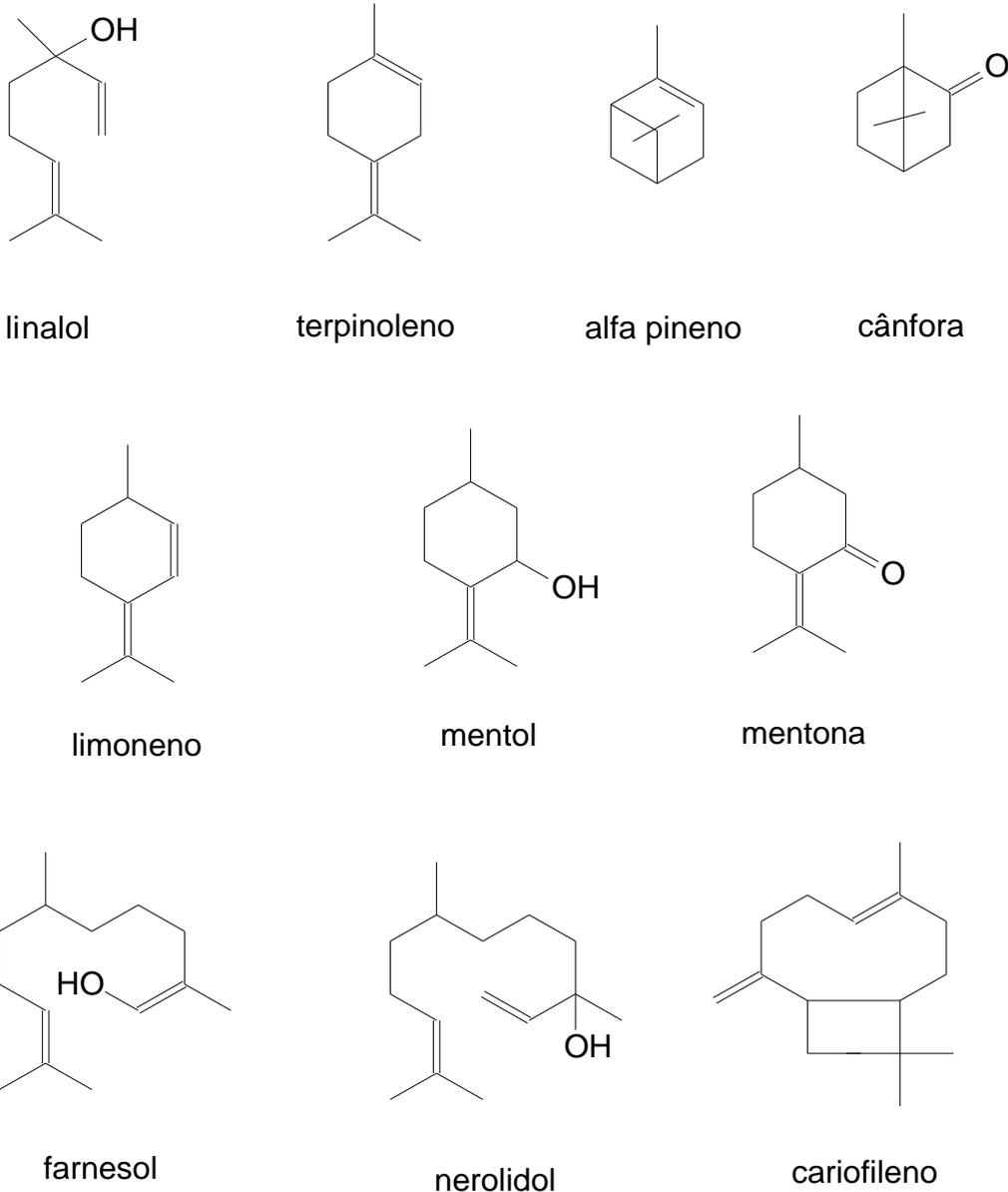


Figura 12: Exemplos de monoterpenos e sesquiterpenos.

As espécies aromáticas de Lauraceae estão compreendidas principalmente entre os gêneros *Aniba*, *Nectandra*, *Ocotea*, *Licaria* e *Dicypellium*. O elevado potencial da flora odorífera da Amazônia apresenta-se como a fonte renovável mais apropriada para a produção de essências aromáticas provenientes de Lauraceae (Zoghbi *et al.*, 2005).

O uso de plantas aromáticas é bastante difundido, em especial no tratamento de infecções microbianas, inflamações, dores e eczemas. Entre as propriedades farmacológicas encontradas em óleos voláteis estão a atividade antifúngica (Lima *et al.*, 2006), repelente (Cheng *et al.*, 2004), antiinflamatória (Juergens *et al.* 1998), anticolinesterásica (Miyazawa *et al.*, 1998) e analgésica (Silva *et al.*, 2003).

São inúmeras as atividades biológicas de óleos voláteis. Segundo Baratta e colaboradores (1998), o óleo de *Laurus nobilis* apresentou atividade antimicrobiana frente aos microorganismos: *Acinetobacter calcoaceticus*, *Beneckea natriegens*, *Citrobacter freundii*, *Erwinia carotovora* *Lactobacillus plantarum*, *Micrococcus luteus*, *Salmonella pullorum*, *Serratia marcescens* e *Staphylococcus aureus* . Já o óleo volátil de *Origanum vulgare* apresenta forte atividade antimicrobiana em 19 dos 25 microrganismos testados. O hidrolato e o óleo volátil de *Aniba duckei* apresentaram atividade larvicida frente a *Artemia franciscana* e *Aedes aegypti* (Souza *et al.*, 2007).

Óleos voláteis de espécies de Lauraceae tem grande importância na indústria farmacêutica e de perfumes, o óleo de pau-rosa, obtido a partir de *Aniba rosaeodora*, tem como constituinte majoritário o álcool terpênico linalol, com mistura dos isômeros D e L-linalol que varia de acordo com a região de coleta, 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).

### 3.2.2 Gêneros

#### 3.2.2.1 *Endlicheria Nees*

Gênero neotropical com centro de diversidade na América do Sul, *Endlicheria* ocorre também na Costa Rica, Guadalupe e Ilhas do Caribe. Possui cerca de 60 espécies , 40 das quais ocorrem no Brasil (Chanderbali, 2004) (figura 13).



Figura 13: Distribuição das espécies do Gênero *Endlicheria*. Fonte: <http://www.discoverlife.org>

Poucos relatos são descritos na literatura sobre espécies deste gênero. Rodriguez (2008) relata que os extratos etanólicos de *Endlicheria anomala* apresentaram atividade antioxidante através da inibição frente ao radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH).

Foram isolados da espécie *Endlicheria dysodantha* mez., quatro derivados bioativos de benzoato de benzil: 2-hidroxi benzoato de benzil , 2-hidróxi-6-metoxibenzoato de benzil, 2,6-dimetoxibenzoato de benzil e 2,5-dimetoxidimetóxico benzoato de benzila ( Ma *et al.*, 1991). No extrato benzênico de *Endlicheria sericea* (Lauraceae) foram isolados por processos cromatográficos quatro substâncias inéditas na época, além de sitosterol, sitostenona e manitol (Santos, 1976). As estruturas dessas substâncias podem ser verificadas na figura 14 a seguir:

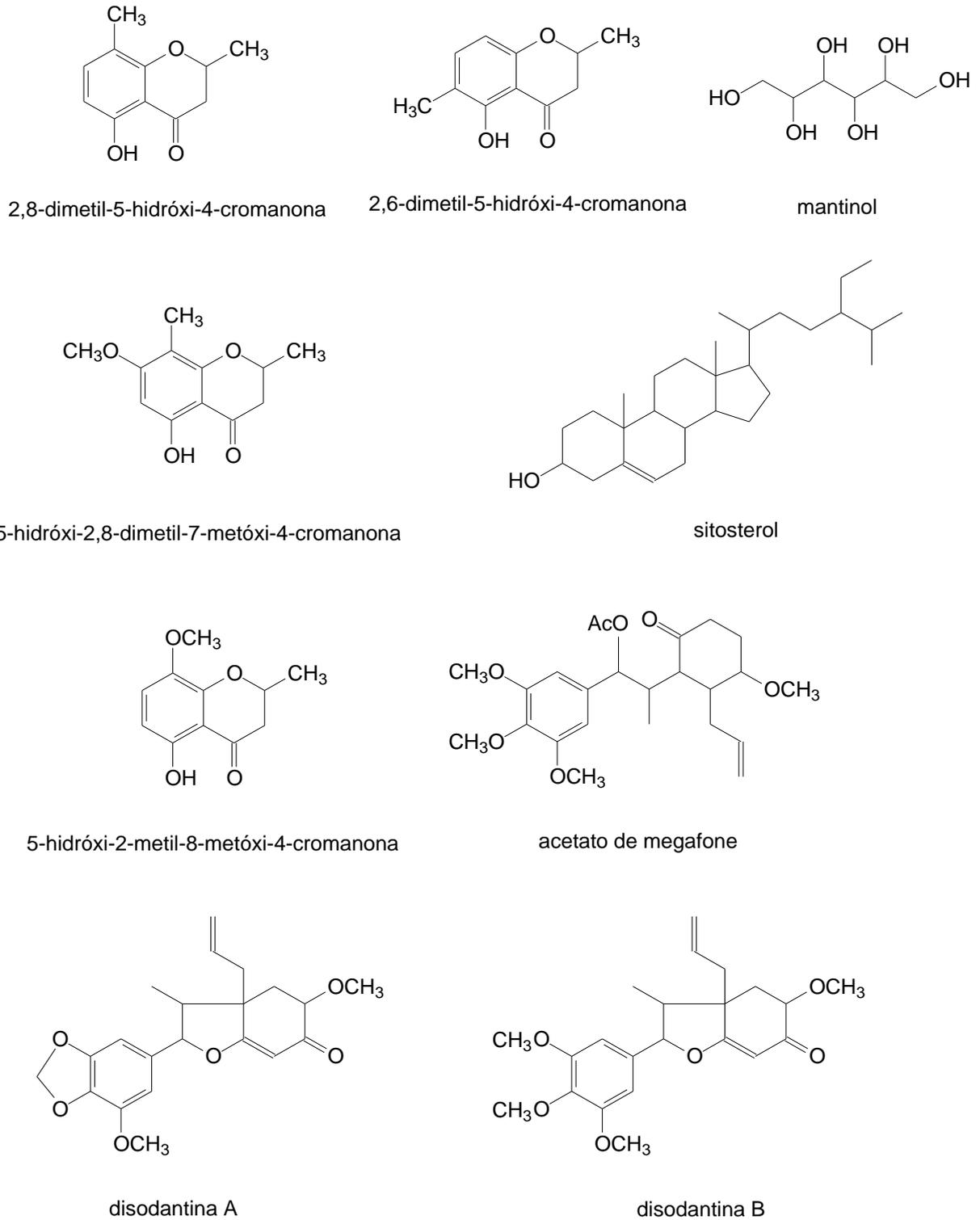


Figura 14: Substâncias isoladas de *Endlicheria*. Fonte: Santos, 1976 e MA *et al.*, 1991.

As espécies *E. sericeae* e *citriodora* não apresentaram nenhum estudo disponível na literatura em relação a atividades biológicas e estudos fitoquímicos.

### 3.2.2.2 *Rhodostemonodaphne* Roher & Kubitzki

O gênero *Rhodostemonodaphne* possui cerca de 41 espécies distribuídas na América do Sul (Madriñán, 2004) (Figura 15)



Figura 15: Distribuição das espécies do Gênero *Rhodostemonodaphne*. Fonte:

<http://www.discoverlife.org>

Poucos estudos químicos e farmacológicos são encontrados na literatura para este gênero. O óleo essencial das folhas de *Rhodostemonodaphne kunthiana* apresentou atividade citotóxica *in vitro* contra linhagem de células tumorais humanas, apresentando 91,9% de hidrocarbonetos sesquiterpenos sendo os componentes majoritários o germacreno D (64,4%) e o biciclogermacreno (17,6%) (Palazzo, 2009).

As espécies *R. crenaticupula* e *R. recurva* não apresentaram pouco ou nenhum estudo disponível na literatura em relação a atividades biológicas e estudos fitoquímicos

### 3.2.2.3 Gênero *Ocotea* Aublet

#### Aspectos gerais

O gênero *Ocotea* Aublet é o maior gênero da família Lauraceae na região neotropical e apresenta o maior número de espécies medicinais (Marques, 2001) sendo utilizado tanto componente dos extratos quanto dos óleos essenciais. Este gênero *Ocotea* tem despertado o interesse dos fitoquímicos brasileiros com sua ampla distribuição no território nacional, com espécies muito apreciadas no comércio madeireiro, como *Ocotea porosa*, conhecida popularmente como imbuíça e *Ocotea odorífera*, o sassafrás (Lorenzi, 2002). Na tabela 1 pode-se verificar as espécies mais comumente encontradas no Brasil, relacionando seus nomes populares e forma de uso na indústria madeireira (Marques, 2001).

Tabela 1: Espécies de *Ocotea* e seus usos populares

Nome científico	Nome popular	Forma de uso
<i>O. barcellensis</i>	Louro mamori, pau-de-queosene	Marcenaria e construções em geral
<i>O. catharinensis</i>	Canela preta	Construção civil para ripas e vigas e para móveis
<i>O. cymbarum</i>	Canela	Marcenaria e construções em geral
<i>O. diospyrifolia</i>	Canela	Postes e tábuas de assoalho
<i>O. divaricata</i>	Canela soqueira	Marcenaria e construções em geral
<i>O. elegans</i>	Canela ferro	Marcenaria e construções em geral
<i>O. guianensis</i>	Louro branco	Fabricação de papel
<i>O. organensis</i>	Canela goiaba	Obras de carpintaria
<i>O. porosa</i>	Imbuíça	Marcenaria e construções em geral
<i>Ocotea pretiosa</i>	Sassafrás	Não utilizada em obras devido as células secretoras de óleo essencial
<i>O. puberula</i>	Louro abacate, canela barbosa	Fabricação de papel e de caixotaria
<i>O. pulchella</i>	Canelinha, canela preta	Marcenaria e construções em geral
<i>O. spectabilis</i>	Canela amarela, louro-preto	Marcenaria e construções em geral

## Distribuição Geográfica

*Ocotea* Aubl. é constituído por cerca de 350 espécies distribuídas na América tropical e subtropical, desde o México até a Argentina, ocorrendo também em Madagascar, na África e nas Ilhas Canárias (Rhower, 1993). Estima-se que no Brasil ocorrem entre 12 a 16 espécies (Baitello, 2001) (figura 16).

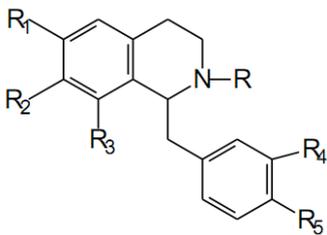
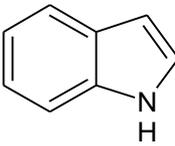
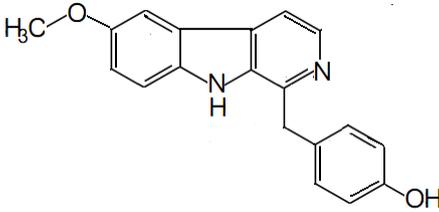
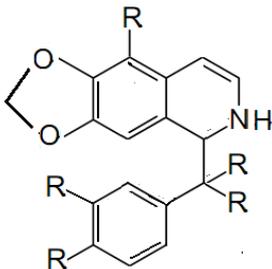
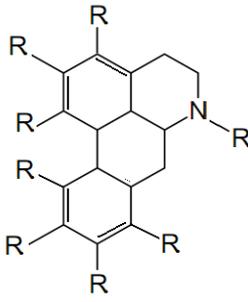


Figura 16: Distribuição das espécies do Gênero *Ocotea*. Fonte: <http://www.discoverlife.org>

## Química e atividade biológica

Estudos fitoquímicos tem revelado a presença de neolignanas, alcalóides, fenilpropanóides, flavonóides e sesquiterpenos (Chávez, Gottlieb e Yoshida, 1995). O gênero *Ocotea* destaca-se como um dos gêneros mais expressivos nos isolamentos de alcalóides das Lauráceas brasileiras principalmente com esqueletos com pronunciadas atividades biológicas (Zanin & Lordello, 2007). Os tipos de esqueletos alcaloídicos já encontrados nesse gênero, são apresentados na tabela 02.

Tabela 2: Alguns alcalóides do gênero *Ocotea*

Alcalóides	Estrutura	Espécie	Referência
Benzilisoquinolínico		<i>O. duckei</i>	Dias <i>et al</i> , 2003
Indólico		<i>O. minarum</i>	Garcez <i>et al</i> , 2005
Triptamínico		<i>O. santalodora</i>	Aguiar <i>et al</i> , 1980
Benzilisoquinolínico		<i>O. pulchella</i>	Bodega <i>et al</i> , 2003
Aporfínicos <i>sensu</i> <i>stricto</i>		<i>O. glaziovii</i> , <i>O. caesia</i> , <i>O. macropoda</i> , <i>O. minarum</i> .	Guinaudeau <i>et al.</i> , 1979; Vilegas <i>et al.</i> , 1989; Cava, 1971; Vecchietti <i>et al.</i> , 1979

Dentre os alcalóides isoquinolínicos, os aporfinóides representam um grupo grande e ainda em expansão, com mais de 500 alcalóides isolados de mais de 90 gêneros de plantas e/ou sintetizados (Jia *et al*, 2000). A maior parte dos alcalóides aporfinóides encontrados nesse gênero foram reunidos no artigo de revisão de Zanin & Lordello (2007). Vários desses alcalóides aporfinóides são comumente encontrados no gênero *Ocotea* apresentam potente atividade biológica.

Na família Lauraceae, o óleo essencial é armazenado em células secretoras que podem ser encontradas na folha, na casca e no lenho. Algumas espécies de *Ocotea*, como *O. elegans* demonstram tal afirmação, apresentando dificuldades na utilização da madeira para indústria de papel devido a presença de células secretoras de óleo e mucilagem em abundância (Marques, 2001).

O óleo essencial de *O. odorifera* apresenta como componente principal o safrol, uma substância comercializada no mundo inteiro e utilizada em vários ramos industriais, pelo qual milhares de indivíduos de canela-sassáfras, como é conhecido popularmente, foram sacrificados nas matas do sul do país até a década de 1990, levando a espécie a ser incluída na lista oficial de espécies ameaçadas de extinção (Portaria IBAMA nº6-N, de 15 de janeiro de 1992) e à conseqüente proibição de seu corte.

O trabalho realizado por Takaku, Haber e Setzer (2007) com os óleos essenciais das folhas de dez espécies de *Ocotea* (*O. floribunda*, *O. holdridgeana*, *O. meziana*, *O. sinuata*, *O. tonduzii*, *O. valeriana*, *O. veraguensis*, *O. whitei* e duas não descritas, denominadas “los llanos” e “small leaf”) de Monteverde, Costa Rica apresentou como constituintes principais em comum nas espécies  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno,  $\beta$ -cariofileno, e germacreno-D.

O óleo essencial de diferentes partes de *Ocotea ducke* apresentou significativo efeito cardiovascular, induzindo significativamente hipotensão seguido de bradicardia. O constituinte principal do óleo essencial das folhas foi o *trans*-cariofileno (60,5%) e do óleo essencial do caule foi o  $\beta$ -eudesmol (27%) (Barbosa-Filho, *et al*, 2008). A tabela 03 mostra outras atividades de algumas espécies de *Ocotea*.

Tabela 03: Atividades farmacológicas de algumas espécies de *Ocotea*

Atividade Farmacológica	Espécie	Referência
Fator de agregação plaquetária (PAF)	<i>Ocotea duckei</i>	Castro-Faria-Neto <i>et al.</i> , 1995
Atividade antimicrobiana de <i>Escherichia coli</i>	<i>Ocotea duckei</i>	Antunes <i>et al.</i> , 2006
Efeito depressivo do SNC	<i>Ocotea duckei</i>	Moraes <i>et al.</i> , 1998
Bloqueador de contração muscular	<i>Ocotea odorífera</i>	Ribeiro <i>et al.</i> , 2003
Efeito larvicida contra <i>Aedes aegypti</i>	<i>Ocotea vellosiana</i>	Silva <i>et al.</i> , 2008
Ação Repelente	<i>Ocotea gardneri</i>	Botelho <i>et al.</i> , 2009
Anti-inflamatória	<i>Ocotea quixos</i>	Ballabeni <i>et al.</i> , 2010
Anti protozoária	<i>Ocotea lancifolia</i>	Fournet <i>et al.</i> , 2007
Antioxidante	<i>Ocotea quixos</i>	Bruni <i>et al.</i> , 2004

Para as espécies deste estudo, *Ocotea minor* e *Ocotea ceanothifolia* não foram observados estudos químicos e biológicos disponíveis na literatura. Da espécie *Ocotea leucoxydon* foram isolados os alcalóides aporfínicos dicentrina e ocoteína (Zhou *et al.*, 2000).

### **.3 Atividades Química/Biológicas**

#### **3.3.1 Atividade antioxidante**

##### **3.3.1.1 Radicais Livres**

Desde o início da vida no planeta, a toxicidade do oxigênio atmosférico tem sido o principal desafio à sobrevivência dos organismos vivos. As oxidações biológicas geram espécie reativas de oxigênio (ERO) e radicais livres que podem provocar lesões celulares, muitas vezes irreparáveis (Gôuvea, 2004).

Os radicais livres são espécies químicas que apresentam como característica a presença de um único elétron não-pareado em uma órbita externa. A energia criada por essa configuração instável é liberada através de reações com moléculas adjacentes, como substâncias químicas inorgânicas ou orgânicas – proteínas, lipídeos, carboidratos, particularmente com moléculas essenciais das membranas e ácidos nucleicos, causando danos as células e patologias (Halliwell, 1996).

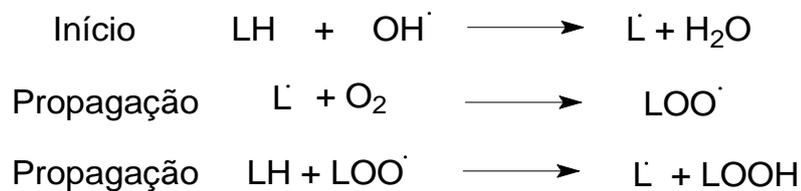
Os radicais livres com seus elétrons não pareados podem atacar e danificar praticamente qualquer molécula encontrada no organismo. Eles doam seu elétron não pareado ou capturam um elétron de outra molécula a fim de formar um par. De uma forma ou de outra, os radicais acabam ficando estáveis, e a molécula transforma-se em um radical. Isso inicia uma reação em cadeia que pode agir destrutivamente. As etapas que envolvem a reação dos radicais livres na lipoperoxidação podem ser visualizadas no esquema 2.

As etapas de reação de radicais de forma geral podem ser divididas em etapa de iniciação, propagação e terminação (Bruice, 2006).

**Etapa de iniciação:** na etapa de iniciação os radicais são gerados.

**Etapa de propagação:** um radical reage para produzir outro radical. O radical produzido na primeira etapa de propagação pode reagir para formar outro radical. As etapas são repetidas diversas vezes. Dessa maneira, a reação é chamada “reação radicalar em cadeia”. É a etapa que propaga a cadeia reacional.

**Etapa de terminação:** quando os radicais se combinam produzindo uma molécula na qual os dois elétrons estão emparelhados ou uma molécula estabiliza o radical devido principalmente suas propriedades estruturais.



Esquema 2: Mecanismo de início e propagação da lipoperoxidação ( LH: ácido graxo insaturado; L<sup>·</sup>: radical lipídico; LOO<sup>·</sup>: radical peroxila e LOOH: hidroperóxido lipídico).

A oxidação é parte fundamental da via aeróbica e do metabolismo e, assim, os radicais livres são produzidos naturalmente ou por alguma disfunção biológica. No organismo encontram-se envolvidos na produção de energia na forma de ATP através da cadeia respiratória, como acceptor final de elétrons, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes (Borek, 1997). Participa de várias reações metabólicas como a biossíntese de prostaglandinas e esteróides e na oxidação de muitas substâncias aromáticas, entre outras (Fleschin *et al.*,2000).

O ânion superóxido ( O<sub>2</sub><sup>-</sup> ), o radical hidroxila ( HO<sup>·</sup> ) e o óxido nítrico ( NO<sup>·</sup> ) são exemplos de radicais livres. Existem, entretanto, compostos igualmente reativos quanto os radicais livres que não possuem elétron não emparelhado na última

camada e, portanto, não podem ser classificados como radicais livres. Essas substâncias são classificadas de maneira mais ampla como espécies reativas de oxigênio (ERO) ou espécies reativas de nitrogênio (ERN) e incluem o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o cátion nitrosonium ( $NO^+$ ), o ânion nitroxila ( $NO^-$ ) e o peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) (Anderson, 1996).

Radicais livres (RL) e espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN) desempenham papel fundamental no metabolismo celular. No entanto, quando em excesso, estão envolvidos em vários processos deletérios ao organismo humano levando a alterações teciduais responsáveis por diversas patologias, como o câncer, a arterosclerose, a *Diabetes mellitus*, a artrite reumatóide, a distrofia muscular, a catarata, as desordens neurológicas e o processo de envelhecimento (Dröge, 2002; Nordberg & Arnér, 2001).

Recentemente a presença de radicais livres tem sido correlacionada com um grande número de doenças, mas não como agentes etiológicos e sim como fatores que participam diretamente dos mecanismos fisiopatológicos, os quais determinam a continuidade e as complicações de diversos estados patológicos (Rover Junior *et al.*, 2001).

Quando os antioxidantes produzidos pelo corpo são insuficientes para combater os radicais livres produzidos pelo organismo, este sofre ações degenerativas através do distúrbio conhecido como estresse oxidativo. Esta é uma condição celular ou fisiológica de elevada concentração de ERO/ERN que causa danos moleculares às estruturas celulares, com consequente alteração funcional e prejuízos das funções vitais, em diversos tecidos e órgãos, tais como músculos, fígados, tecido adiposo, vascular e cerebral (Dröge, 2002; Duarte *et al.*, 1993; Halliwell, 1994).

Hábitos de vida inapropriados tais como a ingestão de álcool, fumo e dieta inadequada; condições ambientais impróprias, tais como a exposição à radiação não ionizante UV; poluição; estresse emocional e envelhecimento são fatores que estão associados ao estresse oxidativo (Dröge, 2002, Elsayed, 2001). O equilíbrio entre a formação e a remoção das espécies reativas de radicais livres pode sofrer ação de agentes exógenos ou endógenos, induzindo um estado de estresse oxidativo. Este por sua vez, pode ser reestabelecido pelos sistemas antioxidantes. Na figura 17 pode-se verificar um esquema com as principais fontes de espécies reativas.

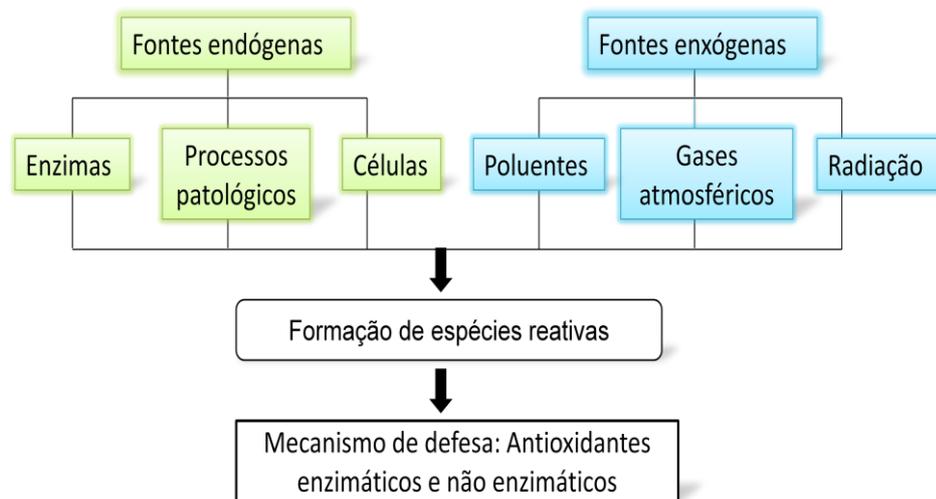


Figura 17: Principais fontes de espécies reativas e o mecanismo de defesa.  
Fonte: Adaptação de Guaratini *et al.* (2007).

### 3.3.1.2 Antioxidantes

Os antioxidantes são substâncias que quando presentes em baixas concentrações comparadas à do substrato oxidável, regeneram ou previnem significativamente a oxidação do mesmo (Halliwell *et al.*, 2000).

As plantas produzem uma grande variedade de substâncias antioxidantes contra os danos moleculares causados por radicais livres. Entre eles, os compostos fenólicos compreendem o principal grupo de compostos oxidantes de origem vegetal. Destes, os flavonóides constituem o grupo mais importante (Behling *et al.*, 2004).

De acordo com Halliwell (1996) os efeitos defensivos de antioxidantes que controlam a produção de radicais livres nos seres vivos podem ter origem exógena, originados principalmente de fontes enzimáticas; endógena, provenientes principalmente da dieta alimentar, destacando-se tocoferóis (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C), flavonóides, polifenóis, selênio e carotenóides (Bianchi & Antunes, 1999). Alguns exemplos de antioxidantes podem ser verificados na figura 18.

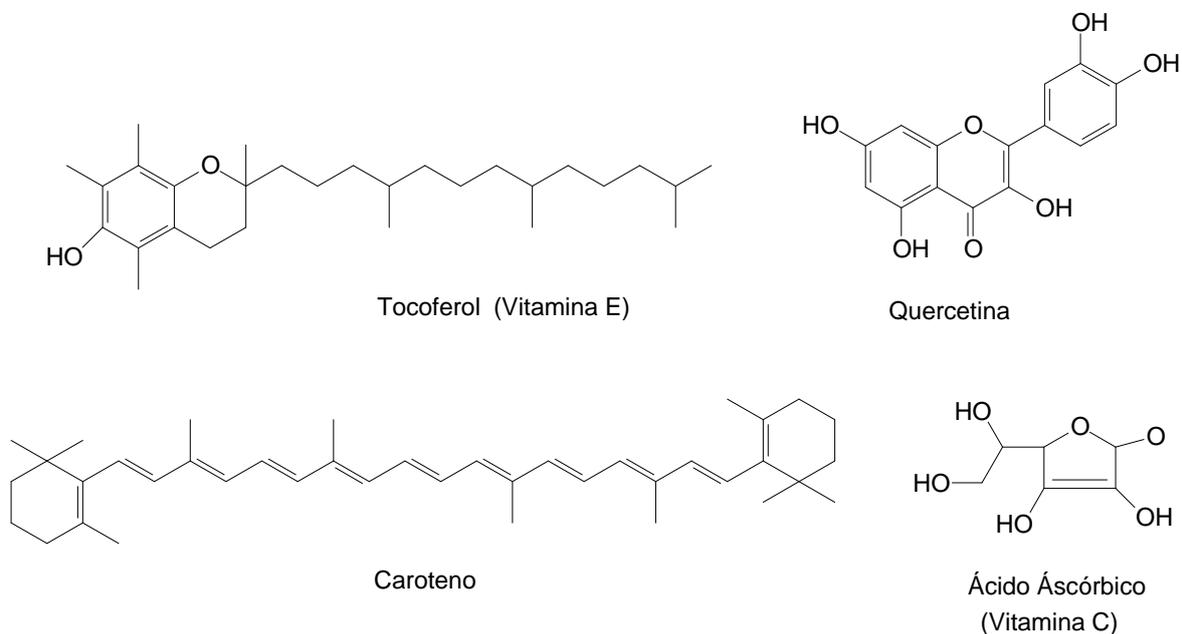
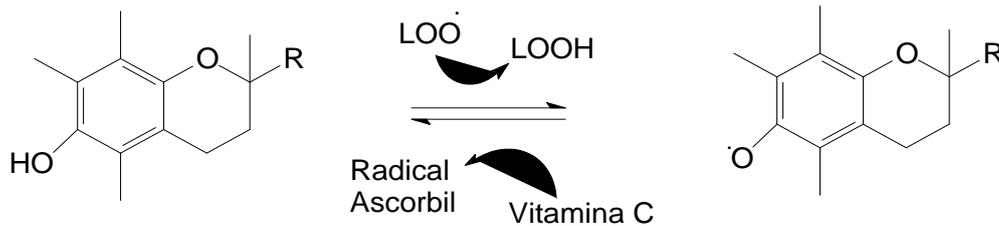


Figura 18: Estruturas químicas de alguns antioxidantes obtidos pela dieta.

A vitamina E é a designação dada a um grupo de compostos antioxidantes lipossolúveis, entre os quais o  $\alpha$ -tocoferol é a forma mais ativa. É encontrada em lipoproteínas e membranas, atuando no bloqueio da reação em cadeia da peroxidação lipídica, através do seqüestro de radical peroxila. A vitamina C tem muitas funções fisiológicas, como o alto poder antioxidante reciclando a vitamina E, no processo de peroxidação lipídica da membrana e lipoproteínas (Esquema 3) (Barreiros & David, 2006).



Esquema 3. Reação do  $\alpha$ -tocoferol (sendo R, a sua cadeia lateral) com radicais peróxila ( $\text{LOO}\cdot$ ), formando hidroperóxidos lipídicos (LOOH) e sua regeneração pela vitamina C, originando o radical ascorbila. Fonte: Adaptação de Guaratini *et al.*, 2007.

A partir dos anos 80, o interesse em encontrar antioxidantes naturais para o emprego em produtos alimentícios ou para uso farmacêutico, tem aumentado consideravelmente, com o intuito de substituir antioxidantes sintéticos que apresentam problemas de toxicidade e carcinogênese, bem como diversos outros males: aumento do peso do fígado e significativa proliferação do retículo endoplasmático (Zheng & Wang, 2001; Giordani *et al.*, 2008; Simão, 1985).

Em função dos possíveis problemas provocados pelo consumo de antioxidantes sintéticos, as pesquisas têm-se voltado no sentido de encontrar produtos naturais com atividade antioxidante, os quais permitirão substituir os sintéticos ou fazer associação entre eles (Souza *et al.*, 2007)

### 3.3.1.3 Avaliação da atividade antioxidante utilizando radical livre DPPH

A necessidade de tornar mais objetivas e menos dispendiosas as pesquisas por constituintes químicos de plantas levou ao desenvolvimento de numerosas técnicas de ensaios para monitoramento e seleção de extratos bio/farmacologicamente úteis (Viegas Jr, 2004). Dentre eles está o teste com DPPH que é um método bastante conveniente para a varredura da atividade antioxidante de pequenas moléculas uma vez que a reação pode ser observada visualmente

utilizando-se uma cromatoplaça ou um espectrômetro UV/VIS (Sánchez-Moreno, 1998).

A molécula de DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) é caracterizada como um radical livre estável em virtude da deslocalização do elétron desemparelhado por toda a molécula. Esta deslocalização confere a esta molécula uma coloração violeta, caracterizada por uma banda de absorção em etanol em cerca de 520nm.

Este ensaio se baseia na medida da capacidade antioxidante de uma determinada substância em seqüestrar o radical DPPH, reduzindo-o a hidrazina (figura 19) obtendo dessa forma a mudança simultânea na coloração de violeta a amarelo pálido com conseqüente desaparecimento da absorção, podendo a mesma ser monitorada pelo decréscimo da absorbância. A partir dos resultados obtidos determina-se a porcentagem de DPPH· remanescente no meio reacional (Alvez *et al.*, 2010; Sanchez-Moreno *et al.*, 1998).

A porcentagem de atividade antioxidante (%AA) corresponde a quantidade de DPPH consumida pelo antioxidante, sendo que a quantidade de oxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% é denominada concentração eficiente (CE<sub>50</sub>), também chamada de concentração inibitória (CI<sub>50</sub>). Quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será a sua CE<sub>50</sub>.

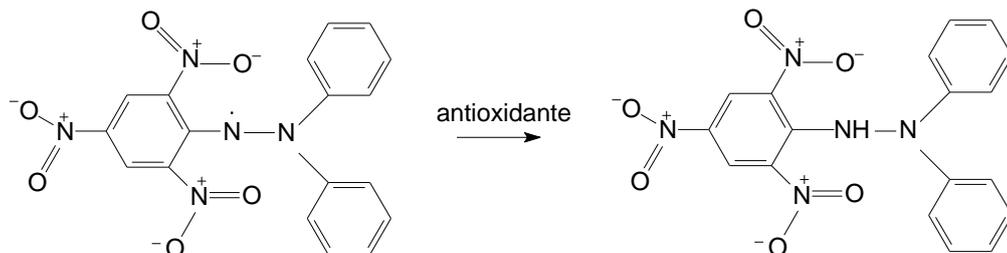


Figura 19 : Radical livre 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) e sua forma reduzida.

### 3.3.2 Citotoxicidade

#### 3.3.2.1 Letalidade em *Artemia salina* Leach

As plantas contêm inúmeros constituintes e seus extratos, quando testados podem apresentar efeitos sinérgicos entre os diferentes princípios ativos, devido a presença de compostos de classes ou estruturas diferentes contribuindo para a mesma atividade. No estudo da atividade biológica de extratos vegetais é importante a seleção de bioensaios para a detecção do efeito específico. Os sistemas devem ser simples, sensíveis e reprodutíveis (Cavalcanti *et al*, 2000).

A fim de estabelecer a toxicidade de novos produtos naturais, muitos ensaios podem ser utilizados, como os ensaios de letalidade de organismos simples que têm sido utilizados para um rápido e relativamente simples monitoramento da resposta biológica, onde existe apenas um parâmetro envolvido: morte ou vida (Meyer *et al*, 1982). Os resultados podem ser facilmente tratados estatisticamente.

Estes ensaios permitem a avaliação da toxicidade geral e, portanto são considerados essenciais como bioensaios preliminares no estudo de compostos com potencial atividade biológica.

Um dos animais que tem sido utilizado nestes ensaios é uma espécie de microcrustáceo marinho, *Artemia salina* Leach que é considerada um bioensaio preliminar utilizado para expressar a toxicidade de produtos naturais como extratos de plantas e produtos marinhos (Maciel *et al.*, 2002).

*Artemia salina* Leach é uma espécie da ordem Anostraca, amplamente conhecido como indicador de toxicidade em um bioensaio que utiliza CL<sub>50</sub> (concentração letal média) como parâmetro para avaliação da atividade biológica (Nunes *et al.*, 2008). Esta espécie é utilizada em testes de toxicidade devido à sua

capacidade de formar cistos dormentes, fornecendo desse modo material biológico que pode ser armazenado durante longos períodos de tempo sem perda de viabilidade e sem necessidade de se manterem culturas contínuas de organismo-teste. É uma espécie de fácil manipulação em laboratório e baixo custo econômico (Calow, 1993).

Adicionalmente, alguns trabalhos mostram uma boa correlação entre o ensaio de letalidade com larvas de *Artemia salina* e a citotoxicidade em linhagens de células humanas para esses produtos (McLaughlin *et al.*, 1995; Carbalho *et al.*, 2002).

A avaliação da bioatividade de extratos de plantas, medida pela toxicidade frente a *Artemia salina* pode fornecer informações valiosas ao trabalho de químicos de produtos naturais e farmacólogos, indicando fontes vegetais com importante atividade biológica. Nesse contexto, a utilização de bioensaios para o monitoramento da bioatividade de extratos de plantas vem crescendo consideravelmente nos laboratórios de pesquisa em nível mundial como método alternativo para o uso de animais de laboratório (Nunes *et al.*, 2008).

### 3.3.2.2 Citotoxicidade em células tumorais

O câncer representa uma enfermidade cada vez mais comum em todo o mundo e a busca por moléculas cada vez mais potentes e menos tóxicas é constante, tendo como grande fornecedor de moléculas a natureza. Segundo Brandão *et al.*, (2010) as plantas são consideradas fonte nobre de moléculas para o tratamento de várias formas de câncer e, mesmo que as moléculas isoladas do vegetal não possam ser usadas diretamente como medicamento, podem servir para síntese ou para gerar pró-farmacos para o desenvolvimento de novos agentes.

Atualmente, a definição científica de câncer refere-se ao termo neoplasia, especificamente aos tumores malignos, como sendo uma doença caracterizada pelo crescimento descontrolado de células transformadas. Existem quase 200 tipos que correspondem aos vários sistemas de células do corpo, os quais se diferenciam pela capacidade de invadir tecidos e órgãos, vizinhos ou distantes (Almeida *et al.*, 2005).

O câncer é uma síndrome que envolve em geral, as etapas de iniciação, promoção e progressão. Os diferentes tipos de câncer correspondem aos vários tipos de células do corpo (Figura 20) conforme o local de origem destas.

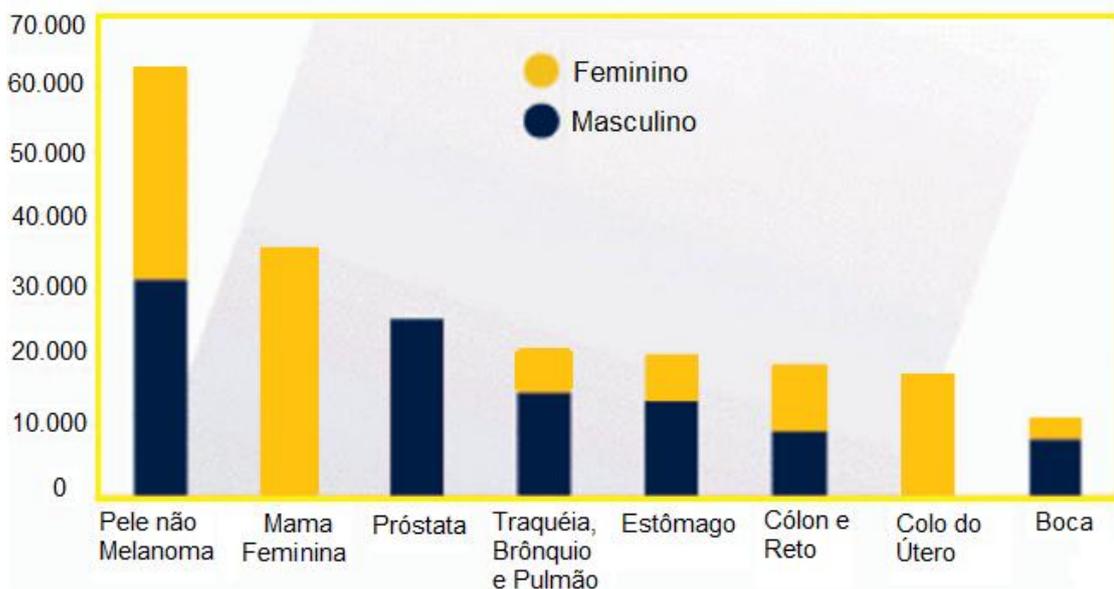


Figura 20: Tipos de câncer mais incidentes, estimados para 2002, na população brasileira. Fonte: <http://www.inca.org.br/cancer> (Almeida *et al.*, 2005)

O tratamento convencional desta patologia baseia-se em cirurgia, radioterapia, quimioterapia ou a combinação destes procedimentos. Os dois primeiros são recomendados para tumores localizados, enquanto que a quimioterapia é utilizada para as células cancerígenas espalhadas pelo corpo. Os fármacos antineoplásicos não poupam as células normais de sua ação devastadora, assim, diversos efeitos tóxicos podem acometer os pacientes que fazem uso destes medicamentos (Behling *et al.*, 2004).

A busca por medicamentos cancerígenos tem aumentando com vista a se encontrar tratamentos mais efetivos e seletivos, ou que visem a descoberta de novas estratégias que impeçam o avanço da doença. Diversos trabalhos têm visado o estudo da varredura de moléculas com atividade tumoral. Os alcalóides apresentam atividade pronunciada, com a classe de aporfínicos demonstrando atividade frente a diferentes tipos de linhagens de células tumorais (Pereira *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2007).

Um número significativo de agentes quimioterápicos obtidos a partir de plantas está ainda em experimento clínico para o tratamento de câncer, mas verifica-se a descoberta de fármacos derivados de plantas que já estão sendo utilizados clinicamente para essa patologia. As estruturas químicas de algumas substâncias com atividade cancerígenas derivadas de fontes vegetais estão representadas na Figura 21. Entre os mais conhecidos estão os chamados alcalóides da vinca, vinblastina e vincristina, isolados de *Catharantus roseus*; os taxanos como o paclitaxel (Taxol®), inicialmente isolado das cascas de *Taxus brevifoliae* e a classe de agentes clinicamente ativos derivados da camptotecina, isolada de *Camptotheca acuminata Decne* (Cragg & Newman, 2009) .

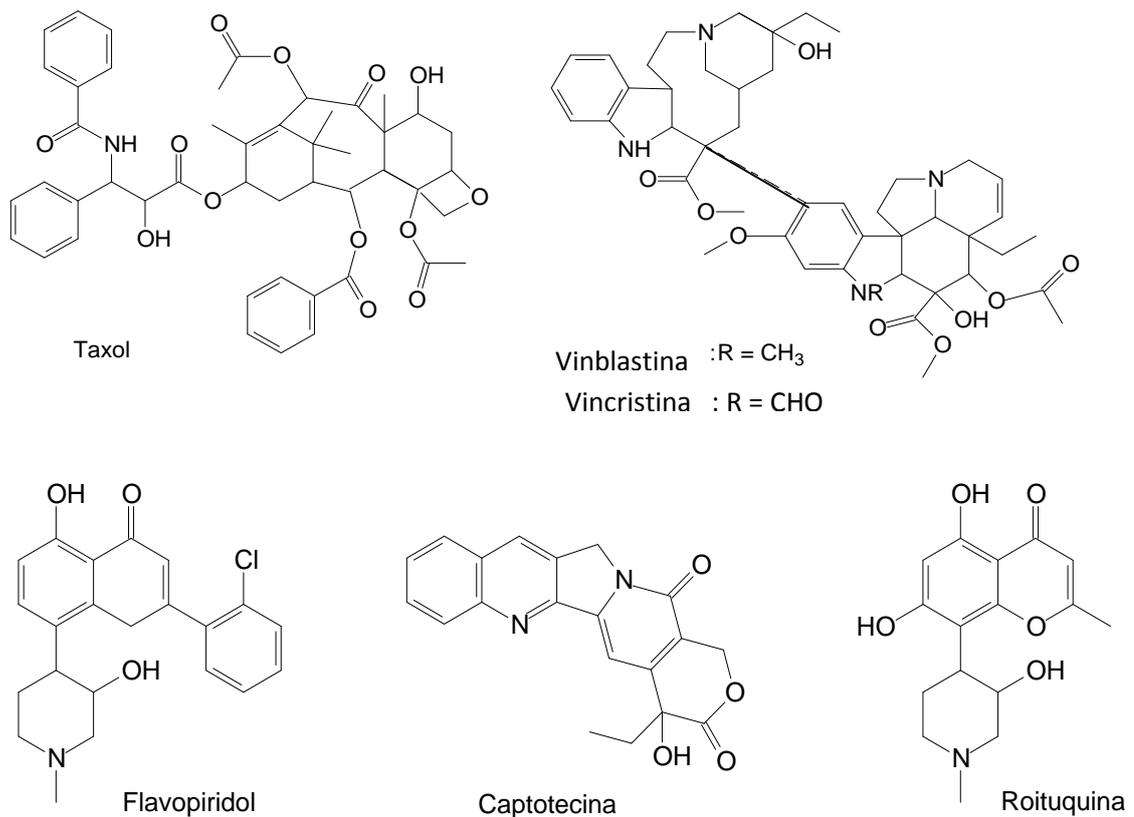


Figura 21: estruturas químicas de algumas substâncias com atividades cancerígenas derivadas de fontes vegetais. Fonte: Adaptação de Cragg & Newman (2009).

Verifica-se uma possível correlação existente entre a atividade antioxidante de substâncias polares e a capacidade de inibir ou retardar o aparecimento de células cancerígenas, já que há indícios que espécies reativas potencializam o estado desta patologia (Barreiros & David, 2006).

Considerando que menos de 10% das espécies de plantas tiveram algum tipo de estudo fitoquímico ou de atividades biológicas, acredita-se que muitos medicamentos derivados de plantas ainda estejam por ser descobertos, incluindo os anticancerígenos (Brandão *et al.*, 2010).

### 3.3.3 Ensaio de inibição da enzima acetilcolinesterase.

A população mundial está cada vez mais idosa e doenças relacionadas à idade prevalecem sem cura ou tratamento eficaz, tornando-se problemas de Saúde Pública Mundial. Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2001), estima-se que 40 milhões de pessoas no mundo apresenta algum tipo de demência, dentre elas, 25 milhões apresentam sintomas característicos da Doença de Alzheimer (DA) (Andrade, 1988; Viegas Junior *et al.*, 2005;).

Com o crescimento da expectativa de vida, o risco é real para todos os que ultrapassam 60 anos de idade já que a DA é uma patologia neurodegenerativa progressiva que afeta principalmente a população idosa, sendo responsável por 50-60% dos casos de demências em pessoas com mais de 65 anos de idade (Francis *et al*, 1999).

Os principais sintomas envolvem deficiência orgânica cognitiva, principalmente comprometimento da memória, da coordenação motora e do raciocínio, além de perda da capacidade cognitiva e demência.

Em nível celular, a DA está associada à redução das taxas de acetilcolina (ACh) no processo sináptico, diminuindo a neurotransmissão colinérgica cortical, além de outros neurotransmissores como noradrenalina, dopamina, serotonina e glutamato (Tabarrini *et al*, 2001; Perry *et al*, 2003).

A acetilcolina é um neurotransmissor encontrado no cérebro e nas junções neuromusculares, compondo parte do sistema nervoso parassimpático. Seus efeitos incluem a contração dos músculos lisos, dilatação dos vasos sanguíneos e regulação da taxa de batimentos cardíacos; no cérebro está associada ao controle motor, memória e cognição. Sua atividade e permanência na fenda sináptica são

regulados por hidrólise catalisada pela acetilcolinesterase (AChE), que regenera a colina, seu precursor.

Os avanços obtidos na compreensão da evolução da doença têm demonstrado que o uso de inibidores de AChE deve ser a forma mais eficiente de controle da evolução da doença. As causas da DA não são determinadas, assim, os sintomas podem ser apenas amenizados (Quik e Jeyarasasingam *et al.*, 1999; Viegas Junior *et al.*, 2004).

O medicamento considerado mais efetivo no tratamento de DA é a galantamina, um alcalóide inibidor da enzima acetilcolinesterase, composto isolado de plantas da família Amaryllidaceae. O alcalóide foi inicialmente, isolado de *Galanthus woronowii*, mas atualmente é obtido a partir de *Narcissus sp* e *Leucojum aestivum*, assim como sinteticamente. Esta substância apresenta menos limitações que outras já utilizadas devido os efeitos terapêuticos que permanecem mesmo após o término do tratamento (Ingkanan *et al.*, 2000; López *et al.*, 2002).

Estudos realizados visando a obtenção de novos compostos capazes de amenizar o déficit colinérgico associado à disfunção cognitiva do mal de Alzheimer estão baseadas na inibição da enzima acetilcolinesterase, como é o caso do ensaio colorimétrico de Rhee (Rhee *et al.*, 2001). Para esse teste utiliza-se 5,5'-ditiobis (ácido-2 nitrobenzóico) (reagente de Ellmann) para visualização da atividade enzimática (Figura 22).

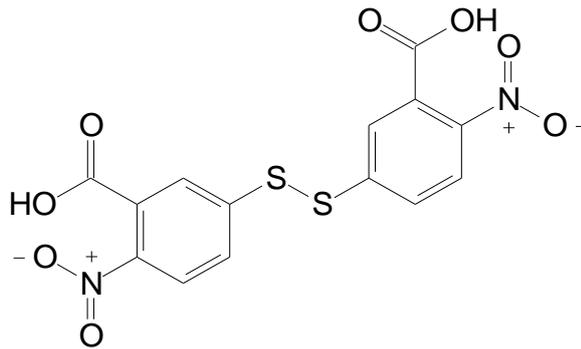


Figura 22: Estrutura química de 5,5'-ditiobis (ácido-2 nitrobenzóico)

O inconveniente da utilização do reagente de Ellman é o limite de detecção visual, pois, formam halos de inibição brancos sobre a placa corada amarela.

Na revisão realizada por Viegas Junior (2004) pode-se verificar que nos estudos de produtos naturais na busca por novos fármacos para o controle da DA os alcalóides destacam-se devida a atividade observada em baixas concentrações. Algumas estruturas de alcalóides podem ser encontradas nessa revisão e em outros trabalhos relacionados podem ser verificados na figura 23:

Ensaio com um grande número de plantas estão sendo utilizados para detectar a atividade de inibição da AChE. Um estudo bioguiado mais eficiente pode ser realizado com a associação dos ensaios, anticolinesterase e antioxidante conforme Giordani (2008) já que o dano causado por espécies reativas de oxigênio é considerado um fator contribuinte da doença de Alzheimer.

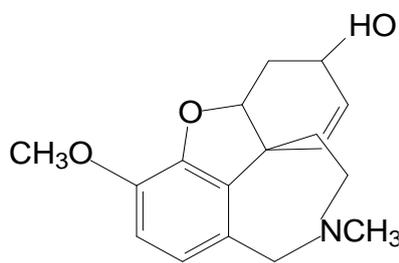
No levantamento realizado por Barbosa Filho *et al* (2006) foram revisadas 309 plantas e 260 substâncias isoladas. As espécies em particular da família

Amaryllidaceae, Apiaceae, Asteraceae, Fabaceae e Fumariaceae foram as mais estudadas. Mais uma vez, os alcalóides receberam destaque por serem os compostos isolados que apresentaram maior atividade inibidora de

acetilcolinesterase. Berkov *et al.* (2008) realizou um trabalho com 33 alcalóides em que constatou a capacidade de inibir a ação da enzima AChE de alcalóides como coridaline, epigalantamina, sanguinina, desidrocoridalina, entre outros.

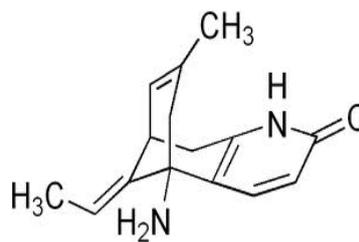
Dessa forma, as famílias botânicas que contém alcalóides podem ser fontes promissoras do tratamento de DA.

Figura 23: Alcalóides com propriedades anticolinesterase.



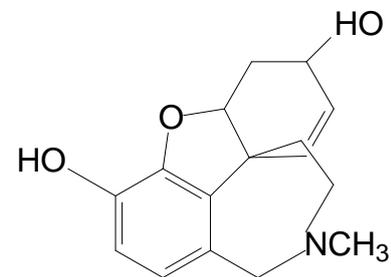
Galantamina

Fonte: *Galanthus woronowii*  
Referência: López *et al.*, 2002



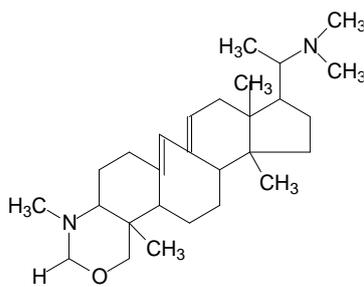
Huperzina A

Fonte: *Huperzia serrata*  
Referência: Chang, 2000;  
Rajendran, *et al.*, 2001



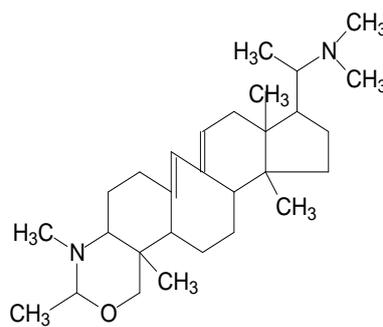
Sanguinina

Fonte: *Eucharis grandiflora*  
Referência: López *et al.*, 2002



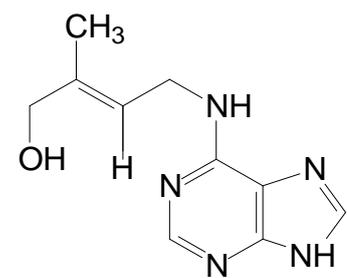
homomoenjodaramina

Fonte: *Bruxus hyrcana*  
Referência: Ur-Rahman *et al.*,  
2001



moenjodaramina

Fonte: *Bruxus hyrcana*  
Referência: Ur-Rahman *et al.*,  
2001



zeatina

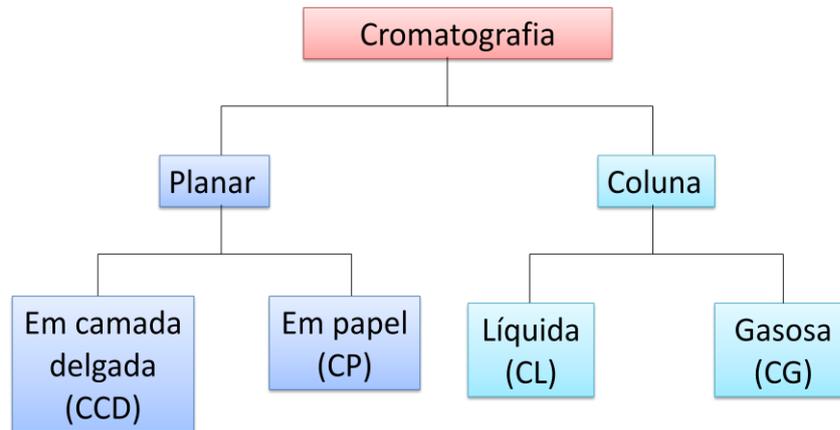
Fonte: *Fiatoua villosa*  
Referência: Heo *et al.*, 2002

### 3.4 Métodos cromatográficos

A extração dos constituintes de plantas é um exercício de acertos e erros, com uso de diferentes solventes sob as mais variadas condições como tempo e temperatura de extração. O sucesso ou fracasso nos processos de extração pode ser observado posteriormente nos processos de purificação. Uma vez extraído da planta, o composto bioativo deve ser separado do extrato bruto. O procedimento pode envolver desde uma simples cristalização do composto até separações sucessivas com partições de polaridades diferentes e extensivas técnicas cromatográficas. Neste contexto, a cromatografia tem lugar de merecido destaque no que concerne a separação, identificação e quantificação de compostos (Bresolin & Cechinel-Filho, 2003).

A cromatografia é um método físico-químico de separação. Ela está fundamentada na migração diferencial dos componentes de uma mistura, que ocorre devido a diferentes interações, entre duas fases imiscíveis, uma fase fixa de grande área superficial, denominada fase estacionária, e outra, um fluido que percola através dela, chamada de fase móvel. A grande variedade de combinações entre fases móveis e estacionárias a torna uma técnica extremamente versátil e de grande aplicação (Barnes, 2002).

Pode ser desenvolvida de forma planar ou no interior de colunas. O fenômeno da separação cromatográfica é de cunho interfacial, sendo que as superfícies imiscíveis, fases móvel e estacionária, podem ser gás-sólido, gás-líquido, líquido-líquido e líquido-sólido, respectivamente (Degani *et al.*, 1998). Dentre os vários tipos de cromatografia há a Cromatografia em Camada Delgada (CCD), Cromatografia Líquida clássica e de Alta Eficiência (CLAE) e Cromatografia Gasosa (CG) (Esquema 4).



Esquema 4: Representação esquemática dos diferentes tipos de cromatografia. Fonte: Adaptação de Degani *et al.*, 1998.

### 3.4.1 Cromatografia em Camada Delgada

A Cromatografia em Camada Delgada (CCD) é uma técnica simples e de execução relativamente rápida utilizada em química de produtos naturais como uma ferramenta eficaz de análise qualitativa para avaliação da pureza de uma amostra simples, avaliação do número de componentes de uma mistura, identificação de uma ou mais substâncias presentes em uma mistura por comparação com padrões, monitoramento do progresso de uma reação química, escolha de um solvente apropriado para uma separação cromatográfica em coluna e monitoramento de uma separação cromatográfica em coluna (Silva *et al.*, 2009).

É uma técnica de adsorção líquido-sólido onde a separação pela diferença de afinidade dos componentes de uma mistura pela fase estacionária. O parâmetro mais importante a ser considerado em CCD é o *fator de retenção* ( $R_f$ ), o qual é a razão entre a distância percorrida pela substância em questão e a distância percorrida pela fase móvel. Os valores ideais para  $R_f$  estão entre 0,4 e 0,6 (Degani *et al.*, 1998).

### 3.4.2 Cromatografia gasosa

A cromatografia a Gás (CG) é um método usado para separar os componentes de uma solução e determinar sua quantidade relativa. É uma técnica útil para compostos orgânicos que não entrem em decomposição sob altas temperaturas (aproximadamente 310°C) possibilitando a análise de compostos obtidos de plantas em pequenas quantidades (microgramas) (Lanças,1993).

A cromatografia gasosa é uma das técnicas analíticas mais utilizadas. Além de possuir um alto poder de resolução, é muito atrativa devido à possibilidade de detecção em escala de nano a picogramas ( $10^{-9}$ - $10^{-12}$  g). A grande limitação deste método é a necessidade de que a amostra seja volátil ou estável termicamente, embora amostras não voláteis ou instáveis possam ser derivadas quimicamente (Degani *et al.*, 1998).

Os gases utilizados como fase móvel devem ter alta pureza e ser inertes em relação à fase estacionária. Hidrogênio, nitrogênio e hélio são os mais usados. Os detectores de maior aplicação são o detector por ionização em chama e o detector de condutividade térmica. Os dados podem ser obtidos através de um registrador potenciométrico, um integrador ou um microcomputador, sendo as amostras identificadas por seus tempos de retenção (Degani *et al.*, 1998).

A cromatografia a gás pode ser combinada com espectroscopia de massas (CG-EM). Esta técnica vem sendo utilizada como método sensível na identificação de alcalóides e detecção de várias classes de terpenos (Cordell,1995; Bresolin & Cechinel-Filho, 2003).

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Coleta

As espécies de Lauraceae foram coletadas na Reserva Florestal Adolpho Ducke, em Manaus, no Amazonas. Sendo três espécies do gênero *Ocotea*, duas do gênero *Rhodostemonodaphne* e duas do gênero *Endlicheria*. As exsicatas encontram-se depositadas no herbário do Instituto Nacional de Pesquisas do Amazonas (INPA) no projeto Flora da Reserva Ducke.

Reg.	Nome científico	Órgão(s) da planta
0215	<i>Endlicheria citriodora</i>	Folhas e galhos
0273	<i>Endlicheria sericea</i>	Folhas, galhos grossos, galhos finos e cascas
0123	<i>Ocotea ceanothifolia</i>	Folhas, galhos grossos, galhos finos e cascas
0066	<i>Ocotea leucoxylon</i>	Folhas, galhos finos e grossos
0172	<i>Ocotea minor</i>	Folhas, galhos grossos, galhos finos e cascas
0191	<i>Rhodostemonodaphne crenaticupula</i>	Folhas e galhos
0162	<i>Rhodostemonodaphne recurva</i>	Folhas, galhos grossos, galhos finos e cascas

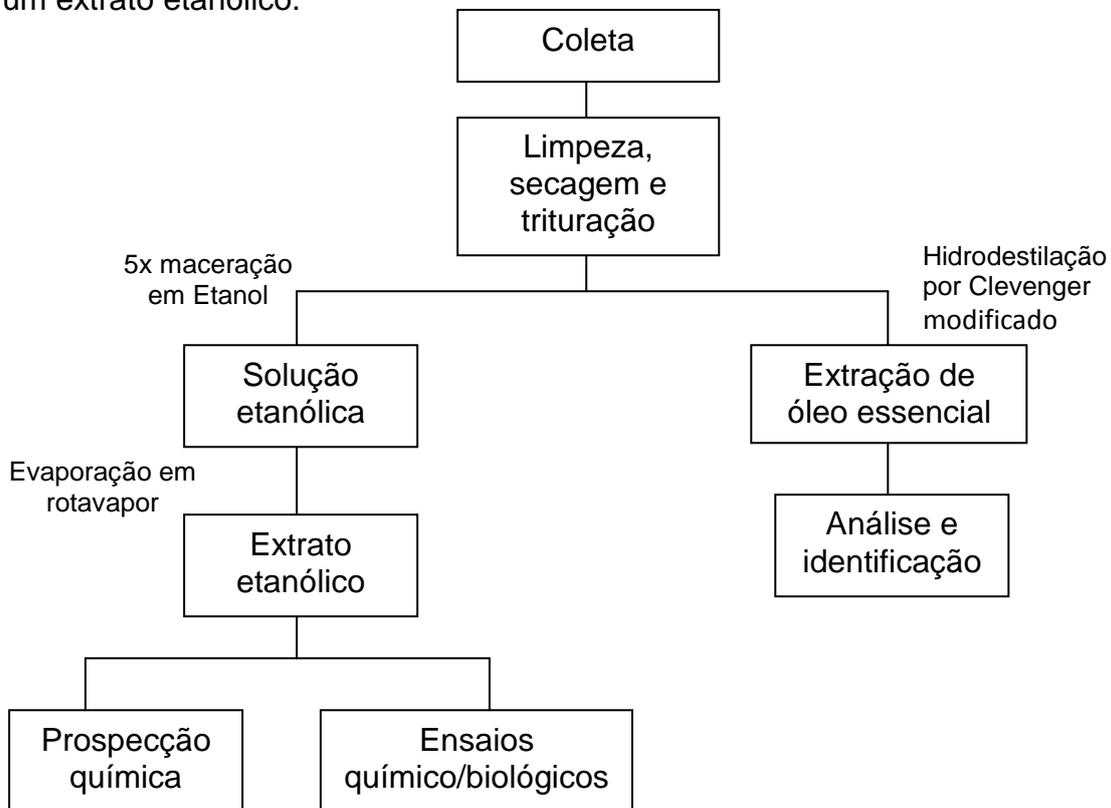
Quadro 1 - Dados de coleta das espécies vegetais

Após a coleta, as diferentes partes da árvore (folhas, galhos e cascas do tronco) foram separadas, limpas, analisadas macroscopicamente quanto à presença de fungos, galhas e ataques de insetos. O material foi seco à temperatura ambiente, triturado separadamente em moinho de quatro facas e dividido para obtenção de extratos etanólicos e de óleos essenciais. O esquema 05 mostra os métodos empregados para obtenção dos extratos etanólicos e extração dos óleos essenciais.

## 4.2 Obtenção dos extratos

Para as sete espécies investigadas, o procedimento de obtenção dos extratos foi padronizado. Cada parte (galhos, folhas e cascas) foi submetida à maceração a frio, durante 72 horas em etanol previamente destilado.

Após a maceração e filtração, o solvente foi eliminado em evaporador rotatório, resultando num extrato bruto. O material vegetal foi recolocado em maceração, repetindo-se o processo descrito anteriormente durante quatro vezes, obtendo assim um extrato etanólico.



Esquema 05: Fluxograma do procedimento de extração utilizado para obtenção dos extratos e dos óleos essenciais.

### **4.3 Prospecção**

As prospecções foram realizadas segundo Matos (1980).

#### **4.3.1 Fenóis**

Em cada tubo de ensaio foi adicionada uma amostra dissolvida em etanol. Adicionou-se em seguida três gotas de solução alcoólica de  $\text{FeCl}_3$  10%. Agitou-se e observou-se variação de coloração variando entre azul e vermelho, que é indicativo de fenóis. O resultado foi comparado com um teste em branco, usando-se água e  $\text{FeCl}_3$ .

#### **4.3.2 Flavonóides**

Em cada tubo de ensaio foi adicionada uma amostra dissolvida em etanol. Adicionou-se então alguns miligramas de magnésio granulado e 0,5 mL de HCl concentrado. O término da reação foi indicado pelo fim da efervescência. O aparecimento ou a intensificação da cor vermelha foi indicativo da presença de flavonóis, flavanonas, flavanonóis e/ou xantonas, livres ou seus heterosídeos.

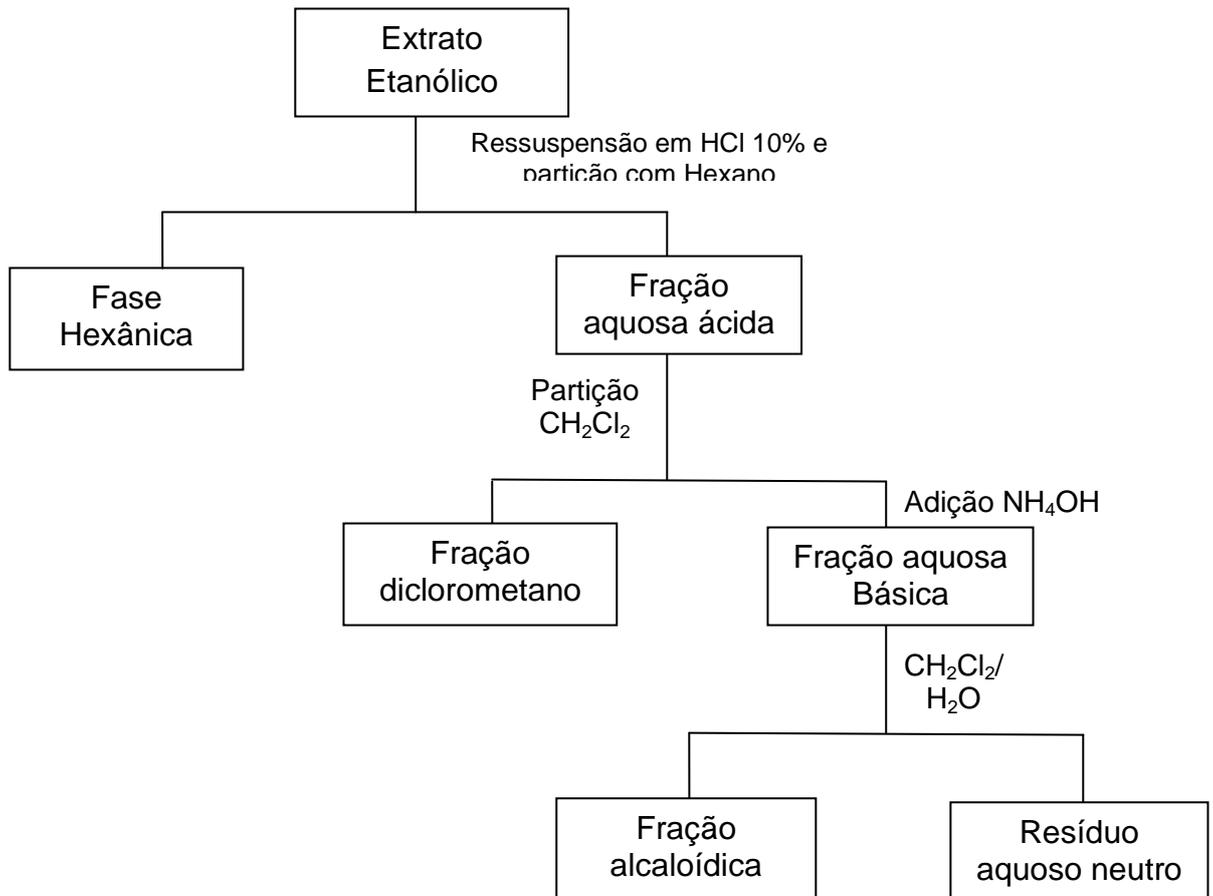
#### **4.3.3 Alcalóides**

Foi verificada a presença de alcalóides através dos reativos de reconhecimento: Dragendorf, Mayer, Wagner e Hager. A leve turbidez ou precipitado respectivamente roxa a laranja, branca a creme, marron e marrom dos extratos após a adição dos reativos indicaram a presença de alcalóides.

## 4.4 Frações alcalóidicas

### 4.4.1 Obtenção das frações alcalóidicas

O extrato bruto foi submetido a fracionamento ácido-básico para alcalóides, modificado, conforme demonstrado no esquema 06. O extrato seco foi ressuscitado com solução de ácido clorídrico 10%. As substâncias apolares foram extraídas com hexano. Para retirada de substâncias de média e baixa polaridade foi adicionado diclorometano (4 vezes). Após a retirada do diclorometano a fração aquosa foi alcalinizada com hidróxido de amônio até pH 9-10 e extraída com o mesmo volume de diclorometano (4 vezes), gerando uma fração orgânica enriquecida em alcalóides. A fração foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada, evaporada à pressão reduzida e pesada.



Esquema 06: Obtenção da fração alcaloídica.

#### 4.4.2 Análise da fração alcaloídica por CCD

Após as partições ácido-base, as frações alcaloídicas foram solubilizadas em diclorometano e aplicadas, com auxílio de capilar, em cromatofolhas de alumínio (AL TLC Silicagel 60 F<sub>254</sub>, Merck, 5 x 4 cm). O sistema foi mantido em câmara de saturação com os eluentes: acetato de etila, metanol e água (7:2:1). A visualização das manchas foi efetuada por exposição à luz UV a 264 e 365 nm e revelação com vanilina sulfúrica, com posterior aquecimento em estufa e em capela até o aparecimento de cores na placa e revelador Dragendorf.

#### 4.4.3 Análise da fração alcaloídica por Espectrometria de massas

O estudo do perfil alcaloídico foi realizado por espectrometria de massa (IES-EM/EM). As amostras foram solubilizadas para concentração de 5ppm, usando metanol HPLC como solvente, injetadas por inserção direta no espectrômetro de massas com inserção direta com fluxo de 30  $\mu\text{L min}^{-1}$ . Os espectros ESI-MS foram adquiridos em modo positivo em um aparelho LCQ-*Fleet* da Thermo, Detector do tipo Ion-Trap, operando no modo ESI de ionização. As amostras foram infundidas por uma bomba de injeção automática com um fluxo contínuo de 10 $\mu\text{L.min}^{-1}$ . Os espectros foram adquiridos na faixa de  $m/z$  100 a 800. Foram avaliados por injeção direta das amostras em espectrômetro de massa com interface electrospray e analisador de íon-trap (FIA-ESI-IT-MS)[5], obtidos em modo positivo  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

## **4.5 Óleo essencial**

### **4.5.1 Extração do óleo**

O óleo essencial foi extraído por hidrodestilação, utilizando-se aparelho de Clevenger modificado, por 4 horas. A proporção utilizada foi de 1:10 de amostra e água, respectivamente.

Após a obtenção do óleo, o mesmo foi seco em sulfato de sódio, seu rendimento calculado e em seguida, armazenado em geladeira em um frasco âmbar para minimizar os efeitos da oxidação até as análises.

O cálculo dos rendimentos foi realizado através da relação da massa do óleo obtida com a massa de material vegetal seco utilizado na extração.

### **4.5.2 Análise dos óleos essenciais**

Os óleos essenciais foram diluídos em hexano e as soluções obtidas foram submetidas à análise por cromatografia em fase gasosa com detector de ionização de chama (CG-DIC) para a análise quantitativa e determinação dos índices de retenção, e por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrômetro de massas (CG-EM), para a obtenção dos espectros de massas. Foram realizadas três repetições para cada óleo essencial analisado.

#### **4.5.2.1 Análise em CG-DIC**

Os óleos foram diretamente analisados em cromatógrafo em fase gasosa modelo CG 2010 da Shimadzu<sup>®</sup> com detector por ionização de chama (DIC). As

análises foram realizadas com coluna CP-Sil 5 CB (100% dimetilpolisiloxano) da Varian<sup>®</sup>, com medidas de 15 m x 0,25 mm x 0,25 µm, sendo utilizado como gás de arraste hélio (He) em fluxo de 2,0 mL/min. A injeção em modo split 1:10 foi realizada com injetor a 250°C. A temperatura do detector foi de 290°C e o forno foi programado de 60°C até 240°C (2°C/min), 240°C até 290°C (20°C/min) isoterma em 290°C por 5 min. Foram injetados padrões de hidrocarbonetos lineares para a determinação dos índices de retenção.

#### 4.5.2.2 Análise em CG-EM

Após a análise por CG-DIC, os óleos foram analisados em cromatógrafo em fase gasosa modelo QP-2010 da Shimadzu<sup>®</sup> com detector por espectrometria de massas (CG-EM). As análises foram realizadas com coluna VF-1MS da Varian<sup>®</sup>, com medidas de 15 m x 0,25 mm x 0,25 µm. As condições da análise foram às mesmas utilizadas por CG-DIC. Para a detecção foi aplicada a técnica de impacto eletrônico a 70eV.

#### 4.5.2.2 Análise por RMN

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio (RMN <sup>1</sup>H) e carbono (RMN <sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H desacoplado), DEPT, HSQC e HMBC foram registrados em espectrômetro da Varian modelo INOVA de 11,7 T, do Centro de Biotecnologia da Amazônia (CBA), operando a 500 MHz para <sup>1</sup>H e 125 MHz para <sup>13</sup>C. As amostras foram solubilizadas em 600µL de solvente deuterado: clorofórmio (CDCl<sub>3</sub>). Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) em relação ao padrão interno TMS (δ= 0,00) e as constantes de acoplamento (*J*) em Hertz (Hz). As multiplicidades dos sinais foram indicadas segundo a convenção: s (singleto), d (duplete), dd (duplo duplete), t (tripleto) e m (multiplete).

#### **4.5.2.3 Identificação dos constituintes dos óleos essenciais**

A determinação da composição química dos óleos essenciais foi realizada através dos dados de tempo de retenção, obtidos por CG-DIC, e dos espectros de massas, obtidos por CG-EM. Os índices de retenção foram calculados utilizando a equação de Van der Dool-Kratz, relacionando os tempos de retenção dos compostos presentes nos óleos essenciais com os tempos de retenção de uma série homóloga de hidrocarbonetos lineares (C<sub>9</sub>-C<sub>30</sub>) que foi co-injetada com a amostra. Os índices de retenção e os espectros de massas foram comparados com dados da espectroteca Wiley 7.0 e da literatura (Adams, 2007).

## **4.6 Testes Químico/biológicos**

Os extratos em etanol e/ou óleos essenciais com maiores rendimentos foram testados nos seguintes ensaios:

### **4.6.1 Ensaio de atividade inibidora da enzima acetilcolinesterase.**

A atividade inibitória de acetilcolinesterase foi verificada segundo o método de Ellman (1961), modificado por Rhee *et al* (2001). A amostra foi adicionada em uma placa de CCD (cromatografia de camada delgada). Após a completa evaporação do solvente, foi adicionado sobre a placa cromatográfica o corante e o substrato, que são o reagente de Ellman (ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico, DTNB) e uma solução de iodeto de acetiltiocolina (ATCI) em tampão. A enzima AChE (3 U/mL) foi adicionada posteriormente e analisada depois de 20 minutos. O resultado foi verificado através da diferença na coloração, característica do método, em que a coloração amarela caracteriza o resultado negativo para inibição e branca para positivo.

As regiões da placa que contêm substâncias capazes de inibir a ação da enzima acetilcolinesterase apresentam uma mancha branca contra a coloração de fundo do corante.

### **4.6.2 Análise da atividade antioxidante frente ao radical livre DPPH**

A atividade inibidora de radicais livres foi verificada de forma qualitativa (Soler-Rivas *et al.*, 2000) e quantitativa (Mensor, 2001).

#### **4.6.2.1 Análise qualitativa da atividade antioxidante**

O teste de atividade antioxidante qualitativo foi realizado através da capacidade seqüestrante do radical estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) em soluções com solvente metanol, por trinta segundos.

Foram aplicadas sobre uma cromatoplaça de sílica gel soluções das amostras de extrato bruto com concentração de 1mg/mL. Após a total evaporação do solvente, a placa será nebulizada com solução metanólica de DPPH a 0,3mM/mL.

A atividade antioxidante foi evidenciada pela presença de manchas amarelas ou brancas decorrentes da redução do DPPH, contra a coloração púrpura de fundo, após alguns minutos à temperatura ambiente. Como padrão positivo foi utilizado o flavonóide quercetina.

#### **4.6.2.2 Análise quantitativa da atividade antioxidante**

A atividade antioxidante foi avaliada por meio da capacidade seqüestrante do radical estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), utilizando quercetina como padrão externo. Verifica-se que o padrão apresenta concentração eficiente aproximada de 4 µg/mL, devido a isso, foram preparadas soluções em metanol com concentrações de 0,3906 a 25 µg/mL. O mesmo procedimento foi realizado para as soluções dos extratos com concentração de 3,125 a 100 µg/mL. O método foi adaptado para microplaca (figura 23).

As amostras diluídas tiveram suas absorbâncias medidas em leitora de microplaca (Bio-Rad, modelo 3550 UV) a 517 nm para a obtenção do branco. Em seguida, foram submetidas à adição do reativo DPPH (0,3 mM), incubando a reação

por 30 minutos em ambiente escuro. A leitura da absorbância foi novamente realizada, pois, por ação de um antioxidante o DPPH é reduzido, formando difenilpicril-hidrazina, com conseqüente desaparecimento da coloração, podendo ser monitorado pelo decréscimo da absorbância.

A porcentagem da atividade antioxidante (%AA) corresponde à quantidade de DPPH consumida, sendo que a quantidade da amostra necessária para decrescer a concentração de DPPH em 50% é denominada concentração eficiente ( $CE_{50}$ ). Os valores de absorbância em todas as concentrações testadas foram convertidos em % AA pela equação 01:

$$\%AA = \{ [ Abs_{controle} - ( Abs_{amostra} - Abs_{branco} ) ] \times 100 \} / Abs_{controle}$$

Onde  $Abs_{controle}$  é a absorbância inicial da solução metanólica de DPPH e  $Abs_{amostra}$  é a absorbância da mistura reacional ( DPPH + amostra).



Figura 23: Procedimento para análise quantitativa da atividade antioxidante.

Os resultados apresentados neste estudo correspondem a média da triplicata e o desvio padrão da média. O valor de ( $CE_{50}$ ) foi determinada através da regressão linear dos valores obtidos utilizando o programa Microsoft Office Excel 2007.

#### 4.6.3 Ensaio de letalidade sobre *Artemia salina* LEACH

A atividade citotóxica dos extratos foi avaliada através do teste de letalidade contra *Artemia salina* Leach, de acordo com o método proposto por Meyer e colaboradores (1982). Náuplios de *Artemia salina* foram incubados em água do mar artificial por 48 horas à temperatura de 28°C. Soluções dos extratos foram preparadas em dimetilsulfóxido (DMSO) nas concentrações variando de 10 a 500 µg/mL.

Cerca de 10 larvas de *Artemia salina* foram transferidas para recipientes contendo água artificial do mar e a substância a ser testada. Os ensaios foram realizados em triplicata. A contagem do número de larvas mortas foi realizada após 24 horas e esse número foi usado para o cálculo utilizando o método Próbitos de análise para obtenção das DL<sub>50</sub> e respectivos intervalos de confiança (Finney, 1971) (figura 24). Os extratos com DL<sub>50</sub> maiores que 1000 µg/mL ppm foram considerados inativos.

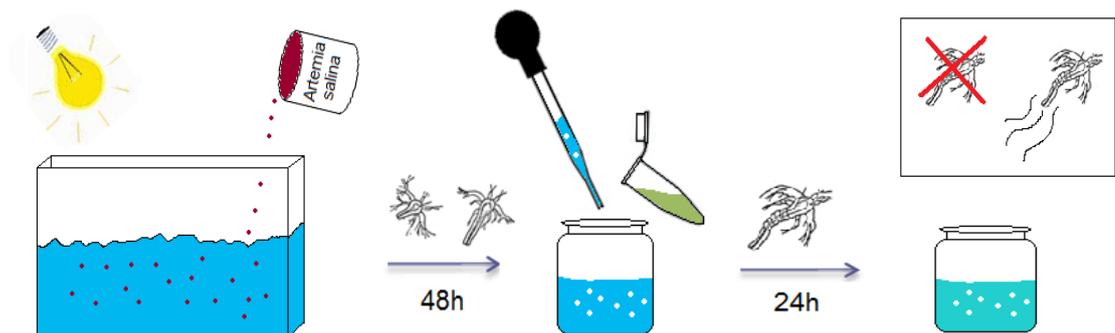


Figura 24: Procedimento para o ensaio de citotoxicidade em *Artemia salina*.

#### 4.6.4 Avaliação da atividade citotóxica em células tumorais

A avaliação da citotoxicidade foi realizada na Universidade Federal do Ceará sob a supervisão da prof. Dra. Cláudia Pessoa. Foram utilizados três tipos de linhagens

tumorais: MDA-MB435 (mama - humano), HCT-8 (cólón - humano) e SF-295 (glioblastoma - humano), cultivadas em meio RPMI 1640, suplementados com 10 % de soro fetal bovino e 1 % de antibióticos, mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>. As amostras dos extratos etanólicos foram dissolvidas em DMSO puro estéril e testadas na concentração final de 50 µg/mL.

Análise de citotoxicidade pelo método do MTT vem sendo utilizada no programa de *screening* do *National Cancer Institute* dos Estados Unidos (NCI). É um método rápido, sensível e barato. É uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas. O estudo citotóxico pelo método do MTT permite definir facilmente a citotoxicidade, mas não o mecanismo de ação (Berridge *et al.*, 1996).

As células foram plaqueadas na concentração de  $0,1 \times 10^6$  cél/mL para as linhagens MDA/MB-435 e SF-295 e  $0,7 \times 10^5$  cél/mL para a linhagem HCT-8. Em seguida foram adicionadas as amostras na concentração final de 50 µg/mL. As placas foram incubadas por 72 horas em estufa a 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C. Ao término deste, as mesmas foram centrifugadas e o sobrenadante, removido. Em seguida, foram adicionados 150 µL da solução de MTT (sal de tetrazolium), e as placas foram incubadas por 3h. A absorbância foi lida após dissolução do precipitado com 150µL de DMSO puro em espectrofotômetro de placa a 595 nm.

Os experimentos foram analisados segundo a média ± desvio padrão da média (DPM) da porcentagem de inibição do crescimento celular usando o programa *GraphPad Prism*.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após séculos de exploração desordenada na Região Amazônica, as espécies da família Lauraceae produtoras de óleo essencial continuam tendo interesse comercial, mas com poucos estudos químicos e farmacológicos descritos na literatura em comparação com a quantidade de espécies de interesse (Alcântara *et al.*, 2010).

As espécies de plantas estudadas neste trabalho fazem parte de uma série de plantas selecionadas pelo grupo de pesquisa Química de Biomoléculas da Amazônia (Q-BiomA) objetivando o estudo do perfil de seus constituintes alcaloídicos e voláteis. Todas as espécies fazem parte da flora Amazônica, e possuem pouco ou nenhum estudo químico e biológico.

As extrações e os ensaios químicos e biológicos foram realizados conforme a disponibilidade dos equipamentos e reagentes e, portanto os testes não foram realizados com todas as espécies e partes da planta até a presente data.

### 5.1 Rendimento do extrato

Foram obtidos 23 extratos com rendimento variando de 1,61 à 29,04% conforme apresentado na tabela 4. A espécie *O. ceanothifolia* apresentou o maior rendimento na maioria das partes (folhas, galhos finos e grossos). Em quase todas as espécies foi possível verificar que os galhos finos apresentaram rendimento maior que os galhos grossos. Tal dado é importante tendo em vista a sustentabilidade da

pesquisa, já que os galhos finos são mais fáceis de serem obtidos e sua retirada é menos prejudiciais à planta, devido crescerem mais rápido.

Tabela 4: Rendimento dos extratos das espécies de Lauraceae.

Espécies	Folhas		Galhos grossos		Galhos finos		Casca	
	Massa (g)	Rend. (%)	Massa (g)	Rend. (%)	Massa (g)	Rend. (%)	Massa (g)	Rend. (%)
<i>E. citriodora</i>	400	12,99	215	6,82	NR	NR	NR	NR
<i>E. sericea</i>	500	4,79	500	2,04	500	3,47	200	2,84
<i>O. ceanothifolia</i>	700	29,04	500	8,60	300	13,62	350	2,04
<i>O. leucoxylon</i>	550	3,93	500	2,57	500	5,79	NR	NR
<i>O. minor</i>	500	16,65	600	6,72	300	6,07	300	3,54
<i>R. crenaticupula</i>	100	8,26	500	1,61	NR	NR	NR	NR
<i>R. recurva</i>	500	4,26	500	1,06	500	2,01	300	0,51

A= Peso do material utilizado para extração a frio em etanol; Rend.=rendimento; NR = não realizado

## 5.2 Prospecção fitoquímica

O estudo fitoquímico revelou a presença de alcalóides e compostos fenólicos na maioria dos extratos. Os resultados para a prospecção de alcalóides utilizando como reveladores Hager, Wagner, Mayer e Draggendorff foram unidos e são apresentados na tabela 09, assim como os resultados para flavonóides e compostos fenólicos.

Os flavonóides não foram detectados em nenhum extrato do gênero *Rhodostemonodaphne* e das espécies *Endlicheria sericea* (galhos) e *Ocotea*

*leucoxylo*n. Porém este último gênero apresentou a maior quantidade de espécies contendo alcalóides, o que pode ser um indício para outras atividades já que os alcalóides são conhecidos por apresentarem pronunciada atividade biológica.

A presença de alcalóides em *Ocotea* foi verificada destacando esse grupo de substâncias como bastante freqüentes em espécies desse gênero. Foi possível verificar que a maioria das partes das espécies testadas apresentou alcalóides.

Tabela 5: Prospecção fitoquímica para alcalóides, compostos fenólicos e flavonóides.

	Órgão vegetal	Fenóis	Flavonóides	Alcalóides
<i>E. citriodora</i>	Folhas	-	-	-
	Galhos grossos	+	-	-
<i>E. sericeae</i>	Folhas	+	+	-
	Galhos grossos	+	-	+
	Galhos finos	+	-	+
	Cascas	+	+	+
<i>O. ceanothifolia</i>	Folhas	+	+	-
	Galhos grossos	+	+	+
	Galhos finos	+	+	+
	Cascas	+	-	-
<i>O. leucoxylo</i> n	Folhas	+	-	+
	Galhos grossos	+	-	+
	Galhos finos	+	-	+
<i>O. minor</i>	Folhas	+	-	+
	Galhos grossos	+	+	+
	Galhos finos	+	+	+
	Cascas	+	+	+
<i>R. recurva</i>	Folhas	-	-	-
	Galhos grossos	-	-	+
	Galhos finos	-	-	+
	Cascas	-	-	+
<i>R. crenaticupula</i>	Folhas	-	-	+
	Galhos grossos	+	-	+

(+):positivo; (-):negativo;

## 5.3 Fração Alcalóidica

### 5.3.1 Rendimento da partição

O rendimento (%) das frações alcalóidicas variaram de 67,3598 em *E. sericea* a 0,0749 em *E. citriodora*, baseadas em 2g do material de partida. Os rendimentos da partição podem ser verificados a seguir (Tabela 6).

Tabela 6: Rendimento da partição ácido-base (%).

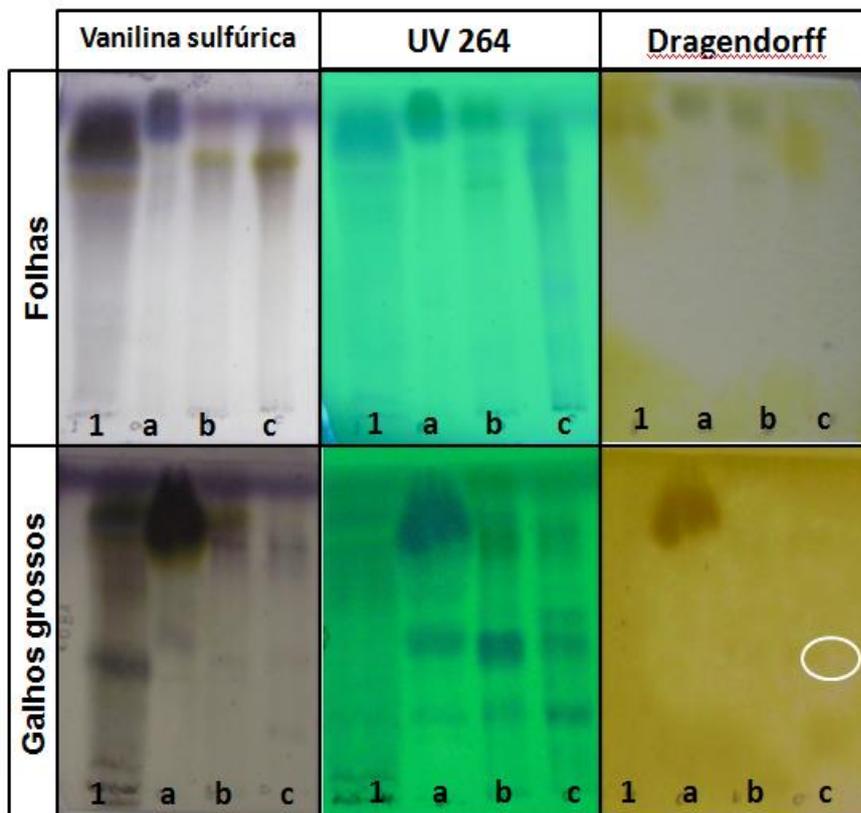
	Órgão vegetal	Hexano	Diclorometano	Fração alcalóidica
<i>E. citriodora</i>	Folhas	95,8063	0,7298	0,0749
	Galhos grossos	12,1941	3,3741	0,8485
<i>E. sericeae</i>	Folhas	8,9957	16,6872	13,9949
	Galhos grossos	26,4841	22,3406	2,1813
	Cascas	22,4532	4,0688	67,3598
<i>O. ceanothifolia</i>	Folhas	5,9401	6,0496	0,7518
	Galhos grossos	1,0022	10,5809	2,0693
	Galhos finos	0,5395	6,0678	0,5246
	Cascas	0,5091	10,2800	1,1553
<i>O. leucoxyton</i>	Folhas	68,9310	14,9902	9,1739
	Galhos grossos	29,5341	19,3682	5,5870
	Galhos finos	5,2083	17,9812	11,6716
<i>O. minor</i>	Folhas	9,3799	9,5347	0,2446
	Galhos grossos	0,2191	4,0187	0,8316
	Galhos finos	1,1014	2,4370	0,9768
	Cascas	0,6939	1,2986	0,6839
<i>R. recurva</i>	Folhas	54,3737	2,0224	0,2769
	Galhos grossos	33,4256	13,8845	0,9296
	Galhos finos	42,9355	1,9344	0,5285
<i>R. crenaticupula</i>	Folhas	59,0989	1,7336	0,1273
	Galhos grossos	16,5237	25,2493	0,7379

As espécies de *Endlicheria* apresentaram perfis muito diferentes. Enquanto em *E. sericea* (folhas) pode-se verificar o maior rendimento de todos os extratos, *E. citriodora* (folhas) obteve o menor resultado. Tal dado reflete o resultado das prospecções, onde esta apresentou resultado negativo, o que pode significar uma quantidade muito baixa de alcalóides presentes no extrato. As *Rhodostemonodaphnes* apresentaram rendimentos das frações alcalóidicas inferiores a 1% em todos os extratos.

### 5.3.2 Análise por CCD.

Os alcalóides podem ser encontrados em todas as partes de um vegetal, contudo em um ou mais órgãos haverá um acúmulo preferencial dessas substâncias (Henriques *et al.*,2004) como pode ser observado nas placas cromatográficas dessas espécies analisadas (figura 25 à 31).

#### *Endlicheria citriodora*

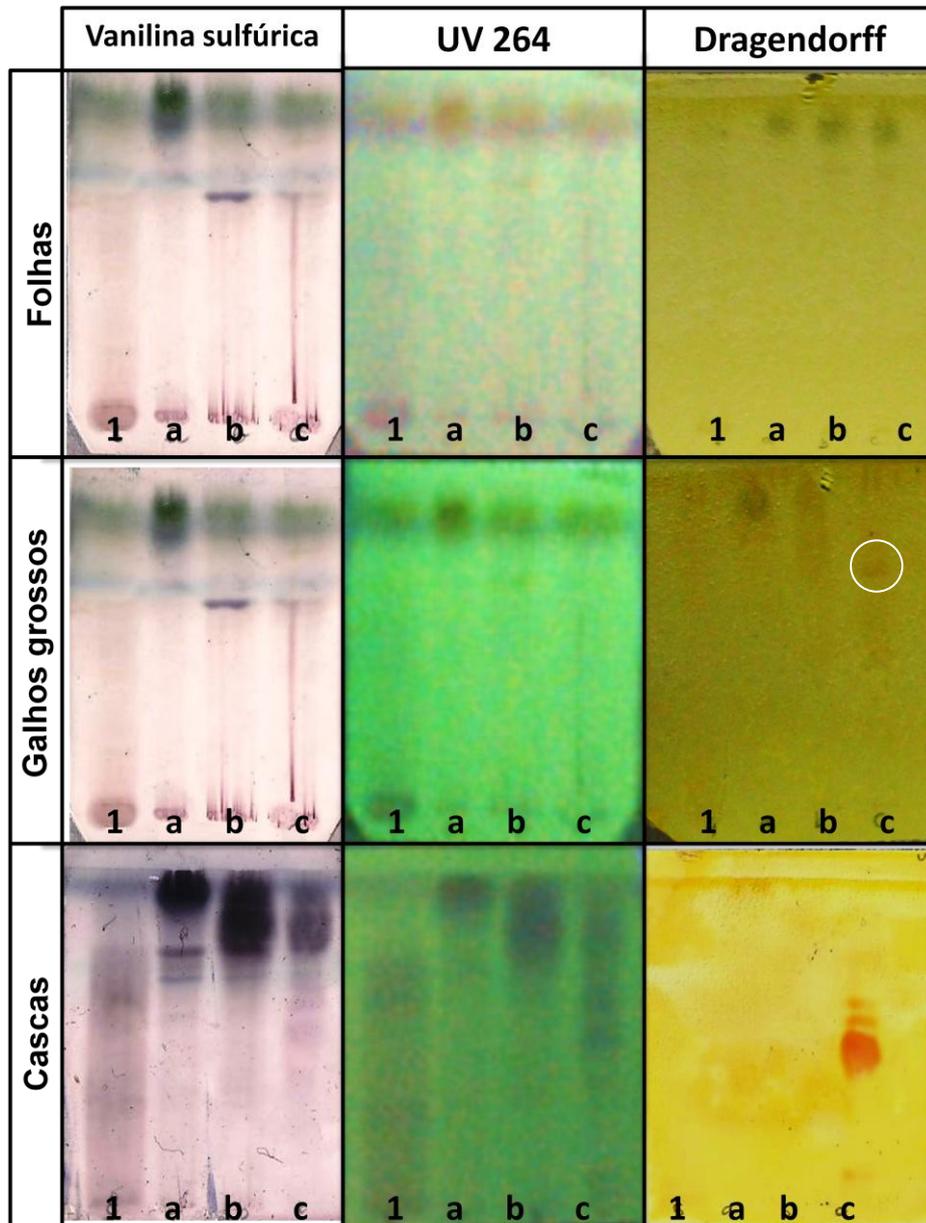


1= Extrato bruto; a = Fração em hexano; b = Fração em diclorometano; c = fração alcaloídica  
 Figura 25: placa cromatográfica de *Endlicheria citriodora*

Não foi verificado a presença de alcalóides nas frações de folhas e fracamente nos galhos de *Endlicheria citriodora* e *E. sericea*. Tais dados são condizentes com a prospecção dos extratos realizados utilizando reveladores específicos para alcalóides, em que o mesmo foi negativo. O que pode indicar uma quantidade pequena ou ausência de alcalóides presentes nas folhas e galhos dessas espécies.

O fato do resultado em prospecção química ser negativo não exclui a presença de uma substância em um extrato, pois, a mesma pode estar em uma concentração muito baixa no extrato testado.

*Endlicheria sericeae*



1= Extrato bruto; a = Fração em hexano; b = Fração em diclorometano; c = fração alcaloídica

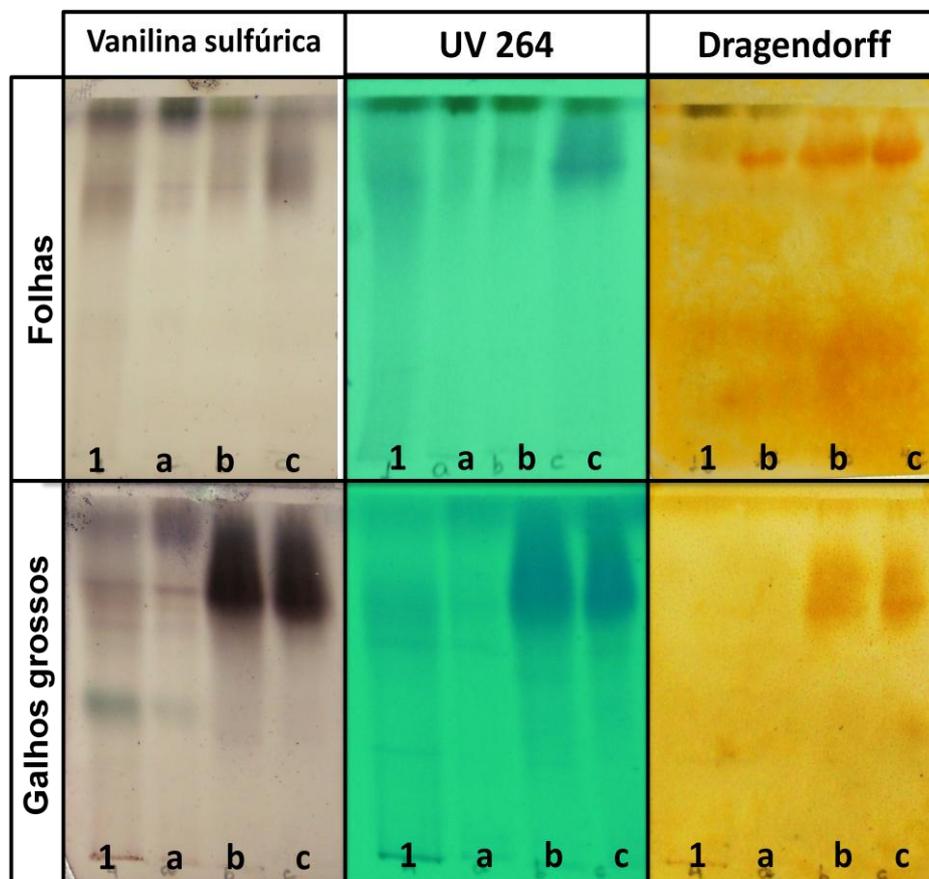
Figura 26: placa cromatográfica de *Endlicheria sericeae*

A análise em CCD possibilita que classes de substâncias que apresentem concentrações baixas em um extrato possam ser visualizadas através da separação de frações na placa cromatográfica, como no caso dos galhos de *E. citriodora*.

No extrato das cascas de *E. sericea* pode-se visualizar três manchas que sugerem corresponder a presença do mesmo número de alcalóides, embora a presença de uma fração separada na placa cromatográfica não comprove que a mesma está isolada.

*Rhodostemonodaphne crenaticupula*

Os resultados das partições ácido-base das duas espécies de *Rhodostemonodaphne* podem ser visualizados nas figuras 27 e 28.

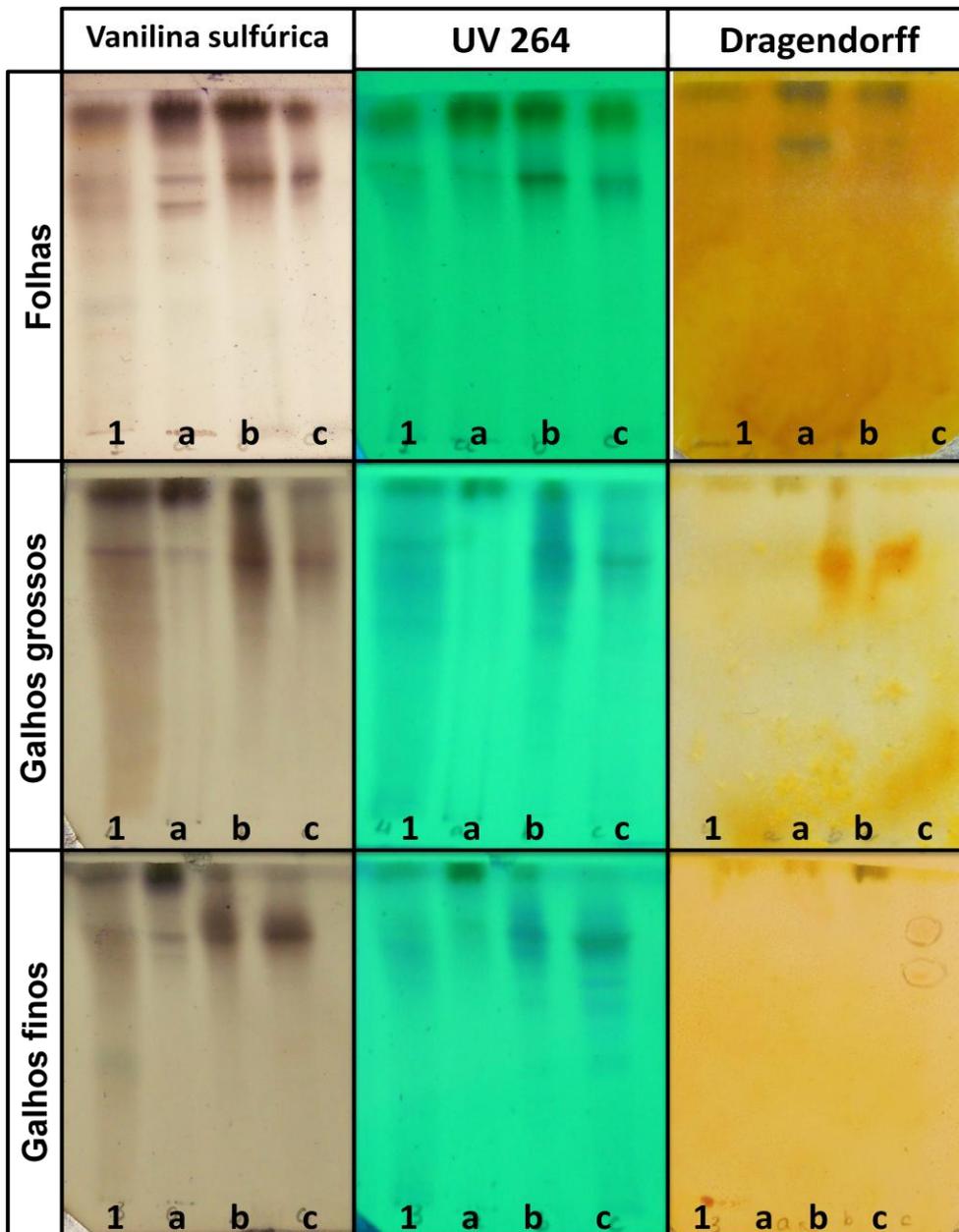


1= Extrato bruto; a = Fração em hexano; b = Fração em diclorometano; c = fração alcaloídica

Figura 27: placa cromatográfica de *R. crenaticupula*

Nas folhas e nos galhos de *R. crenaticupula* foi possível visualizar a presença de duas manchas que equivalem a presença de alcalóides. Em contraste, não foi possível visualizar a presença de alcalóides nas folhas de *R. recurva*, fracamente nos galhos finos e mais pronunciado nos galhos grossos.

*Rhodostemonodaphne recurva*



1= Extrato bruto; a = Fração em hexano; b = Fração em diclorometano; c = fração alcaloídica

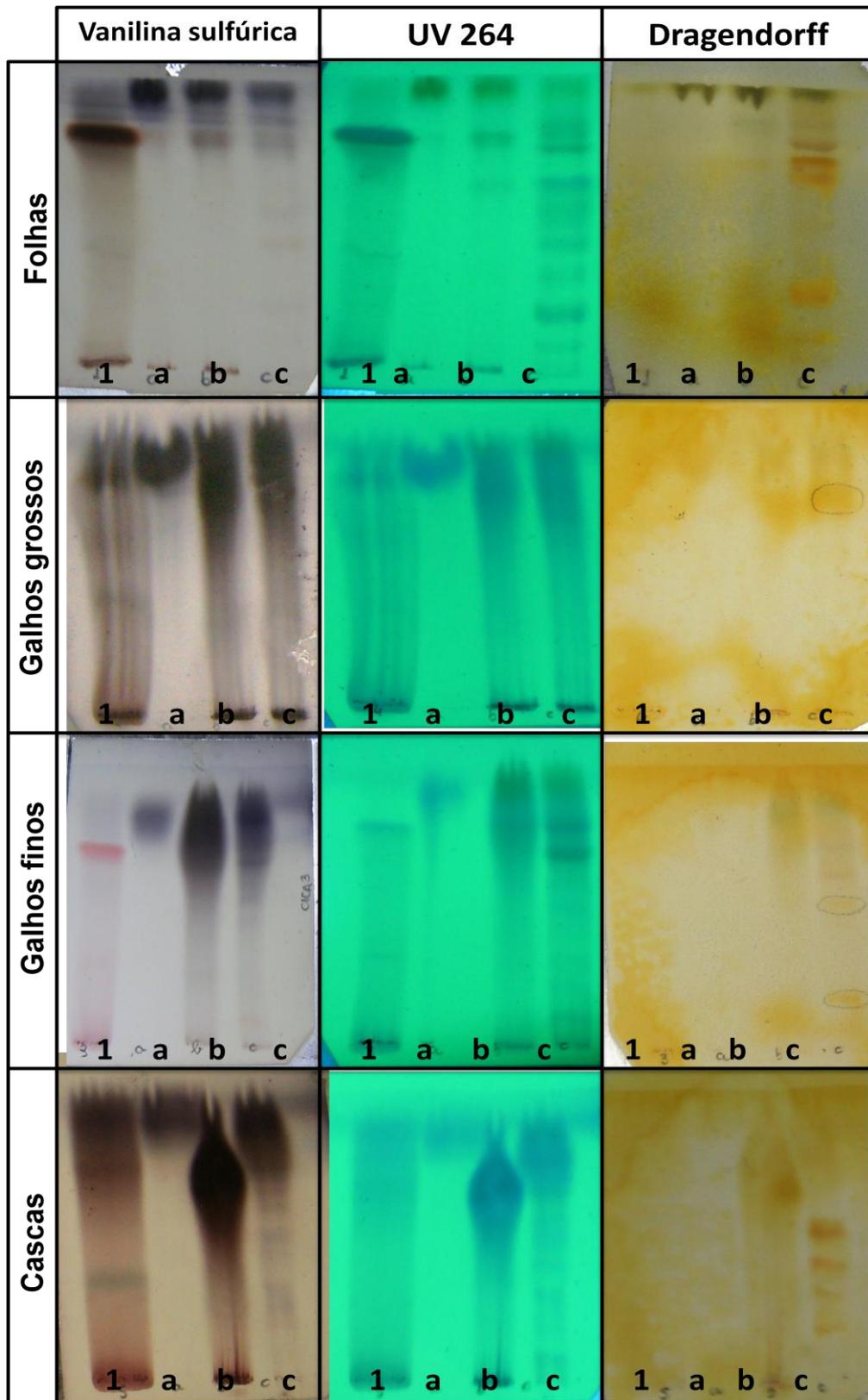
Figura 28: placa cromatográfica de *R. recurva*

A prospecção para alcalóides também foi confirmada no gênero *Rhodostemonodaphne*. O perfil dos alcalóides nas folhas e galhos de *R. crenaticupula* foi o mesmo na placa cromatográfica porém, em *R. recurva* visualizou-se duas manchas nos galhos finos e apenas uma nos galhos grossos. Segundo Henriques *et al.* (2004), após o transporte para o sítio de armazenagem, podem haver modificações estruturais secundárias. Assim, os mesmos podem ter a mesma origem, porém com estruturas diferentes.

A presença de alcalóides em potencial confirma a revisão de Zanin & Lordello (2007), onde foi constatada por meio de análise em CCD e prospecção a presença de alcalóides em todas as partes (folhas, galhos e cascas).

Dos três gêneros analisados, as *Ocoteas* foram as que apresentaram mais alcalóides, tanto em quantidade, visualizadas pelo número de frações obtidas pela separação do extrato na placa cromatográfica, quanto na concentração, verificada por meio da intensidade da coloração.

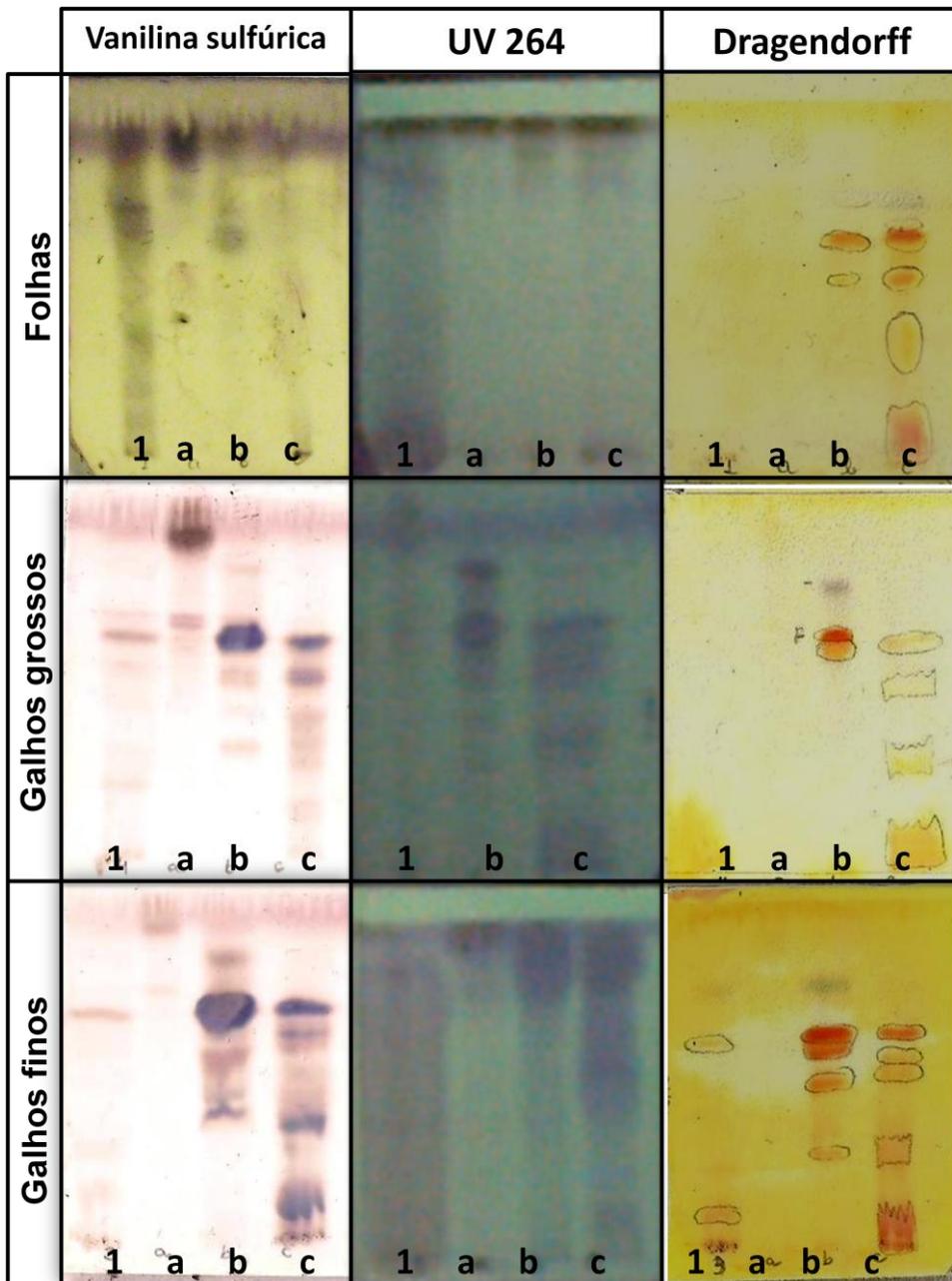
A presença de alcalóides nas espécies de *Ocotea*, identificados por revelador específico, pode ser visualizado nas figuras 29, 30 e 31. As manchas em *Ocotea leucoxylon* e *Ocotea minor* foram mais pronunciadas que em *O. ceanothifolia*.

*Ocotea ceanothifolia*

1= Extrato bruto; a = Fração em hexano; b = Fração em diclorometano; c = fração alcalóidica

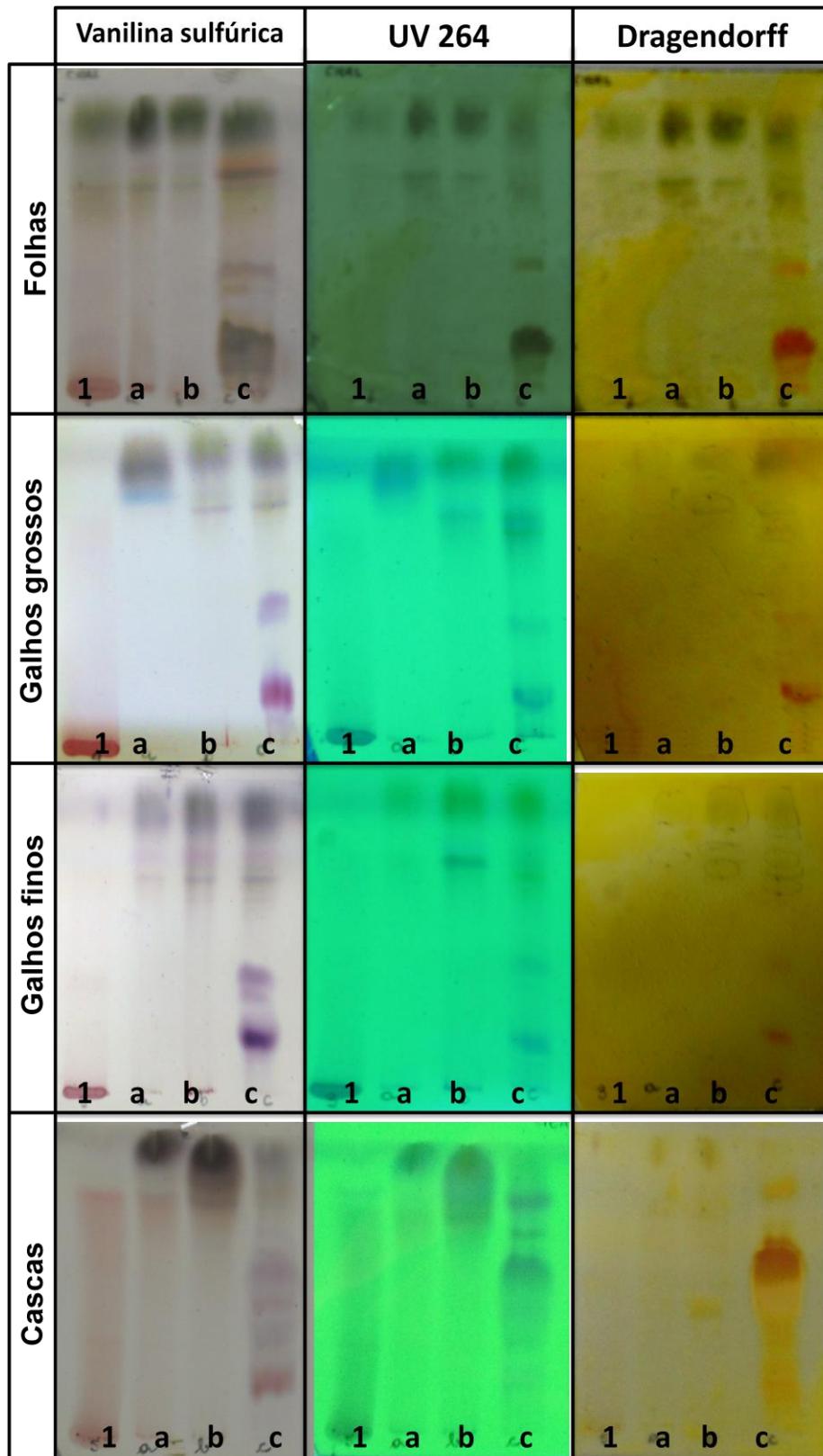
Figura 29: placa cromatográfica de *O. ceanothifolia*

*O. leucoxylon*



1= Extrato bruto; a = Fração em hexano; b = Fração em diclorometano; c = fração alcaloídica

Figura 29: placa cromatográfica de *O. leucoxylon*

*Ocotea minor*

1= Extrato bruto; a = Fração em hexano; b = Fração em diclorometano; c = fração alcaloídica

Figura 31: placa cromatográfica de *O. minor*

O procedimento realizado para o fracionamento ácido-básico para alcalóides foi uma adaptação do método de partição ácido-básico modificado proposto por Giordani *et al* (2008). Através das modificações propostas verificou-se que o perfil dos extratos nas análises por cromatografia em camada delgada (CCD) apresentaram melhores perfis devido a separação dos componentes.

A diferença para a partição ácido-base clássica está na adição de diclorometano (b) quando o meio da fração aquosa ainda está ácida. Tal fato faz com que possa haver a extração de substâncias de média e baixa polaridade onde estão incluídos outros componentes não desejados para esse trabalho.

Ao adicionar o hidróxido de amônio, este libera a maioria dos alcalóides e os convertem na forma de bases livres, que podem ser retirados com a segunda adição de diclorometano (c). Dessa forma é obtida uma mistura bruta de alcalóides isolados do resto dos produtos metabólicos do vegetal. Após a retirada da fração alcaloídica, esta solução foi neutralizada através de várias partições com água destilada.

Os perfis das placas cromatográficas das *Ocoteas* demonstraram o quanto às substâncias de média polaridade foram extraídas pela primeira adição de diclorometano (b) e os alcalóides, de maior polaridade, foram extraídos pela segunda adição de diclorometano, onde o meio aquoso encontrava-se básico.

### 5.3.3 Análise por espectrometria de massa

Por meio de espectrometria de massa pode-se analisar o perfil dos extratos e frações e selecionar as espécies mais promissoras, conforme o interesse do trabalho. A família Lauraceae apresenta como marcador taxonômico a presença de alcalóides, principalmente a classe dos isoquinolínicos. Destes, são predominantes compostos com moléculas aporfínicas, oxoaporfínicas e benzilisoquinolínicas. Os espectros de massas das frações alcaloídicas dos três gêneros estão apresentadas em anexo e reunidas na tabela 6, onde as substâncias majoritárias estão sendo destacadas.

Tabela 6: Análise do perfil das frações alcaloídicas por espectrometria de massa .

Espécie	Órgão vegetal	Íons principais(m/z)
<i>E. citriodora</i>	Folhas	<b>238,95</b> ; 387,91
<i>E. citriodora</i>	Galhos grossos	<b>300,06</b> ; 329,88
<i>E. sericea</i>	Folhas	<b>329,95</b> ; 300,13
<i>E. sericea</i>	Galhos finos	286,06; 300,06; <b>329,88</b> ; 346,19
<i>E. sericea</i>	Galhos grossos	300,06; 328,13; <b>330,09</b> ; 341,94
<i>E. sericea</i>	Cascas	285,85; <b>330,09</b>
<i>R. crenaticupula</i>	Folhas	274,16; 318,06; <b>436,91</b> ; 452,87
<i>R. crenaticupula</i>	Galhos grossos	<b>286,06</b> ; 313,85; 330,09
<i>R. recurva</i>	Folhas	191,91; 274,23; <b>330,16</b>
<i>R. recurva</i>	Galhos finos	281,93; <b>330,02</b> ; 346,12
<i>R. recurva</i>	Galhos grossos	352,89; <b>330,02</b> ; 345,91
<i>O. ceanothifolia</i>	Folhas	<b>299,92</b> ; 357,95
<i>O. ceanothifolia</i>	Galhos finos	<b>299,92</b> ; 314,20; 345,91
<i>O. ceanothifolia</i>	Galhos grossos	<b>299,92</b> ; 314,13; 346,05
<i>O. ceanothifolia</i>	Cascas	300,06; <b>314,06</b> ; 330,02 346,05
<i>O. leucoxylon</i>	Folhas	310,84; 324,84; 355,78; <b>370,13</b>
<i>O. leucoxylon</i>	Galhos finos	310,84; 325,05; 355,92; <b>369,92</b>
<i>O. leucoxylon</i>	Galhos grossos	324,84; 355,92; <b>369,92</b>
<i>O. minor</i>	Folhas	<b>143,89</b> ; 174,90; 205,07
<i>O. minor</i>	Galhos finos	143,89; 175,11; <b>205,07</b>
<i>O. minor</i>	Galhos grossos	143,89; 175,04; <b>205,07</b>
<i>O. minor</i>	Cascas	<b>285,58</b> ; 299,92; 330,09

Os picos mais intensos constituintes foram observados entre massa de 143,89 a 452,87  $m/z$  em *O. minor* e *R. crenaticupula* respectivamente. Analisando os perfis cromatográficos das frações alcalóidicas observa-se que os respectivos espectros obtidos nas mesmas condições experimentais, apresentam perfis semelhantes entre partes da mesma espécie, principalmente entre galhos finos e galhos grossos, com o mesmo pico base.

Por tratar-se de uma fração, pode-se realizar uma análise do perfil, onde algumas classes de substâncias podem ser caracterizadas. Na tabela 7 há algumas classes correspondentes a massa dos picos encontrados nas frações e algumas sugestões de alcalóides com registro na literatura de isolamento em espécies de Lauraceae.

Os picos  $m/z$  de 300 e 330 estiveram presentes na maioria das frações. Por se tratarem de um  $m/z$  de números pares (300 e 330) significa que, as suas massas molares são na realidade ímpar. Estes dados fornecem informações de que, os compostos referentes, tratam-se de substâncias com número ímpar de nitrogênios. Os alcalóides benzilisoquinolínicos reticulina e *N*-metil coclaurina apresentam fórmula molecular  $C_{19}H_{24}NO_4$  e  $C_{19}H_{24}NO_4$  o que podem corresponder aos picos encontrados, sendo estes, descritos como alcalóides isolados em gêneros de Lauraceae (Sulaiman *et al.* 2011; Dias *et al.*, 2003).

No gênero *Ocotea*, são relatados diversos trabalhos com o isolamento de alcalóides. Destes, a classe dos aporfínicos são os constituintes químicos mais frequentes, sendo encontrado em um número considerável de espécies (Zanin & Lordello, 2007).

O pico 238,95 apresenta massa correspondente à estrutura de um alcalóide tipo benzilisoquinolínico, núcleo encontrado em diversas espécies de *Ocotea* (Dias *et al.*, 2003, Meirelles *et al.*, 1979 ; Barbosa-Filho *et al.*, 1999).

Em *Ocotea leucoxydon* verificou-se a prevalência do íon principal em todas as partes de 370 m/z, o que sugere a presença do alcalóide aporfínico ocoteína ( $C_{21}H_{23}NO_5$ ), alcalóide denominado devido ao seu isolamento em espécies desse gênero (Zhou *et al.*, 2000).

Os gêneros *Endlicheria* e *Rhodostemonodaphne* apresentaram seus picos principais na maioria dos órgãos vegetais com m/z de 300 e 330. O pico correspondente a 285 m/z corresponde à massa que é encontrada no alcalóide coclaurina, onde este foi encontrado em diversos gêneros de Lauraceae como *Aniba*, *Litsea*, *Mezilaurus*, *Nectandra*, *Neolitsea*, *Phoebe* e *Ocotea* (Silva, *et al.*, 2002; Guinaudeau, *et al.*, 1979 Guinaudeau, 1983; Wu & Huang, 2006).

Tabela 7: Comparação dos íons moleculares com algumas fórmulas moleculares de alcalóides isolados em Lauraceae.

Íon molecular (m/z) (M+1)	Fórmula molecular	Alcalóides	Classificação	Referência
191,91	C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>3</sub>	Noroxihidrastinina	Isoquinolinico	Wu & Huang, 2006;
238,95	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> N	Benzilisoquinolínicos	benzilisoquinolínicos	Dias <i>et al.</i> , 2003, Meirelles <i>et al.</i> , 1979 ;
281,93	C <sub>18</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>2</sub>	Bornuciferina, lirinidina	Aporfínico	Guinaudeau, et al., 1979 Guinaudeau, 1983;
286,06	C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>3</sub>	Norcanelillina, coclaurina	benzilisoquinolínicos	Silva, et al., 2002; Wu & Huang, 2006;
300,06	C <sub>19</sub> H <sub>24</sub> NO <sub>4</sub>	N-metilcoclaurina	benzilisoquinolínicos	Wu & Huang, 2006; ; Dias <i>et al.</i> , 2003
310,84	C <sub>19</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>3</sub>	Prestephanina, N-carbamoilasimilobina	Aporfínico	Guinaudeau, et al., 1979 Guinaudeau, 1983;
314,20	C <sub>18</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>4</sub>	Laurolitsina, laureptina	Aporfínico	Guinaudeau, et al., 1979 Guinaudeau, 1983;
324,84	C <sub>19</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>4</sub>	Neolitsina,	Aporfínico	Guinaudeau, et al., 1979 Guinaudeau, 1983;
328,13	C <sub>19</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>4</sub>	Boldina, Laurotetanina, isoboldina, lirina N-oxidada	Aporfínico	Guinaudeau, et al., 1979 Guinaudeau, 1983;
330,09	C <sub>19</sub> H <sub>24</sub> NO <sub>4</sub>	Reticulina	Aporfínico	Sulaiman <i>et al.</i> 2011; Dias <i>et al.</i> , 2003
341,94	C <sub>19</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>5</sub>	Isocoridina, predicentrina, lirioferina	Aporfínico	Guinaudeau, et al., 1979 Guinaudeau, 1983;
352,89	C <sub>20</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>5</sub>	Oxoglucina	Oxoaporfínico	Guinaudeau, et al., 1979 Guinaudeau, 1983;
355,78	C <sub>21</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>4</sub>	Glucina, leucoxina	Aporfínico	Guinaudeau, et al., 1979 Guinaudeau, 1983;
357,95	C <sub>21</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>4</sub>	Srilankina	Aporfínico	Guinaudeau, et al., 1979 Guinaudeau, 1983;
370,13	C <sub>21</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>5</sub>	Ocoteina, N-metilglucina	Aporfínico	Zhou <i>et al.</i> , 2000; Guinaudeau, 1983;

Por meio das análises pode-se sugerir que os demais íons presentes no gênero *Ocotea* correspondem a alcalóides tipo aporfínico conforme encontrado na literatura (Zanin & Lordello, 2007). Tal fato é verificado em relação a razão massa carga encontrada que pode ser comparada a esta classe de substâncias.

Pouco ou nenhum estudo descrito na literatura sobre isolamento de alcalóides nos gêneros *Endlicheria* e *Rhodostemonodaphne* são encontrados. Tal fato pode ser explicado devido a baixa concentração dessa classe de substância nos extratos. Mesmo utilizando partição ácido-base, em que obtem-se uma fração rica em alcalóides, a concentração destes é baixa quando comparada a quantidade de substâncias presentes na fração e os picos que são descritos na literatura. No gênero *Rhodostemonodaphne* verificou-se nos espectros de massa misturas complexas de picos .

Levando em consideração a dificuldade de isolamento e purificação das classes de alcalóides, tanto quando existem dois ou mais componentes com o mesmo esqueleto na mesma fração, devido ao mesmo comportamento cromatográfico destas substâncias, quanto quando a concentração destes é baixa no extrato, a análise das frações enriquecida de alcalóides é uma alternativa eficaz na detecção dos constituintes presentes na fração.

## 5.4 Óleo essencial

### 5.4.1 Rendimento do óleo essencial

As Lauraceae são conhecidas internacionalmente por apresentarem espécies aromáticas. Dos gêneros estudados as *Anibas* em especial a espécie de *Aniba rosaeodora* apresenta uma quantidade significativa de óleo em comparação com a massa do material vegetal. No trabalho realizado por Alcântara (2009), onde foi analisado óleos essenciais de 14 espécies de diferentes gêneros de Lauraceae encontrados no Amazonas, o maior rendimento encontrado foi na referida espécie citada, com percentagem de 1,31%. Outros trabalhos relacionados apresentam rendimentos aproximados ou, em sua maioria, rendimentos inferiores ao encontrado (Silva, *et al.*, 2009; Chaverri & Ciccio, 2008; Lima *et al.*, 2004).

Neste trabalho foram extraídos das sete espécies, 21 óleos essenciais, onde as folhas apresentaram maiores rendimentos em comparação com os galhos e cascas. Os óleos como um todo apresentaram baixo rendimento como pode ser visualizado na tabela 8.

Tabela 8: Rendimento dos óleos essenciais (%). Material vegetal 100g, exceto *E. citriodora* 50g. (%)

Espécies	Folhas	Galhos grossos	Galhos finos	Cascas
<i>E. citriodora</i>	4,29	2,50	NR	NR
<i>E. sericea</i>	0,13	0,10	0,11	0,06
<i>O. ceanothifolia</i>	0,11	0,07	0,05	NR.
<i>O. leucoxylon</i>	0,13	0,05	0,02	NR
<i>O. minor</i>	0,11	0,04	NR.	0,06
<i>R. crenaticupula</i>	0,58	0,02	NR	NR
<i>R. recurva</i>	0,06	0,02	0,03	0,04

NR: não realizado

Os rendimentos dos óleos obtidos pela técnica de hidrodestilação variaram de 0,02% a 4,29%. As espécies do gênero *Rhodostemonodaphne* apresentaram os

menores rendimentos em todas as partes (folhas, galhos e casca) e as espécies de *Endlicheria* apresentaram de forma geral os maiores rendimentos. Em contraste com as espécies de *Ocotea* e *Rhodostemonodaphne*, na extração de óleo essencial a espécie *E. Citriodora* obteve o maior rendimento tanto nos galhos quanto nas folhas de 2,51 e 4,29% respectivamente.

O perfil químico dos óleos essenciais analisados, com exceção de *E. citriodora*, revelou uma proporção elevada de sesquiterpenos. Na maioria dos óleos essenciais de Lauraceae reportados na literatura observa-se a predominância de sesquiterpenos, principalmente de hidrocarbonetos sesquiterpênicos (Gottlieb *et al.*, 1981; Chaverri & Cicció, 2008; Telascrea *et al.*, 2008).

#### 5.4.1.1 *Endlicheria*

A análise química do óleo essencial de folhas e galhos de *E. citriodora* por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa estão mostradas na Tabela 9, registrando-se os principais constituintes químicos presentes nestes óleos.

Tabela 9: Composição percentual dos óleos essenciais de *Endlicheria citriodora*(%).

Substância	IR	Folhas	Galhos grossos
linalol	1.089	2,8337	1,2181
geranato de metila	1.321	93,751	95,1522
ácido gerânico	1.391	1,9358	-
<i>trans</i> cariofileno	1.418	1,4796	-
Não identificados		0	3,6297
Total identificados		100	96,3703
Monoterpenos		98,5205	96,3703
Sesquiterpenos		1,4796	-

Foram identificados os constituintes de 100% das folhas e 96,37% dos galhos, sendo que destes, a percentagem de sesquiterpenos foi superior a 95% em ambos órgãos vegetais de *E. citriodora*.

O principal constituinte foi o éster geranato de metila com uma percentagem elevada de 93,75% nas folhas e 95,15% nos galhos. Devido ao grau de pureza do constituinte majoritário, foi possível realizar a ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono (RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ) confirmar a presença deste constituinte. Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$  e os bidimensionais HSQC e HMBC estão apresentados em anexo.

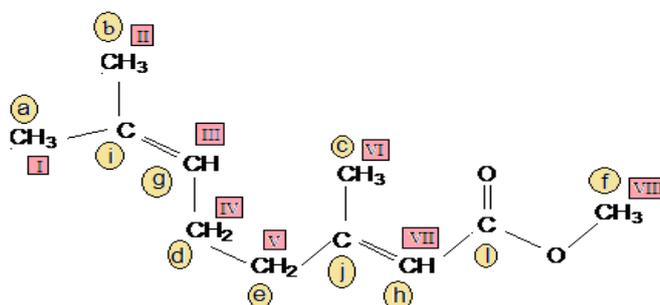
O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135° apresentaram 11 sinais de carbonos, sendo 4 metílicos:  $\delta_{\text{CH}}$  18,022 (C – a),  $\delta_{\text{CH}}$  19,157 (C – b),  $\delta_{\text{CH}}$  25,991 (C – c) e  $\delta_{\text{CH}}$  51,113 (C – f); 2 metilênicos:  $\delta_{\text{CH}}$  26,372 (C – d) e  $\delta_{\text{CH}}$  41,277 (C – e); 2 metínicos:  $\delta_{\text{CH}}$  115,563 (C – g) e  $\delta_{\text{CH}}$  123,317 (C – h) e 3 sinais de carbonos não hidrogenados:  $\delta_{\text{CH}}$  132,868 (C – i)  $\delta_{\text{CH}}$  160,477 (C – j) e  $\delta_{\text{CH}}$  167,629 (C – l). O sinal em  $\delta_{\text{CH}}$  77,00 refere-se ao solvente utilizado para a solubilização da amostra,  $\text{CDCl}_3$  (Silverstein *et al.*, 2007).

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  sugeriu a presença de singletos em  $\delta_{\text{H}}$  1,603,  $\delta_{\text{H}}$  1,683,  $\delta_{\text{H}}$  3,684 e  $\delta_{\text{H}}$  5,294. Os outros sinais podem ser verificados na tabela 10. O sinal em  $\delta_{\text{H}}$  7,26 (sngleto) refere-se ao solvente utilizado para a solubilização da amostra,  $\text{CDCl}_3$  (Silverstein *et al.*, 2007).

Por meio do mapa de contornos HSQC pode-se observar as correlações entre os sinais de hidrogênio e carbono:  $\text{C}_a - \text{H}_i$ ;  $\text{C}_b - \text{H}_{ii}$ ;  $\text{C}_g - \text{H}_{iii}$ ;  $\text{C}_d - \text{H}_{iv}$ ;  $\text{C}_e - \text{H}_v$ ;  $\text{C}_c - \text{H}_{vi}$ ;  $\text{C}_h - \text{H}_{vii}$ ;  $\text{C}_f - \text{H}_{viii}$ . Os valores obtidos nos RMN $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , DEPT, HSQC e HMBC confirmaram a presença da substância geranato de metila e seus espectros estão em anexo no final do trabalho.

Tabela 10. Resultados experimentais de RMN de  $^1\text{H}$  de *E. citriodora* ( $\delta$  em ppm,  $\text{CDCl}_3$ , 500MHz).

C	$\delta$ ppm	DEPT (Multiplicidade)	HSQC	HMBC ( $^{2,3}J_{\text{CH}}$ )
a	18,022	$\text{CH}_3$	1,6	II; III
b	19,157	$\text{CH}_3$	2,2	I;III
c	25,991	$\text{CH}_3$	1,65	V; VII
d	26,397	$\text{CH}_2$	2,2	III; V
e	41,277	$\text{CH}_2$	2,2	III; IV; VI
f	51,113	$\text{CH}_3$	3,65	-
g	115,553	CH	5,65	I;II; IV
h	123,317	CH	5,2	V;VI
i	132,868	C	-	-
j	160,477	C	-	-
l	167,629	C	-	-



O geranato de metila é encontrado principalmente em frutas cítricas como o limão siciliano (0,8%) e em espécies da família *Rutaceae*. Apresenta fórmula  $\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{O}_2$  com nome sistemático de 3,7-dimetil-octan-2,6-dienoato de metila (Araújo Jr, 2009; Rahimi-Nasrabadi *et al.*, 2009).

Em *E. sericeae* os constituintes majoritários foram espatulenol (26,84%) e óxido de cariofileno (25,75%) nas folhas, elemol nas cascas e óxido de cariofileno nos galhos finos e grossos com 29,83 e 17,25% respectivamente. A relação dos constituintes químicos dos óleos essenciais obtidos das folhas, galhos e cascas de

*Endlicheria sericea*, rendimentos, suas quantidades relativas e respectivos índices de retenção (IR) são apresentados na Tabela 11.

Através dos dados espectrométricos e de cromatografia foram detectados 13 compostos presentes nos quatro óleos analisados. O percentual da composição química dos óleos essenciais determinado foi de 70,27% nas folhas, 58,62% nos galhos finos, 28,156% nos galhos grossos e 40,67% nas cascas. Sendo os rendimentos destes, relativamente baixos (inferiores a 1,4%).

Tabela 11: Composição percentual dos óleos essenciais de *Endlicheria sericea* (%)

Substância	IR	Folhas	Galhos finos	Galhos grossos	Cascas
linalol	1.089	-	-	2, 0349	-
geranato de metila	1.321	-	1, 9956	-	-
<i>trans</i> cariofileno	1.418	6, 6585	2, 3027	1, 8696	-
aromadendreno	1.438	1, 8709	-	-	-
germacreno D	1.480	6, 0036	-	-	-
beta-selineno	1.488	3, 1520	-	-	3, 5175
gama cardineno	1.519	-	1, 7875	1, 7255	-
elemol	1.556	-	4, 9363	-	14, 4954
espatulenol	1.585	26, 8381	5, 0277	5, 2818	6, 5065
óxido de cariofileno	1.590	25, 7480	29, 8301	17, 2473	6, 9479
guaiol	1.595	-	1, 6318	-	7, 5621
óxido de humuleno	1.616	-	9, 2069	-	-
eudesmol	1.653	-	1, 9025	-	1, 6396
Não identificados		29,7289	41,3789	71,8409	59,3337
Total identificados		70,2711	58,6211	28,1591	40,6663
Monoterpenos		-	1, 9956	2,0349	-
Sesquiterpenos		70,2711	56,6255	26,1242	40,6663

#### 5.4.1.2 *Ocotea*

O óleo de *O. ceanothifolia* apresentou como constituinte majoritário espatulenol e óxido de cariofileno, e em *O. leucoxylo*n e *O. minor* o majoritário nas folhas e galhos grossos foi cariofileno e seu óxido.

### ***Ocotea ceanothifolia***

As análises dos óleos essenciais de *Ocotea ceanothifolia* por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa estão mostradas na Tabela 12, registrando-se os principais constituintes químicos presentes nestes óleos.

Os sesquiterpenos neste óleo foram os constituintes majoritários, porém, verifica-se que nos galhos grossos, a percentagem de diferença não foi tão pronunciada quanto nas outras partes (folhas e galhos finos).

Tabela 12: Composição percentual dos óleos essenciais de *Ocotea ceanothifolia* (%).

Substância	IR	Folhas	Galhos finos	Galhos grossos
alfa pineno	929	1, 2384	1,2212	-
linalol	1.088	-	2,1490	3,4198
geranato de metila	1.321	4,1637	4,4371	6,8693
beta elemeno	1.392	2,1647	-	-
trans cariofileno	1.418	3,9524	-	1,4580
germacreno D	1.480	3,8782	-	1,8006
beta selineno	1.488	3,0509	-	7,5520
espatulenol	1.585	22,2306	7,6592	-
óxido de cariofileno	1.589	22,3704	16,9030	8,0380
óxido de humuleno	1.616	5,5129	-	-
Não identificados		31,4378	68,5622	70,8623
Total identificados		68,5622	32,3695	29,1377
Monoterpenos		5,4021	7,8073	10,2891
Sesquiterpenos		63,1601	24,5622	18,8486

### ***Ocotea leucoxylon***

Vinte e um componentes presentes nos óleos essenciais de *O. leucoxylon* foram identificados por dados cromatográficos e espectrométricos. O perfil químico desses óleos mostrou semelhanças significativas na composição entre as espécies estudadas (tabela 12, 13 e 14).

Dos constituintes químicos detectados no óleo essencial das folhas 15,6286% são monoterpenos e 68,8096% são sesquiterpenos, em que os constituintes majoritários foram óxido de cariofileno (16,046%) , alfa-copaeno (10,1092%), beta cariofileno (8,902%), alfa-pineno (7,7088%) e beta-pineno (7,9198%).

Nos galhos finos e grossos apenas verificou-se a presença e um monoterpeno, o linalol, como com percentagem de 4,7631 e 1,5582% respectivamente. Os constituintes majoritários foram os sesquiterpenos beta-cariofileno (10,6697%) e espatulenol (10,4549%) nos galhos finos e óxido de cariofileno (17,5303%) e beta-eudesmol (8,6054%) nos galhos grossos.

Tabela 13: Composição percentual dos óleos essenciais de *Ocotea leucoxydon* (%).

Substância	IR	Folhas	galhos finos	Galhos grossos
alfa-pineno	934	7,7088	-	-
beta-pineno	978	7,9198	-	-
linalol	1.099	-	4,7631	1,5582
alfa-cubebeno	1.353	2,2594	1,573	-
alfa-copaeno	1.380	10,1092	2,1003	-
beta-cubebeno	1.394	2,6065	-	-
beta-elemeno	1.395	1,9047	-	-
beta-cariofileno	1.424	8,902	10,6697	2,0519
alfa-humuleno	1.458	2,4751	2,4592	-
alfa amorfeno	1.480	3,9618	2,8024	-
germacreno D	1.480	-	2,3061	-
beta-selineneo	1.491	3,3015	2,2246	-
valenceno	1.498	2,5473	5,1191	-
gama cadineno	1.518	4,2752	3,8533	-
delta-cadinene	1.527	1,4977	7,7188	4,4278
elemol	1.552	-	1,762	-
espatulenol	1.582	5,7756	10,4549	6,3865
óxido de cariofileno	1.588	16,046	-	17,5303
cariofilla-4(12),8(13)-dien-5-beta-ol	1.638	-	-	4,3548
beta-eudesmol	1.655	-	-	8,6054
Não identificados		17,2957	42,1935	56,6433
Total identificados		82,7043	57,8065	43,3567
Monoterpenos		15,6286	4,7631	1,5582
Sesquiterpenos		67,0757	53,0434	41,3048

### ***Ocotea minor***

Através dos dados espectrométricos e de cromatografia foram detectados 21 compostos presentes nos três óleos analisados. O percentual da composição química dos óleos essenciais determinado foi de cerca de 57,3154% nas folhas, 53,177% nos galhos e de 32% nas cascas. O rendimento obtido foi inferior a 0,12% em todas as partes analisadas.

Dos constituintes químicos detectados no óleo essencial das folhas, 57,3154% são sesquiterpenos com constituintes majoritários espatulenol (13,369%) e cariofileno (18,6866%). Nas cascas não foi verificada a presença de monoterpenos, sendo majoritário os componentes delta cadineno (7,4903%), beta cariofileno (4,0069%) e seu óxido (6,1291%). No óleo essencial dos galhos também se observou teores menores de monoterpenos (3,1007%) em relação aos sesquiterpenos (50,0763%), tendo como majoritários beta cariofileno (7,9131%), óxido de cariofileno (15,7363%) e ácido hexadecanóico (7,0932%).

O monoterpeno alfa pineno encontrados nos óleos de *O. ceanothifolia* e *O. leucoxyton* foi um dos constituintes majoritários encontrados no óleo de *Ocotea sp.* apresentando atividades antioxidante e citotóxica no trabalho realizado por Verbel e colaboradores (2010).

A composição química dos óleos das espécies de *Ocotea* são condizentes com as encontradas em outras espécies, onde há a presença do monoterpeno linalol e pineno, e sesquiterpenos, cariofileno e germacreno D (Araújo *et al.*, 2001; Chaverri & Ciccio, 2005; Menut *et al.*, 2002).

Tabela 14: Composição percentual dos óleos essenciais de *Ocotea minor* (%).

Substância	IR	folhas	galhos grossos	cascas
linalol	1.099	-	3,1007	-
alfa-cubebeno	1.353	-	1,7657	-
beta-cubebeno	1.394	1,5997	-	-
beta-cariofileno	1.424	18,6866	7,9131	4,0069
alfa-humuleno	1.458	-	1,2924	-
alfa amorfeno	1.480	3,1049	-	1,4635
germacreno D	1.480	4,2675	1,4866	-
beta-selineno	1.491	6,2358	-	1,9805
valenceno	1.498	-	-	2,6616
biciclogermacreno	1.501	8,5462	-	-
alfa-muuroleno	1.504	1,5057	1,6962	1,3163
gama cadineno	1.518	-	-	3,16
delta-cadineno	1.527	-	4,1822	7,4903
espatulenol	1.582	13,369	6,6317	2,1418
óxido de cariofileno	1.588	-	15,7363	6,1291
cariofilla-4(12),8(13)-dien-5-beta-ol	1.638	-	2,2789	-
beta-eudesmol	1.655	-	-	1,646
ácido hexadecanóico	1.961	-	7,0932	-
Não identificados		42,6846	46,823	68,004
Total identificados		57,3154	53,177	31,996
Monoterpenos		-	3,1007	
Sesquiterpenos		57,3154	50,0763	

Verificou-se, no entanto, algumas características químicas diferentes do que algumas *Ocoteas* como a ausência de fenilpropanóides como safrol, metileugenol e cinamaldeído e benzenóides encontradas em espécies como *Ocotea odorifera*, *Ocotea pretiosa* e *Ocotea sassafrás* (Chaverri & Cicció, 2005; Rizzini & Mors, 1976). Na varredura realizada por Takaku e colaboradores (2007) com óleo essencial de 10 espécies de *Ocoteas* da Costa Rica tais componentes também não foram encontrados.

### ***Rhodostemonodaphne***

A relação dos constituintes químicos dos óleos essenciais obtidos das folhas, galhos e cascas de *R.crenaticupula* e *R. recurva*, suas quantidades relativas e respectivos índices de retenção (IR) são apresentados na Tabela 15 e 16. Através dos dados espectrométricos e de cromatografia foram detectados presentes nos óleos dessas duas espécies 21 compostos em *R.crenaticupula* e 19 em *R. recurva*.

Tabela 15: Composição percentual dos óleos essenciais de *R.crenaticupula* (%).

Substância	IR	Folhas	Galhos grossos
linalol	1.099	-	8,2883
beta-elemeno	1.380	1,4275	1,2754
beta-cariofileno	1.424	7,8493	5,5616
alfa-humuleno	1.458	-	1,1002
alfa amorfeno	1.480	-	1,7939
beta-elemeno	1.380	1,4275	1,2754
alloaromadendreno	1.459	2,3445	-
alfa amorfeno	1.481	3,2255	-
beta-selineno	1.491	2,3505	-
epizonareno	1.500	4,2046	-
alfa-muuroleno	1.504	3,472	1,6747
beta-bisaboleno	1.505	3,5048	-
gama cadineno	1.518	2,1872	-
delta-cadineno	1.527	11,602	-
selina-3,7(11)-diene	1.542	2,1554	-
trans-cadina-1,4-dieno	1.547	1,1239	-
espatulenol	1.582	7,489	2,9086
óxido de cariofileno	1.588	-	-
alfa cadinol	1.650	2,597	-
beta-eudesmol	1.655	-	-
ácido hexadecanóico	1.961	-	15,3144
Não identificados		43,0393	60,8075
Total identificado		56,9607	39,1925
Monoterpenos		-	8,2883
Sesquiterpenos		56,9607	30,9042

A análise comparativa do óleo essencial de galhos e folhas da espécie *R.crenaticupula* apresentou certa variabilidade química nos seus constituintes com relação ao teor de seus componentes majoritários nos diferentes órgãos. Tal dado é verificado através da ausência de alguns constituintes em um óleo e ausência de tais constituintes no outro e em relação aos componentes majoritários. Nas folhas identificou-se a presença de 56,9607% de sesquiterpenos, tendo como constituinte majoritário beta-cariofileno (7,8493%), delta-cadineno (11,602%) e espatulenol (7,489%) enquanto nos galhos grossos a presença do monoterpeneo linalol (8,2883%) e do ácido hexadecanóico (15,3144%) diferenciou-os consideravelmente.

Tabela 16: Composição percentual dos óleos essenciais de *R.recurva*(%).

Substância	IR	folhas	galhos finos	galhos grossos	cascas
linalol	1.099	-	2,046	2,3946	3,5493
alfa-copaeno	1.379	3,4954	1,3816	1,3906	-
beta-cariofileno	1.424	3,9251	10,3763	10,5425	3,2757
alfa-humuleno	1.458	-	2,2159	-	-
alfa amorfeno	1.480	-	3,1993	3,2132	-
alloaromadendrene	1.443	2,4256	-	-	-
valencene	1.490	-	2,1764	-	-
beta-selineno	1.491	7,5608	-	2,203	1,5385
alfa-muuroleno	1.504	2,7344	3,7777	3,7133	-
gama cadineno	1.518	-	3,7926	1,2613	2,0052
delta-cadineno	1.527	-	7,2885	7,2277	4,0329
alfa cadineno	1.541	1,2963	1,3807	-	-
elemol	1.551	-	-	1,3522	-
espatulenol	1.582	6,138	13,4471	12,4262	4,2093
guaiol	1.608	-	-	-	1,4377
beta-eudesmol	1.655	-	2,5549	2,5882	30,1017
alfa eudesmol	1.657	-	-	-	9,156
beta costol	1.769	-	-	-	4,482
ácido hexadecanóico	1.961	-	1,9085	2,0098	5,6063
Não identificados		72,4244	44,4545	49,6774	30,6054
Total identificado		27,5756	55,5455	50,3226	69,3946
Monoterpenos		-	2,046	2,3946	3,5493
Sesquiterpenos		27,5756	53,4995	47,9280	65,8453

Em *R.recurva* a identificação dos galhos finos e grossos apresentaram similaridade nos constituintes e na composição percentual. Em todas as partes existiu a prevalência de sesquiterpenos, sendo os constituintes majoritários beta-selineno (7,5608%) e espatulenol(6,138%) nas folhas, beta-cariofileno (~10%) e espatulenol (~13%) nos galhos e beta-eudesmol (30,1017%) nas cascas.

Os resultados da análise dos óleos foram condizentes com o encontrado na análise de *R. parvifolia* (Alcântara *et al.*, 2010) e *R. kunthiara* (Palazzo, 2009) em que os constituintes majoritários foram cariofileno, beta selineno e germacreno D.

Através análise química do óleo essencial dos galhos de ambas as espécies de *Rhodostemonodaphnes* pode-se identificar apenas um monoterpeno, o linalol, sendo este, um dos constituintes majoritários nos galhos grossos de *R. crenaticupula*. O interesse desse monoterpeno na indústria devido a sua utilização como fixador de perfumes foi intenso na Amazônia, fazendo com que as espécies de *Aniba rosaeodora* que apresentam o teor de linalol de 74 a 96%, entrassem para a lista de espécies em risco de extinção. O linalol é um monoterpeno alcoólico terciário de cadeia aberta. Pode ser encontrado normalmente sob a forma de uma mistura de isômeros de posição da primeira ligação dupla. Possui um átomo de carbono assimétrico e, por isso, podem existir enantiômeros, apresentando-se dessa forma em várias espécies (Gottlieb *et al.*, 1965).

O cariofileno, um dos principais componentes majoritários dos óleos essenciais das espécies analisadas, pode ser empregado na medicina tradicional. Este metabólico volátil, influi em seu aroma e possui diversas atividades biológicas, tais como, anti-inflamatória, antialérgica, anestésica local, cardiovascular, antifúngica e anticarcinogênica (Fernandes *et al.* ,2007; Barbosa-Filho *et al.*, 2008)

Segundo Gottlieb & Salatno (1987) as famílias que possuem espécies ricas em óleos essenciais como Lauraceae e Myristicaceae são relativamente pobres em

espécies produtoras de alcalóides e ineficientes na variação de benziltetraidroisoquinolínicos. Em oposição, famílias que produzem uma variedade de alcalóides deste tipo, como Annonaceae e Monimiaceae são relativamente pobres em óleos essenciais. Tal dado é confirmado através dos rendimentos das espécies de *Ocotea* e *Endlicheria*, em que os rendimentos da fração alcaloídica e óleos essenciais são inversamente proporcionais. Dessa forma, verifica-se a importância da espectrometria de massa em que é possível analisar mesmo em concentrações muito baixas a presença de alcalóides.

A identificação dos óleos essenciais deste trabalho corrobora com as análises reportadas na literatura, em que a composição da maioria dos óleos essenciais de Lauraceae, há a predominância de sesquiterpenos, principalmente de hidrocarbonetos sesquiterpênicos (Gottlieb et al., 1987; Alcântara, 2009; Takaku et al., 2007).

## 5.5 Atividades química/biológicas

### 5.5.1 Atividade antioxidante

#### 5.5.1.1 Qualitativa

A avaliação preliminar qualitativa dos extratos por CCD em gel de sílica, revelada com solução metanólica do radical DPPH sugeriu a existência de substâncias com atividade antioxidante (Tabela 17), evidenciadas nas cromatoplasmas pela presença de manchas amarelas sobre fundo púrpura, resultantes da redução do radical DPPH (figuras 32 e 33).

Tabela 17: Resultado do teste qualitativo de atividade antioxidante qualitativa das folhas e dos galhos finos e do padrão quercetina.

Espécies	Folhas	Galhos grossos	Galhos finos	Cascas
<i>E. citriodora</i>	+	+	NR	NR
<i>E. sericea</i>	+	+	+	+
<i>O. ceanothifolia</i>	+	+	+	+
<i>O. leucoxyton</i>	+	+	+	NR
<i>O. minor</i>	+	+	+	+
<i>R. crenaticupula</i>	+	+	NR	NR
<i>R. recurva</i>	+	+	+	+

NR = não realizado

Todas as amostras revelaram atividade positiva no teste qualitativo.

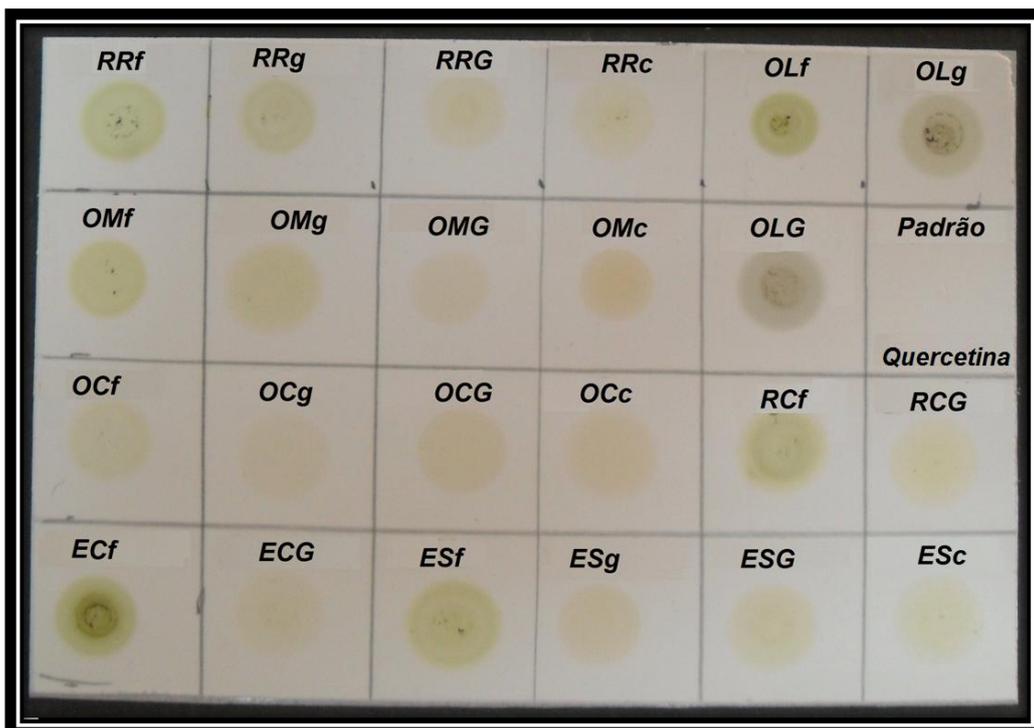


Figura 32: Placa cromatográfica com extrato das folhas e galhos das espécies de Lauraceae e do padrão quercetina antes a adição da solução de DPPH.

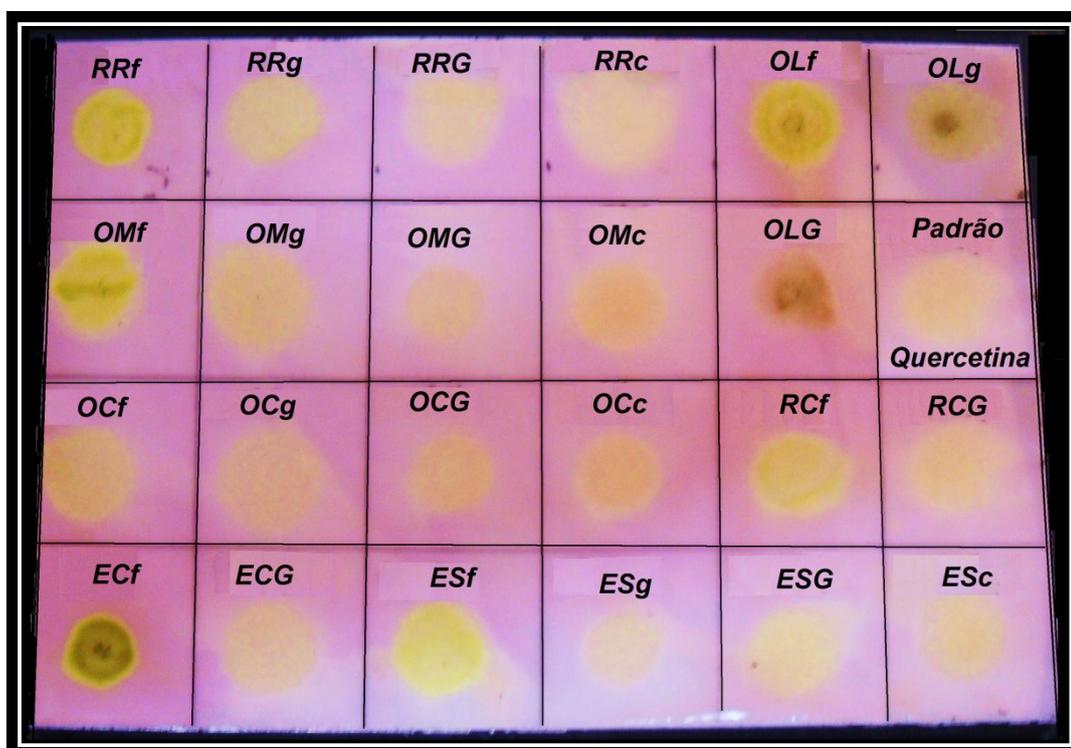


Figura 33: Placa cromatográfica com extrato das folhas e galhos das espécies de Lauraceae e do padrão quercetina após a adição da solução de DPPH.

### 5.5.1.2 Quantitativa

A quantidade de extrato das plantas testadas necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% ( $CE_{50}$ ) variou de  $161 \pm 1,00$  a  $7,31 \pm 0,32$  conforme a tabela 18. O extrato das folhas de *E. citriodora* apresentou o maior valor, enquanto os galhos de *O. minor* apresentou resultado comparável com o padrão quercetina ( $7,31 \pm 0,32$ ).

Todas as espécies apresentaram resultado positivo ao teste. O gênero *Ocotea* foi o mais ativo, utilizando a menor  $CE_{50}$  para a varredura do radical livre testado (tabela 18).

Tabela 18: Resultado do teste quantitativo de atividade sequestrante do radical livre DPPH das folhas e dos galhos finos e do padrão quercetina. Dados Quantitativos em  $\mu\text{g/mL}$ .

Espécies	Folhas	Galhos grossos	Galhos finos	Cascas
<i>E. citriodora</i>	$161,01 \pm 1,00$	$42,78 \pm 0,53$	NR	NR
<i>E. sericea</i>	$9,77 \pm 0,42$	$50,92 \pm 0,96$	$14,44 \pm 0,32$	$13,29 \pm 0,091$
<i>O. ceanothifolia</i>	$18,12 \pm 0,18$	$15,64 \pm 0,72$	$14,43 \pm 1,03$	$10,17 \pm 0,19$
<i>O. leucoxylon</i>	$52,51 \pm 1,42$	$50,88 \pm 0,64$	$82,61 \pm 2,43$	NR
<i>O. minor</i>	$8,21 \pm 0,66$	$9,08 \pm 0,51$	$7,31 \pm 0,32$	$7,57 \pm 0,026$
<i>R. crenaticupula</i>	$78,16 \pm 0,85$	$67,01 \pm 2,70$	NR	NR
<i>R. recurva</i>	$110,46 \pm 2,21$	$198,26 \pm 1,07$	$125,38 \pm 6,72$	$55,11 \pm 0,652$
Padrão Quercetina	$4,13 \pm 0,042 \mu\text{g/mL}$			

NR: não realizado

Observou-se uma correlação positiva entre o teste para a atividade sequestrante do radical livre e a presença de fenóis nos extratos através da prospecção fitoquímica, o que pode sugerir que a capacidade antioxidante dos extratos pode estar associada aos compostos fenólicos.

Verificou-se que os extratos com  $CE_{50}$  inferiores a concentração de  $55,11 \pm 0,652$  apresentaram a presença de compostos fenólicos em todos os extratos.

Os trabalhos realizados por Souza *et al.* (2007), Tiveron (2010) e Oliveira (2010) em testes quantitativos de fenóis totais, confirmam a correlação entre a ação seqüestradora de radicais livres e a presença de altos teores de compostos fenólicos, evidenciadas pelo método de Folin-Ciocalteu, expressos como Equivalentes de Ácido Gálico (EAG).

A atividade antioxidante de compostos fenólicos deve-se principalmente às suas propriedades redutoras e estrutura química. Estas características desempenham um papel importante na neutralização ou seqüestro de radicais livres, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os intermediários formados pela ação de antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis, devido a ressonância do anel aromático presente na estrutura dessas substâncias (Souza *et al.*, 2007; Bruice, 2006).

Os extratos que evidenciaram a presença de flavonóides apresentaram elevada capacidade de seqüestrar radicais livres, como pode ser verificado em *Ocotea ceanothifoila*, *Ocotea minor* e *Endlicheria sericea* (folhas).

Flavonóides possuem diferentes atividades antioxidantes decorrentes da habilidade para seqüestrarem espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, os quais estão diretamente relacionados a alguns critérios estruturais, tais como o número de anéis fenólicos e a presença da ligação dupla C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub> conjugada com a função 4-oxo no anel C.

Neste trabalho a atividade antioxidante de alguns extratos não esteve relacionada com a presença de flavonóides, já que espécies com capacidade de seqüestro de radicais livres não evidenciaram a presença dessa classe, o que sugere que há atividade antioxidante sendo originada de outras substâncias fenólicas que não são flavonóides.

A avaliação do seqüestro do DPPH é um teste largamente utilizado, tanto pela simplicidade e rapidez quanto pela reprodutibilidade. No trabalho realizado por Vargas (2008) analisando comparativamente diferentes técnicas para avaliação de atividades antioxidantes, utilizando ensaios químicos como da varredura DPPH, 2,2'-azinobis (3-etilfenil-tiazolina-6-sulfonato) (ABTS<sup>+</sup>), ânion radical superóxido (AVS), oxigênio singlete e caracterização de polifenóis, o teste com DPPH<sup>·</sup> foi o único que se correlacionou com todos os demais testes.

Contudo, verifica-se que a interação de uma espécie antioxidante com a molécula de DPPH depende, dentre outras fontes, da especificidade pela conformação estrutural do radical livre. A acessibilidade estérica é um fator determinante da reação, sendo as moléculas pequenas as que têm melhor acesso ao sítio do radical e podem apresentar uma maior atividade comparada às moléculas maiores (Alves *et al*, 2010). Por isso, determinados extratos que não apresentaram bom potencial antioxidante poderão em outros tipos de testes dessa mesma atividade, utilizando outras metodologias, mostrar bom perfil antioxidante (Boscolo *et al*, 2007).

Este ensaio biológico serve como ponto de partida para estudos posteriores como o isolamento, a purificação e a elucidação estrutural das substâncias que funcionam como antioxidantes, além de ajudar a inferir sobre um possível mecanismo de ação dessas substâncias, finalizando por testar a viabilidade terapêutica em antioxidantes para seu uso futuro.

### 5.5.3 Atividade inibidora da enzima acetilcolinesterase

A atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase foi verificada principalmente nos galhos das espécies de *Ocotea*. Os resultados podem ser visualizados na tabela 21. Os galhos finos e grossos das três espécies de *Ocotea* apresentaram resultado positivo no teste qualitativo de inibição da enzima acetilcolinesterase, assim como os galhos de *E. citriodora*. Nem uma parte (galhos, folhas e cascas) das *Rhodostemonodaphnes* apresentaram resultado positivo, assim como em *E. sericea* (galhos e folhas). A espécie de *O. minor* apresentou resultado positivo nas folhas e galhos (grossos e finos), enquanto as outras *Ocoteas* não apresentaram resultado positivo nas folhas. Em nenhuma das cascas testadas verificou-se resultado positivo no teste realizado.

Tabela 21 : Resultado do teste qualitativo de inibição da enzima AChE.

Espécies	Folhas	Galhos grossos	Galhos finos	Cascas
<i>E. citriodora</i>	-	+	NR	NR
<i>E. sericea</i>	-	-	-	-
<i>O. ceanothifolia</i>	-	+	+	-
<i>O. leucoxydon</i>	-	+	+	NR
<i>O. minor</i>	+	+	+	-
<i>R. crenaticupula</i>	-	-	NR	NR
<i>R. recurva</i>	-	-	-	-

Padrão eserine; NR = não realizado; (+) = positivo; (-) = negativo

O gênero *Ocotea* é conhecido por apresentar um número de espécies significativo contendo alcalóides, conforme foi confirmado com a prospecção fitoquímica realizada com os reagentes específicos. Através desses dados pode-se sugerir uma correlação entre a atividade testada e a presença de alcalóides. Tal dado é condizente com os trabalhos de varredura de Berkov *et al.* (2008) e Barbosa

Filho *et al.* (2006) que associam a ação de inibir a enzima acetilcolinesterase das espécies estudadas de diferentes famílias com a presença de alcalóides, tornando assim, o gênero *Ocotea* como fonte promissora para a utilização de métodos para quantificar esta atividade.

Verifica-se a partir dos testes qualitativos que os resultados dos ensaios antioxidantes empregados não apresentaram relação direta com os resultados anticolinesterásicos, conforme o trabalho de Giordani *et al.* (2008), com exceção da espécie *O. minor* que apresentou atividade relevante em ambos os ensaios. Entretanto, é necessária utilização de diferentes métodos de avaliação para uma definição desta atividade para este grupo químico.

## 5.5.2 Atividade citotóxica

### 5.5.2.1 Letalidade em *Artemia salina*

Os extratos em geral não demonstraram alta atividade citotóxica. Para os extratos testados, poucos apresentaram atividade citotóxica comparada com o padrão Lapachol que apresentou citotoxicidade de 9,830 µg/mL .

Os galhos finos e grossos não apresentaram alta atividade citotóxica em nenhum gênero enquanto as folhas essa atividade foi verificada em aproximadamente metade dos extratos. Na tabela 19 pode-se verificar o resultado para a atividade citotóxica de todos os extratos.

A ausência de citotoxicidade dos extratos no teste de letalidade contra *Artemia salina* é um indicador de que a planta pode ser bem tolerada frente ao sistema biológico. Entretanto, estudos mais detalhados para a avaliação da toxicidade dos extratos bioativos empregando-se outros modelos (*in vitro* e *in vivo*) se fazem necessários.

O extrato de *Enclicheria citriodora* demonstrou atividade alta em uma concentração comparável com a encontrada para o padrão. Através da prospecção realizada, a atividade citotóxica deste extrato não pôde ser relacionada com nenhuma das classes que foram analisadas, pois no teste os três grupos foram negativos nos extratos com elevada toxicidade.

Observou-se no desenvolvimento deste trabalho que o extrato etanólico de *Endlicheria citriodora* apresentou certa particularidade. O mesmo exibiu certa viscosidade mesmo com a completa evaporação do solvente e aroma forte e agradável que pode ser caracterizado pela presença de óleo essencial e/ou fixo. Nos trabalhos realizados por Silva *et al.* (2007 e 2008) verificou-se que os óleos voláteis extraídos de *Casearia sylvestris* e *Zanthoxylum*

*rhoifolium Lam* foram citotóxicos contra células tumorais, o que pode sugerir que a toxicidade deste extrato pode estar relacionado a possível presença deste metabólito secundário.

Tabela 19. Resultado da avaliação de toxicidade em *Artemia salina* µg/mL.

Espécies	Folhas	Galhos grossos	Galhos finos	Cascas
<i>E. citriodora</i>	8,301	100,002	NR	NR
<i>E. sericea</i>	90,260	100,011	229,766	82,381
<i>O. ceanothifolia</i>	134,640	261,600	262,121	134,287
<i>O. leucoxyton</i>	388,560	165,150	254,856	NR
<i>O. minor</i>	83,040	146,791	230,2186	243,004
<i>R. crenaticupula</i>	167,512	471,571	NR	NR
<i>R. recurva</i>	129,990	386,74	211,2857	243,857
Padrão Lapachol	9,830			

NR: não realizado

### 5.5.2.2 Citotóxico em células de linhagem tumoral

A atividade citotóxica de todas as amostras está apresentada na Tabela 20, com seus respectivos percentuais de inibição de crescimento das linhagens tumorais utilizadas HCT-8 (côlon - humano), MDA/MB-435 (mama - humano) e SF-295 (glioblastoma - humano) por extratos de Lauráceas.

Para avaliar o potencial citotóxico dos extratos testados, uma escala de intensidade foi utilizada. Amostras sem atividade (SA, inibição de crescimento celular igual a 0%), com pouca atividade (PA, inibição de crescimento celular variando de 1 a 50 %), com moderada atividade (MO, inibição de crescimento celular variando de 51 a 75 %) e com muita atividade (MA, inibição de crescimento celular variando de 75 a 100 %).

Todos os extratos apresentaram atividade inibitória de crescimento para as linhagens de células tumorais, variando para célula HCT-8 de 1,26% (galhos de *Rodostemonodaphne recurva*) a 74,30% (galhos de *Ocotea minor*), MDA-MB435 de

3,69 (folhas de *O. minor*) a 50,41% (casca de *O. ceanothifolia*) e SF-295 de 0,82 (galhos de *Endlicheira citriodora*) a 76,36% (*O. minor*). Tal dado pode ser relacionado à presença de alcalóides, já que na prospecção fitoquímica a maior parte dos extratos apresentaram resultado positivo para alcalóides, utilizando reveladores específicos. Tal afirmação é condizente com os trabalhos que correlacionam à capacidade de alguns extratos de inibição de linhagem de células tumorais com a presença de alcalóides (Pereira *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2007).

Dentre as amostras testadas, apenas três extratos apresentaram atividade moderada : *Ocotea cenothifolia* (cascas) 50,41% para MDA-MB435 e *Ocotea minor* (galhos) 74,30% para HCT-8 e 75,36% para SF-295. Os demais apresentaram pouca atividade, entre 1,26 e 46,39%.

Tabela 20 – Percentual de inibição do crescimento celular dos extratos em etanol de Lauraceae em três linhagens tumorais testadas na dose única de 50 µg/mL .

	Órgão vegetal	HCT – 8 (cólon – humano)	MDA/MB-435 (mama – humano)	SF-295 (glioblastona – humano)
<i>E. citriodora</i>	Folhas	28,96	7,23	15,31
	Galhos grossos	16,32	41,17	0,82
<i>E. sericeae</i>	Folhas	37,56	3,89	47,19
	Galhos grossos	30,15	17,91	24,30
	Galhos finos	21,80	46,39	7,73
<i>O. ceanothifolia</i>	Folhas	35,56	12,28	27,98
	Cascas	32,73	50,41	0,58
<i>O. leucoxylon</i>	Folhas	38,31	12,47	36,90
	Galhos grossos	29,04	9,55	11,88
	Galhos finos	17,75	38,72	24,59
<i>O. minor</i>	Folhas	29,64	3,69	4,36
	Galhos grossos	74,30	12,51	75,36
	Galhos finos	22,20	5,14	16,66
	Cascas	33,41	4,19	4,14
<i>R. recurva</i>	Folhas	18,34	5,20	5,41
	Galhos grossos	1,26	11,06	8,01
	Galhos finos	31,83	7,71	27,98
	Cascas	30,41	12,96	27,03
<i>R. crenaticupula</i>	Folhas	36,71	4,65	5,11
	Galhos grossos	11,94	33,44	10,12

0 %: sem atividade; 1 – 50 %: pouca atividade; 51 – 75 %: moderada atividade; 76 – 100 %: muita atividade.  
Legenda: SF-295 = glioblastoma humano, HCT-8 = cólon humano, MDAMB-435 = mama humano.

Verificou-se que o extrato com a maior atividade citotóxica para células SF-295 (glioblastoma – humano) e HCT – 8 (cólon – humano) apresentou uma elevada capacidade de seqüestrar o radical livre DPPH, assim como o extrato com menor atividade antioxidante foi um dos extratos que na avaliação para capacidade de inibir o crescimento de linhagem de células tumorais apresentou baixas percentagens de inibição. Tal resultado corrobora com os trabalhos que indicam os radicais livres como fatores contribuintes com a patologia testada.

## 6 CONCLUSÕES

- Este estudo contribuiu para o conhecimento do perfil químico das espécies *E. citriodora*, *E. sericea*, *O. minor*, *O. ceanothifolia*, *O. leucoxyton*, *R. recurva* e *R. crenaticupula* através da varredura dos extratos brutos auxiliando no direcionamento das investigações químicas sobre a composição dos extratos bem como contribuindo para a triagem de gêneros e das espécies promissoras.
- Das espécies estudadas, as espécies do gênero *Ocotea* apresentaram o melhor perfil em relação a presença de alcalóides e compostos fenólicos, uma vez que em todas os órgãos vegetais dessas planta foi verificado tais substâncias;
- Analisou-se o perfil alcaloídico em espécies com baixa concentração de alcalóides por meio de espectrometria de massa. Dessa forma, torna-se necessária a utilização de diversas ferramentas para concluir se uma espécie contém ou não uma determinada classe de substância;
- Confirmou-se a pronunciada presença de alcalóides no gênero *Ocotea* e em baixas concentrações nas espécies de *Endlicheria* e *Rhodostemonodaphne*;
- Na espectrometria de massa os picos  $m/z$  de 300 e 330 estiveram presentes na maioria das frações e podem corresponder a alcalóides do tipo benzilisoquinolínicos e aporfínicos;
- Os rendimentos dos óleos essenciais variaram de 0,02% a 4,29%, em que as espécies do gênero *Rhodostemonodaphne* apresentaram os menores rendimentos em todas as partes (folhas, galhos e cascas) apresentando como constituinte majoritário o cariofileno e seu óxido;
- Os óleos essenciais das espécies de *Endlicheria* apresentaram os maiores rendimentos. A identificação dos constituintes por cromatografia gasosa e RMN<sup>1</sup>H identificou a presença de geranato de metila nos óleos de galhos e folhas de *Endlicheria citriodora* com percentagem superior a 93% em ambas as partes;

- Nas atividades biológicas a espécie *Ocotea minor* apresentou resultado positivo na inibição qualitativa para enzima acetilcolinesterase e alta capacidade sequestrante do radical livre DPPH com  $CE_{50}$  de  $7,31 \pm 0,32 \mu\text{g/mL}$  comparado com o padrão quercetina de  $CE_{50}$   $4,13 \pm 0,042 \mu\text{g/mL}$ ;
- Os galhos das três espécies de *Ocotea* apresentaram capacidade de inibir qualitativamente a ação da enzima acetilcolinesterase, confirmando assim, dados da literatura de que espécies ricas em alcalóides são fontes potenciais na busca de inibidores desta enzima;
- As espécies dos três gêneros não apresentaram alta citotoxicidade em nenhuma das linhagens de células tumorais testadas.
- Este estudo abre perspectivas para que novas investigações envolvendo a família Lauraceae sejam realizados, notadamente em relação a definitiva elucidação estrutural dos principais constituintes dos extratos e óleos essenciais proveniente de diferentes partes da planta e no estabelecimento das suas propriedades biológicas.
- Considerando que substâncias naturais podem ser responsáveis pelo efeito de proteção contra os riscos de muitos processos patológicos, os resultados descritos neste trabalho estimulam a continuidade dos estudos para avaliar a ação antioxidante de substâncias isoladas de espécies *O. ceanothifolia* e *Ocotea minor* e atividades biológicas para o óleo de *E. citriodora*.

## 7 REFERÊNCIAS

- Adams, R. P. Identification of essential oil components by gás chromatography/quadrupole mass spectroscopy, Allured, Card Stream IL, 2007.
- Aguiar, L. M. G. *et al.* Cecilin, a 1-benzyl- $\beta$ -carboline from *Aniba santaladora*. *Phytochemistry*, n. 19, p. 1859-1860, 1980.
- Alcântara, J. M. Bioprospecção de espécies amazônicas da família Lauraceae com potencial aromático e medicinal. Manaus, AM: UFAM, Pp.139, 2009.
- Alcantara, J. M.; Yamaguchi, K. K. de L.; Silva, J. R. de A.; Veiga Junior, V. F.; Composição química e atividade biológica dos óleos essenciais das folhas e caules de *Rhodostemonodaphne parvifolia* Madriñán (Lauraceae). *Acta Amazônica*, Vol.40, No.3, pp. 567-571, 2010.
- Almeida, M. R.; Lima, J. A.; Santos, N. P.; Pinto, A. C.; Pereirina: o primeiro alcaloide isolado no Brasil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, Vol. 19. No 4, Pp. 942-952 , 2009.
- Almeida, V. L.; Leitão, L. C. B.; Montanari, C. A.; Donnici, C. L.; Lopes, M. T. P.; Câncer e agentes neoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. *Química Nova*, Vol. 28, No. 01, Pp. 118-129, 2005.
- 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*, Vol. 33, No.10, Pp. 2202-2210, 2010.
- Anderson, D.; Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. *Mutation Research*, Vol. 350, No.01, p.103-108, 1996.
- Andrade, L. A. F.; Alguns aspectos neurobiológicos do envelhecimento cerebral. *Revista Ciência e Cultura* , Vol. 40, Pp. 665-672, 1988.
- Antunes, R.M.P.; Lima, E.O.; Pereira, M. S.V.; Camara, C.A.; Arruda, T.A.; Catão, R.M.R.; Barbosa, T.P.; Nunes, X.P.; Dias, C.S.; Silva, T.M.S.; Atividade antimicrobiana " in vitro" e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de

fitoconstituintes e produtos sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes. Revista Brasileira de Farmacognosia, Vol.16. No. 04 , Pp.517-524, 2006.

Araújo Jr, C. P.; Composição química e atividade biológica dos óleos essenciais de frutas cítricas. Dissertação de mestrado da Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2009.

Araújo, A. J.; Lordello, A. L. L.; Maia, B. H. L. N. S.; Análise comparativa dos óleos essenciais de folhas e galhos de *Ocotea puberula*. Revista visão acadêmica. Vol. 02, No. 02, Pp. 81-84, 2001.

Baitello, J. B.; Novas espécies de Lauraceae para a Flora Brasileira. Acta Botânica, Vol. 15, No. 03, Pp. 149-223, 2001.

Ballabeni, V.; Tognolini, M.; Giorgio, C.; Bertoni, S.; Bruni, R.; Barocelli, E.; *Ocotea quixos* Lam. essential oil: In vitro and in vivo investigation on its anti-inflammatory properties Fitoterapia, Vol. 81, No 4, Pp 289-295, 2010.

Baratta, M.T.; Dorman, H.J.D.; Deans, S.G.; Biondi, D.M.; Ruberto,G; Chemical composition, antimicrobial and antioxidative activity of laurel, sage, rosemary, oregano and coriander essential oils. Journal of Essencial Oil Research, Vol. 10, No. 06, Pp. 618-627, 1998.

Barbosa Filho, J. M. ; *Ocotea duckei*: excepcional source of yanganabin and other furofuran lignans. Anais da Academia Brasileira de Ciências, v. 71, n. 2, p. 231-238, 1999.

Barbosa Filho, J. M.; Medeiros, K. C. P.; Diniz, M. F.; Batista, L. M., Athayde-Filho, P.F.; Silva, M. S.; da-Cunha, E. V.L.; Almeida, J. R.G. S.; Quintans-Júnior, L. J.; Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. Revista Brasileira de Farmacognosia, Vol.16, No. 02, Pp. 258-285, 2006.

Barbosa-Filho, J. M.; Lignanás, neolignanás 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.

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*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, Vol. 18, No. 01, Pp.37-41, 2008.

Barnes, J. D.; Thomas, M. J. K.; Mendham, J.; Denney, R. C.; *Vogel Análise Química Quantitativa*. Editora LTC, 6ª edição, 2002.

Barreiros, A. L. B. S.; David, J. M.; Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*, Vol.29, No.1, Pp. 113-123, 2006.

Barroso, G. M.; Guimarães, E. F.; Ichaso, C. L. F.; Costa, C. G.; Peixoto, A. L.; *Sistemática de Angiosperma do Brasil*. Vol. 01, 2ª Edição, EDUSP, Pp. 255, São Paulo, 2002.

Behling, E. B.; Sendão, M. C.; Francescato, H. D. C; Antunes, L M. G., Bianchi; Flavonóide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. *Alimentos Nutrição*, Araraquara, Vol. 15, No. 03, Pp. 285-292, 2004.

Berkov, S.; Batisda, J.; Nikova, M.; Viladomat, F.; Codina, C.; Rapid TLC/CG-MS Identification of Acetylcholinesterase inhibitors in alkaloid extracts. *Phytochemical analysis*. Vol. 19, Pp. 411-419, 2008.

Berridge, M. V.; Tan, A. S.; McCoy, K. D.; Wang, R.; The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays that Use Tetrazolium Salts. *Biochemica*, Vol. 04, Pp. 14-19, 1996.

Bianchi, M. L. P.; Antunes, L. M. G.; Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Revista de Nutrição*, Vol. 12. No. 02, Pp. 123-130, 1999.

Borek, C.; Antioxidants and câncer. *Science & Medicine*, Vol. 04, No. 06, Pp. 52-62, 1997.

Boscolo. O. H.; Mendonça-Filho, R.F.W.; Menezes, F.S.; Senna-Valle, L.; Potencial antioxidante de algumas plantas de restinga citadas como medicinais. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, Vol.09, No 01, Pp.8-12, 2007.

Botelho, P. S.; Moraes, M. M.; Neves, I. A.; Neves, R. C. S.; Ribeiro, N. C.; Born, F. S.; Camara, C. A. G.; Composição química e ação repelente do óleo essencial *Ocotea gardneri* (meisn) mez. sobre o ácaro rajado *tetranychus urticae* koch. IX Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão (JEPEX). VI semana Nacional de Ciências e Tecnologia, UFRPE, 2009.

Brandão, H. N.; David, J. P.; Couto, R. D.; Nascimento, J. A. P.; David, J. M.; Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. *Química Nova*, Vol. 33, No. 06, Pp. 1359-1369.

Braz Filho, R.; Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. *Química Nova*, Vol. 33, No. 01, Pp. 229-239, 2010.

Bresolin, T. M. B.; Cechinel – Filho, V.; Ciências Farmacêuticas: Contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e Medicamentos. Editora Univali, 1º edição, Pp. 29, 2003.

Bruice, P. Y.; Química Orgânica, Vol. 01, 4ª edição, Pearson Prentice Hall, 2006.

Bruni, R.; Medici, A.; Lista, A.; Fantini, C.; Muzzoli, M.; Dehesa, M.; Romagnoli, C.; Sacchetti, G.; Chemical Composition and Biological Activities of Ishpingo Essential Oil, a Traditional Ecuadorian Spice from *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. (Lauraceae) flower calices. *Food chemistry*. Vol. 85, No. 03, Pp. 413-421, 2003.

Calow, P.; Marine and estuarine invertebrate toxicity tests. In: Hoffman, D. *et al.* Handbook in cytotoxicology. Oxford: Blackwell Scientific Publication, Vol. 01, Pp. 1-5, 1993.

Carballo, J.L.; Hernández-Inda, Z.L.; Pérez, P.; García-Grávalos, M.D.; A comparison between two brine shrimp assays to detect *in vitro* cytotoxicity in marine natural products. *BMC Biotechnology*, Vol. 2, Pp.1-5, 2002.

Castro-Faria-Neto, H.C.; Bozza, P.T.; Cruz, H.N.; Silva, C.L.M.; Violante, F.A.; Barbosa-Filho, J.M.; Thomas, G.; Martins, M.A.; Tibiriçá, E.V.; Noel, F.; Cordeiro, R.S.B.; Yangambin: a new naturally occurring platelet activating factor receptor antagonist: binding and in vitro functional studies. *Planta Medica*, Vol.61, Pp. 101-105, 1995.

Cavalcanti, M. F.; Oliveira, M. C. F.; Velandia, J. R.; Echevarria, A.; Síntese de 1,3,5-triazinas substituídas e avaliação da toxicidade frente a *Artemia Salina* leach. Química Nova, Vol.23, No. 01, Pp. 20, 2000.

Cechinel Filho,V.; Bresolin, T. M. B.; Ciências farmacêuticas: desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos. Editora Univali, Pp. 239, 2003.

Chanderbali, A. S.; Lauraceae: Endlicheria. Flora Neotropical, Monografia 91, New York , New York Botanical Garden, 2004.

Chang, J.; Medicinal Herbs: Drugs or dietary supplements?. Biochemical Pharmacology. Vol. 59, No. 3, Pp.211-219, 2000.

Chaverri, C.; Cicció, J. F.; Essential oil of trees of the genus *Ocotea* Lauraceae) in Costa Rica. Revista biologia Tropical. Vol. 53, No. 3, Pp. 431-436, 2005.

Chaverri, C.; Cicció, J.F.; Volatile constituents of the oils from *Povedadaphne quadriporata* (Lauraceae) from “Alberto M. Brenes” biological preserve, Costa Rica. Química Nova, Vol. 31, No. 03, Pp. 605-609, 2008.

Chavez, J. P.; Gottlieb, O. R.; Yoshida, M. . 10-Desmethyl-1-methyleudesmanes from *Ocotea corymbosa*. Phytochemistry, Vol. 39, No. 04, Pp. 849-852, **1995**.

Cheng, S.; Liu, J.; Tsai, K.; Chen, W.; Chang, S.; Chemical composition and mosquito larvicidal activity of essential oils from leaves of different *Cinnamomum osmophloeum* provenances. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol. 52, No. 22, Pp. 4395-4400, 2004.

Cordell, G. A. Quirn-Beattie, M. L.; Farnsworth, N. R. The potential of alkaloids in drug discovery. Phytotherapy Research, Vol. 15, Pp. 183-205, 2001.

Cragg, G. M.; Newman, D.J.; Biodiversidade: Um componente essencial na descoberta de fármacos. In: Yunes, R. A.; Cechinel Filho, V.; Química de produtos Naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia. 2ª edição. Editora Univali, Pp.58-62, 2009.

Cunha, A. P.; Salgueiro, L.; Roque, O. R.; Farmacognosia e fitoquímica, Capítulo 22, 1º edição, Fundação Calouste Gulenkian, 2005.

Degani, A. L. G.; Cass, Q. B.; Vieira, P. C.; Cromatografia: um breve ensaio. Química Nova na Escola, No. 07, Pp. 21-25, 1998.

Dewick, P. M. Medicinal natural product: a biosynthetic approach. 2<sup>o</sup> edição, John Wiley & Sons, 2002.

Di Carlo, G.; Mascolo, N.; Izzo, A. A.; Capasso, F. ; Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. Life Science, Tucson, Vol. 65, No. 4, Pp. 337-353, 1999.

Dias, B. F. S.; A implementação da convenção sobre diversidade biológica no Brasil: desafios e oportunidades. Campinas,; André Tosello, Pp. 1, 1996.

Dröge, W.; Free radicals in the physiological control of cell function. Physiological Reviews, 2002.

Duarte, J. A.; Appell, H. J.; Carvalho, F., Bastos, M. L.; Soares, J. M.; Endothelium-derived oxidative stress may contribute to exercise-induced muscle damage. Vol.14, No.08, Pp.440-443, 1993.

Duarte, M. C. T.; Atividade Antimicrobiana de Plantas Medicinais e Aromáticas Utilizadas no Brasil. Multiciência: Construindo uma história sobre os Produtos Naturais, Universidade Estadual de Campinas, No. 07, 2006.

Ellman, G.L. *et al.*; A new and rapid colorimetric determination of Acetylcholinesterase activity. Biochemical Pharmacology, Vol. 07, Pp. 88-95, 1961.

Elsayed, N. M.; Antioxidant mobilization in response to oxidative stress: a dynamic environmental–nutritional interaction. Nutrition, Vol. 17, No. 10, 2001.

Fernandes, E.S.; Passos, G.F.; Medeiros, R.; Cunha, F.M.; Ferreira, J.; Campos, M.M.; Pianowski, L.F.; Calixto, J.B. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenácea*. Journal of Ethnopharmacology, Vol.110, Pp.323–333, 2007.

Ferraz, A.; Screening for antiproliferative activity of six southern Brazilian species of *Hypericum*. Phytochemistry. Vol. 12, Pp. 112-115, 2005.

Finney, D. L.; Em Probit Analysis. 3<sup>o</sup> edição, Editora Cambridge University Press: Cambridge, Pp. 76-80, 1971.

Fleschin, S.; Fleschin, M.; Nita, S.; Pavel, E.; Magearu, V.; Free radicals ediated protein oxidation in biochemistry. Roum Biotechnology Letters, No. 06, Vol. 05, Pp. 479-495, 2000.

Fournet, A.; Ferreira, M. E. A. R. A.; Guy, I.; Guinaudeau, H.; Heinzen, H.; Phytochemical and antiprotozoal activity of *Ocotea lancifolia* Fitoterapia, Vol. 78, No. 5, Pp. 382-384, 2007.

Francis, P. T.; Palmer, A. M.; Snape, M.; Wilcov, G. K.; The cholinergic hypothesis of Alzeimer's disease: a review of progress. Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry. Vol. 66, No. 02, Pp. 137-147, 1999.

Giordani, R. B.; Pagliosa, L. B.; Henriques, A. T.; Zuanazzi, J.A.; Investigaçãõ do potencial antioxidante e anticolinesterásico de *Hippeastrum* (Amaryllidaceae). Química Nova, Vol. 31, No. 8, Pp 2042-2046, 2008.

Gottlieb, O. R. & Yoshida, M.; Neolignanas antitumorais. Ciência e Cultura, Vol. 32, Pp. 93-100, 1978.

Gottlieb, O. R.; Fineberg, M.; Guimarães, M. L.; Magalhães, M. T.; Maravalhas, M.; Associação Brasileira de Pesquisas sobre Plantas Aromáticas e Óleos Essenciais. Vol. 11, No. 1, 1965.

Gottlieb, O. R.; Kaplan, M. A. C.; Borin, M. R. Biodiversidade, um enfoque químico-biológico, Rio de Janeiro, Editora: UFRJ, 1996.

Gottlieb, O. R.; Salatino, A.; Função e evolução e evolução de óleos essenciais e de suas estruturas secretoras. Ciência e Cultura. Vol. 39, Pp. 707-715, 1987.

Gottlieb, O. R.; Yoshida, M.; Lignóides, com atenção especiala química das neolignanas. Química Nova, Vol. 07, No. 4, Pp. 250-254, 1984.

Gottlieb, O.R.; Koketzu, M.; Magalhães, M.T.; Maia, J.G.S.; Mendes, P.H.; Rocha, A. I.; Silva, M.L.; Wilberg, V.C; Amazonian Essential Oils VII. Acta Amazonica, Vol.11, No.1, Pp. 143-148, 1981.

Gôuvea, C. M. C. P.; Oxidações biológicas e atividade vegetal. In: Fitoterápicos anti-inflamatórios: aspectos químicos e aplicações terapêuticas. Carvalho, J. C. T. coord. Ribeirão Preto. Editora Tecmed, Pp. 101-124, 2004.

Guaratini, T.; Medeiros, M. H. G.; Colepicolo, P.; antioxidantes na manutenção do equilíbrio redox cutâneo: uso e avaliação de sua eficácia. Química Nova, Vol. 30, No. 01, Pp. 206-213, 2007

Guinaudeau, H.; Aporphinoid alkaloids III, Journal of Natural Products, Vol. 46, No. 6, Pp. 761-835, 1983.

Guinaudeau, H.; Leboeuf, M.; Cavé, A.; Aporphine Alkaloids. V. Journal of Natural Products, Vol.57, No.08 , Pp. 1033-1135, 1994.

Guinaudeau, H.; Leboeuf, M.; Cavé, A.; Aporphinoid alkaloids II, Journal of Natural Products, Vol. 42, No. 4, Pp. 761-835, 1979.

Halliwell, B.; Antioxidants in Human Health and Disease. Annual Review of Nutrition Vol. 16, Pp. 33-50, 1996.

Halliwell, B.; Free radicals and antioxidants: a personal view. Nutrition Reviews, Vol.52, No.8, Pp.253-265, 1994.

Halliwell, B.; The antioxidant paradox, The Lancet, Vol.355, No. 01, Pp. 1179 - 1180, 2000.

Henriques, A. T.; Limberger, R. P.; Kerber, V. A.; Moreno, P.R.H.; Alcalóides: Generalidades e aspectos básicos. In In: C.M.O. Simões *et al.* (eds.). Farmacognosia da planta ao medicamento. Universidade UFRGS/ Ed. da UFSC, Porto Alegre, capítulo 29, Florianópolis, 2004.

Heo, H. J.; Hang, S. C.; Cho, H. Y.; Hong, B.; Kim, H. K.; Kim, E. Ki.; Shim, D. H.; Ameliorating effect of gardenia jasminoides extract on Amyloid beta peptide – induced Neuronal cell deficit. Molecules and cells. Vol. 24, No. 1, Pp. 113-118, 2002.

Hostettman, K.; Queiroz, E. F.; Vieira, P.C.; Princípios ativos de plantas superiores. Editora UFSCar, São Carlos, 2003.

<http://www.prossiga.br/ottogottlieb/> Enigmas das Lauraceae Programa de Informação para Gestão de Ciência, Tecnologia e Inovação do Instituto Brasileiro de Informação em Ciência e Tecnologia. Pesquisado em: 20 de julho de 2010

<http://www.who.int/research/es/> acessado em 15 de fevereiro de 2011.

Ingkaninan, K.; Hazekamp, A.; Hak, A.C.; Balconi, S.; Verpoort, R.; High performance liquid chromatography with online coupled UV-mass spectrophotometric-biochemical detection for identification of acetyl cholinesterase inhibitors from natural products. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. Vol. 872, Pp. 61-73, 2000.

Jia, Q.; Qiu, Z.; Nissanka, A.; Farow, T. M.; US Patent Application, Kind Code, serial nº 741215/series code 09, 2000.

Juergens, U.R.; Stober, M.; Vetter, H.; Inhibition of cytokine production and arachidonic acid metabolism by eucalyptol (1,8-cineole) in human blood monocytes in vitro. *European Journal of Medical Research*, Vol. 03, Pp.407-412, 1998.

Keynes R.G.; Garthwaite J.; Nitric Oxide and its Role in Ischaemic Brain Injury. *Current Molecular Medicine*, Vol. 04, No.02, Pp. 179-191, 2004.

Kurtz, B. C.; Composição florística e estrutura do estrato arbóreo de um trecho de Mata Atlântica situado na Estação Ecológica Estadual de Paraíso, Município de Cachoeiras de Macacu, Rio de Janeiro, Brasil. *Rodriguésia* 51(78-79): Pp. 69-112, 2000.

Lanças, F. M.; Cromatografia em Fase Gasosa. 1º edição. Acta Eventos, Vol. 01, São Carlos, 1993.

Lima, I. O.; Oliveira, R. A. G.; Lima, E. O. L.; Farias, N. M. P.; Souza, E. L.; Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. Vol. 16, No. 02, Pp. 197-201, 2006.

Lima, M. P.; Silva, T. M. D.; Dilva, J. D.; Zoghbi, M. G.; Andrade, E. H.; Essential oil composition of leaf and fine stem of *Aniba canelilla* (Kunth) Mez from Manaus, Brazil. *Acta Amazônica*. Vol. 34, No.02,Pp. 329 – 330, 2004.

López, S.; Bastida, J.; Viladomat, F.; Codina, C.; Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae alkaloids and Narcissus extracts. *Life Sciences*. Vol. 71, No. 21, Pp. 2521-2529, 2002.

Lorenzi, H.; *Árvores Brasileiras – Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil*. Vol.2, 2ª edição, Editora Plantarum, Nova Odessa – SP, Pp. 368, 2002.

Ma, W. W.; Anderson, J. E.; McLaughlin, J.L.; Bioactive Benzyl Benzoates from the Roots of *Endlicheria Dysodantha*. *Pharmaceutical Biology*, Vol. 29, No. 3, Pp. 237 – 239, 1991.

Maciel, M. A. M.; Pinto, A. C.; Veiga Jr, V. F.; Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova*, Vol. 25, No. 3, Pp. 429-438, 2002.

Madriñán, S.; *Rhodostemonodaphne* (Lauraceae). *Flora neotropical*. Monografia 92, New York . New York Botanical Garden, 2004.

Marques, C. A. Importância Econômica da Família Lauraceae. *Floresta e Ambiente*, Universidade Federal de Viçosa, Vol. 8, No.1, Jan./Dez., Pp.195-206, 2001.

McLaughlin, J.L.; Saizarbitorri, T.C.; Anderson, J.E.; Tres bioensayos simples para químicos de productos naturales. *Revista Sociedade Venezolana de Química* Vol. 08, Pp.13-18, 1995.

Meirelles, U. M. F. *et al.* Algumas ações biológicas do 1-(p-metoxibenzil)-6,7-metilenodioxisoquinolina. *Acta Amazonica*, v. 7, n. 1, p. 39-40, 1979.

Mensor, L. L.; Screening of Brazilian plant extract for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytotherapy Research*, Vol. 16, Pp. 127, 2001.

Menut, C.; Bessiére, J. M.; Hassani, M. S.; Buchbauer, G.; Schopper, B.; Chemical and biological studies of *Ocotea comoriensis* bark essential oil. *Flavour and Fragrance journal*. Vol. 17, Pp. 459-461, 2002.

Meyer, B. N.; Ferrigni, N. R.; Putnam, J. E.; Jacobsen, L. B., Nichols, B.; McLaughlin, J. L.; *Journal of Medicinal Plant Research*, vol. 45, Pp. **31-34, 1982.**

Miyazawa, M.; Tougo, H.; Ishihara, M.; Inhibition of acetylcholinesterase activity by essential oil from *Citrus paradise*. Natural Product Letters Vol. 15, No. 03, Pp.205-210, 2001.

Moellering Jr, R.C.; Novos desafios no campo das doenças infecciosas. In: Patógenos emergentes nas doenças infecciosas: Relatório Especial Hospital Práctice. Euromédice. Editora Médicas, Pp.5-7, 2000.

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 , Vol. 62, No. 1, Pp. 57-61, 1998.

Mossman, T.; Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of Immunological Methods. Vol. 65, No.02, Pp. 55-63, 1983.

Nodori, R.O.; Guerra, M.P.; Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: C.M.O. Simões *et al.* (eds.). Farmacognosia da planta ao medicamento. Universidade UFRGS/ Ed. da UFSC, 5<sup>o</sup> edição rev., Porto Alegre, capítulo 16, Florianópolis, 2004.

Nordberg, J.; Arnér, S.J.; Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. Free Radical Biology and Medicine, Vol. 31, Pp.1287-1312, 2001.

Nunes, X. P.; Mesquita, R. F.; Silva, D. A.; Lira, D. P.; Costa, V. C. O.; Silva, M.V. B.; Xavier, A. L.; Diniz, M.F. .F. M.; Agra, M. F.; Constituintes químicos, avaliação das atividades citotóxica e antioxidante de *Mimosa paraibana* Barneby (Mimosaceae). Revista Brasileira de Farmacognosia. Vol. 18 (Supl.), Pp. 718-723, 2008.

Oliveira, P. A.; Estudo fitoquímico e atividades biológicas de extratos de *Goupia glabra* Aublet (cupiúba). Dissertação do Mestrado em Química, Universidade Federal do Amazonas, Pp. 65-68, 2010.

Palazzo, M. C.; Agius, B. R.; Wright, B. S.; Haber, W. A.; Moriarity, D. M.; Setzer, W. N.; Chemical Compositions and Cytotoxic Activities of Leaf Essential Oils of Four

Lauraceae Tree Species from Monteverde, Costa Rica. Records Natural Products, Vol. 03, No.01, Pp.32-37,2009.

Pereira, P. S.; França, S. C.; Oliveira, P. V. A.; Breves, C. M. S.; Pereira, S. I. V.; Sampaio, S. V.; Nomizo, A.; Dias, A. D.; Chemical constituents from *Tabernaemontana catharinensis* root bark: a brief NMR review of indole alkaloids and in vitro cytotoxicity. Química Nova, Vol. 31, No. 01, Pp. 20-24, 2008.

Perry, N. S. L.; Bollen, C.; Perry, E. K.; Ballard, C.; Salvia for dementia therapy review of pharmacological activity and pilot tolerability clinical trial. Pharmacology biochemistry and behavior. Vol. 75, No. 3, Pp. 651-659, 2003.

Phillipson, G. W.; Anderson, A. C.; Journal Ethnopharmacol. Vol. 25, Pp 61, 1998. acetylcholinesterase activity by essential oils of *Mentha* species. Journal of Agriculture and Food Chemistry , Vol. 46, Pp 3431-3434, 1998.

Pinto, A. C.; Silva, D. H. S.; Bolzani, V. S.; Lopes, N. P.; Epifanio, R. A.; Produtos Naturais: Atualidade, desafios e perspectivas. Química Nova, Vol. 25, Supl. 01, Pp. 45-61, 2002.

Quik, M.; Jeyarasasingam, G.; Nicotine receptor and Parkinson's disease. European Journal of Parkinson's disease. Vol. 393, Vol. 1-3, Pp. 223-230, 1999.

Quinet, A.; Andreato, R. H. P.; Lauraceae Jussieu na Reserva Ecológica de Macaé de Cima, município de Nova Friburgo, Rio de Janeiro, Brasil. Rodriguésia, vol.53, No.82, Pp.59–121, Rio de Janeiro, 2002.

Rahalison, L.; Hamburger, M.; Monod, M.; Frenk, E.; Hostettmann, K.; Antifungal tests in phytochemical investigations comparison of bioautographic methods using phytopatogenic and human pathogenic fungi. Planta Médica Vol.60, Pp. 41-44, 1994.

Rahimi-Nasrabadi, M.; Gholivand, M. B.; Batooli, H.; Chemical composition of the essential oil from leaves and flowering aerial parts of *Haplophyllum robustum* (Rutaceae). Journal of nanomaterials and biostructures. Vol. 4, No. 4, Pp. 819-822, 2009.

Rajendran, V.; Shong, Suo-Bao, Saxena, A.; Doctor, B. P.; Kozikowski, A. P.; Synthesis of a hybrid analog of the acetylcholinesterase inhibitor huperzine A and huperzine B. *Tetrahedron Letters*, Vol. 42, No. 01, Pp. 5359-5361, 2001.

Rhee, I. K.; Van der Meent, M.; Ingkaninan, K.; Verpoorte, R.; Screening for acetylcholinesterase inhibitors from from Amararyllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. *Journal of chromatography A*. Vol. 915, No.1, Pp. 217-223, 2001.

Ribeiro, J. E. L. S.; Hopkins, M. J. G.; Vicentini, A.; Sothers, C. A.; Costa, M. A. da S.; Brito, J. M.; Martins, L. H., P.; Lohmann, L.G.; Assunção, P. A. C. L.; Pereira, E. C.; Silva, C. F.; Mesquita, M. R.; Próscópio, L. C.; Flora da Reserva Ducke: Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central. Pp. 151, Manaus, INPA, 1999.

Ribeiro, R.A.; Carmo, L.G.; Vladimorova, I.; Jurkiewicz, N.H.; Jurkiewicz, A.; Nantenine blocks muscle contraction and  $Ca^{2+}$  transient induced by noradrenaline and  $K^+$  in rat vas deferens. *European Journal of Pharmacology*, Vol. 470, No. 01, Pp. 37-43, 2003.

Rizzini, C. T.; Mors, W. B.; Botânica Econômica Brasileira; Editora EDUSP, São Paulo, Pp. 119, 1976.

Rizzini, C.T. & Mors,W.B.; Botânica econômica brasileira, 2.ed., Âmbito cultural, Rio de Janeiro, Pp. 56, 1995.

Robbers, J. E.; Speedie, M. K.; Tyler, V. E.; Farmacognosia, farmacobiotechnologia, editor Premier, Pp. 163, São Paulo, 1997.

Rodríguez, M.; Hasegawa, M.; González-Mújica, F.; Motta, N.; Castillo, A.; Castillo, J.; Zea, E.; Mora, K.; Sousa, A. G.; Camejo, D.; Antidiabetic and antiradical activities of plants from Venezuelan Amazon. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. Vol. 18, No. 03, Pp. 331-338, 2008.

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

Rover Júnior, L.; Höehr, N. F.; Vellasco, A. P.; Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. *Quimica Nova*, Vol. 24, No. 01, Pp. 112-119, 2001.

Sánchez-moreno, C.; A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Vol. 76, No. 02, Pp. 270-276, 1998.

Sangirardi, Jr.; *Botânica fantástica: plantas da mitologia, religião, magia*. Ed. Brasiliense, Pp. 113, ilustr., São Paulo, 1984.

Santos, C. C.; Estudo Químico de *Endlicheria sericeae*. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, 1976.

Santos, R. I.; Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: C.M.O. Simões *et al.* (eds.). *Farmacognosia da planta ao medicamento*. Universidade UFRGS/ Ed. da UFSC, 5ª edição rev., Porto Alegre, capítulo 16, Florianópolis, 2004.

Santos-Filho, D.; Gilbert, B. The alkaloids of *Nectandra megapotamica*. *Phytochemistry*, v. 14, p. 821-822, 1975.

Silva, D. B.; Matos, M. F. C.; Nakashita, S. T.; Misu, C. K.; Yoshida, N. C.; Carollo, C. A.; Fabri, J. R.; Miglio, H. S.; Siqueira, J. M.; Isolamento e avaliação da atividade citotóxica de alguns alcalóides oxoaporfínicos obtidos de *Annonaceae*. *Química Nova*, Vol. 30, No. 08, Pp. 1809-1812, 2007.

Silva, I. G. ; Barbosa-Filho, J. M. ; da Silva, M. S. ; de Lacerda, C. D. G.; da-Cunha, E. V. L.; *Coclaurine* from *Ocotea duckei*. *Biochemical Systematics and Ecology*, Vol. 30, No. 9, Pp. 881-883, 2002.

Silva, J.; Abebe, W.; Sousa, S.M.; Duarte, V.G.; Machado, M.I.L.; Matos, F.J.A.; Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of *Eucalyptus*. *Journal of Ethnopharmacology*, Vol. 89, No. 02, Pp. 277-283, 2003.

Silva, L. M. G. E.; Hamesrki, L.; Garcez, F.R.; (PQ), Garcez, W.S.; Atividade larvicida contra *Aedes aegypti* da Dicentrina isolada de *Ocotea vellosiana* (Lauraceae).

*Sociedade Brasileira de Química (SBQ)*, 31<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2009.

Silva, R. S.; Ribeiro, C. M. R.; Borges, M. N.; Blois, G. S. O.; Óleo essencial de limão no ensino da cromatografia em camada delgada. *Química Nova*, Vol.32, No.8, Pp. 2234-2237, 2009.

Silva, S. L.; Chaar, J. S.; Figueiredo, P. M.; Yano, T.; Cytotoxic evaluation of essential oil from *Casearia sylvestris* Sw on human cancer cells and erythrocytes. *Acta Amazônica*, Vol. 38, No. 01, Pp. 107-112, 2008.

Silva, S. L.; Figueiredo, P. M.; Yano, T.; Cytotoxic evaluation of essential oil from *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. Leaves. *Acta Amazônica*, Vol. 32, No. 02, Pp. 281-286, 2007.

Simão, A.M. Aditivos para alimentos sob o aspecto toxicológico. São Paulo: Nobel, 1985.

Simões, C.M.O.; Spitzer, V.; Óleos Voláteis. *In*: Simoes, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello, J.C. P.; Mentz, L.A.; Petrovick, (orgs). *Farmacognosia da planta ao medicamento*. 5<sup>o</sup> edição. Universidade UFRGS/ Ed. da UFSC, Porto Alegre. p.467, 2004.

Skehan, P.; Storeng, R.; Scudiero, D.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica, D.; Warren, J. T.; Bodesch, H.; Kenney, S.; Boyd, M. R.; New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening. *Journal of the national cancer institute*. Vol. 82, No. 13, Pp. 1107-1112, 1990.

Soler-Rivas, C., Espin, J.C., Wichers, H.J., 2000. An easy and fast test to compare total free radical scavenger capacity of foodstuffs. *Phytochemistry Analysis*, Vol. 11, Pp. 1–9, 2000 .

Souza, C. M. M.; Rocha e Silva, H.; Vieira-Jr, G. M.; Ayres, M. C. C.; da Costa, C. L. S.; Araújo, D. S.; Cavalcante, L. C. D.; Barros, E. D. S.; Araújo, P. B. M.; Brandão, M. S.; Chaves, M. H.; Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova*, Vol. 30, No. 02, Pp.351-355, 2007.

Souza, W. M.; Estudo químico e das atividades biológicas dos alcalóides indólicos e *himatanthus lancifolius* (muell. arg.) woodson, apocynaceae – (agoniada). Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

Sulaiman, S. N.; Mukhtar, M. R.; Hadi, A. H. A.; Awang, K.; Hazni, H.; Zahari, A.; Litaudon, M.; Zaima, K.; Morita, H.; Lancifoliaine, a New Bisbenzylisoquinoline from the Bark of *Litsea lancifolia*. *Molecules*, Vol.16,Pp.3119-3127, 2011.

Tabarrini, O.; Cecchetti, V.; Temperini, A.; Filipponi, E.; Lmperti, M. G.; Fravolini, A.; Velnacrine thia analogues as potential agents for treating alzheimer´s. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. Vol. 09, No. 11, Pp. 2921-2928, 2001.

Takaku, S.; Haber, W. A.; Setzer, W.; Leaf essential oil composition of 10 species of *Ocotea* (Lauraceae) from Monteverde, Costa Rica. *Biochemical Systematics and Ecology*. Vol.35, No.08, Pp. 525-532, 2007.

Takaku, S.; Harber, W. A.; Setzer, W. N.; Leaf essential oil composition of 10 species of *Ocotea* (Lauraceae) from Monteverde, Costa Rica. *Biochemical systematic and ecology*. Vol.35, Pp. 525-532, 2007.

Telascrea, M.; Araújo, C.C.; Cavalheiro, A.J.; Marques, M.O.M.; Facanali, R., Moraes, P.L.R.; Essential oils from leaves of *Cryptocarya* spp from the atlantic rain forest. *Química Nova*, Vol. 31, No. 3, Pp. 503-507, 2008.

Tiveron, A. P.; Atividade antioxidante e composição fenólica de legumes e verduras consumidos no Brasil. Dissertação de mestrado em Ciências e tecnologia de alimentos, Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2010.

Ur-Rahman, A.; Parveen, S.; S.; Khalid, A.; Farroq, A.; Choudhardr, M. I.; Acetyl and butyrylcholinesterase – Inhibiting triterpenoid. *Phytochemistry*. Vol. 58, No. 6, Pp. 963-968, 2001.

Vargas, F. de S.; Estudo comparativo entre técnicas para avaliação de atividades antioxidantes de espécies de plantas da Amazônia. Dissertação de Mestrado em Patologia Tropical, Universidade Federal do Amazonas, 2008.

Vattimo-Gil, I. A.; O gênero *Ocotea* Aubl. no sul do Brasil I. Espécies de Santa Catarina e do Paraná, Pp 265-350, 1956.

Verbel, J. O.; Cervera, T. G.; Fernandez, J. G.; Colorado, B. J.; Stashenko, E.; Chemical composition and antioxidant activity of essential oils isolated from Colombian plants. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, Vol. 20, No. 4, 2010.

Viegas Jr., C.; Bolzani, V. S.; Barreiro, E. J.; Os produtos Naturais e a química medicinal moderna. *Química Nova*, Vol.29, No. 02, Pp. 326-337, 2006.

Viegas Junior,.; Bolzani, V. S.; Furlan, M.; Fraga, C. A. M.; Barreiro.; Produtos Naturais como candidatos a fármacos úteis no tratamento do mal de Alzheimer. *Química Nova*. Vol. 27, No. 4, Pp. 655-660, 2004.

Vilegas, J. H. Y.; Gottlieb, O. R.; Kaplan, M. A. C.; Gottlieb, H. E.; *Phytochemistry*, Vol. 28, No. , Pp. 3577, 1989.

Wink, M. Physiology of secondary product formation in plants. In: CHARLWOOD, B. V.; RHODES, M.J.C. (ed). *Secondary products from plant tissue culture*, Oxford, Clarendon, 1990.

Wu, W.; Huang, C.; Sctructural Elucidation of Isoquinoline, Isoquinolone, Benzylisoquinoline, Aporphine, and Phenanthrene Alkaloids using API-ionspray Tandem Mass Sprecrometry. *The Chinese Pharmaceutical Journal*, Vol. 58, Pp. 51-55, 2006.

Yilmaz, Y.; Toledo, R. T.; Health aspects of functional grape seed constituents. *Trends in Food Science and Technology*, Vol. 15, No. 9, Pp. 422-433, 2004.

Zanin, S. M. W.; Lordello, A. L. L.; Alcalóides aporfinóides do gênero *Ocotea* (Lauraceae). *Química Nova*, Vol. 30, No. 01, Pp. 92-98, 2007.

Zauli, R. C.; Pereira, M. A.; Cardoso, L. G. V.; Silva, J. M. S.F. da; Carvalho, J. C. T.; Fiorini, J. E.; Atividade antimicrobiana e determinação da concentração Inibitória mínima e concentração bactericida mínima de *Dillenia indica* L. (flor de abril). *Gestão de Pesquisa e Pós-graduação, Seminário de Iniciação Científica da UNIFENAS*, 2004.

Zheng, W.; Wang, S. Y.; Antioxidant Activity and Phenolic Compounds in Selected Herbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 49, No. 11, Pp. 5165-5170, 2001

Zhou, B. N.; Johnson, R. K.; Mattern, M.R.; Wang, X.; Hecht, S. M., Beck, H. T.; Ortiz, A.; Kingston, D. G. J.; Isolation and Biochemical Characterization of a New Topoisomerase I Inhibitor from *Ocotea leucoxylon*. *Journal of Natural Products*, Vol.63, No.02 , Pp. 217-221, 2000.

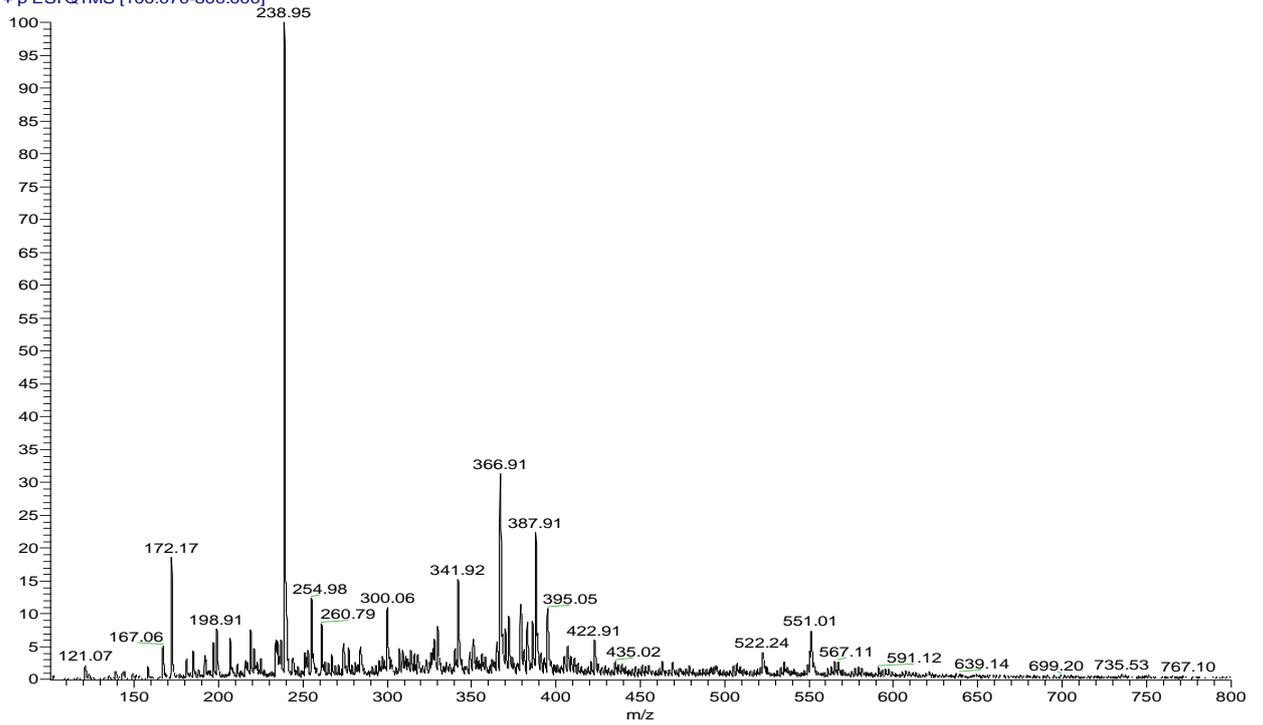
Zoghbi, M. G. B.; Andrade, E. H. A.; Santos, A. S.; Silva, M. H. L.; Maia, G. S.; Constituintes voláteis de espécies de Lauraceae com ocorrência na Floresta Nacional de Caxiuanã – Melgaço – PA. CBO 014 - estação científica Ferreira Penna, 2005.

Zuanazzi, J. A. S.; Montana, J. A.; Flavonóides. In: C.M.O. Simões *et al.* (eds.). *Farmacognosia da planta ao medicamento*. Universidade UFRGS/ Ed. da UFSC, 5ª edição rev., Porto Alegre, capítulo 16, Florianópolis, 2004.

	AVALIAÇÕES QUÍMICA/BIOLÓGICAS							ÓLEO ESSENCIAL		PERFIL ALCALOÍDICO		PROSPECÇÃO		
	Órgão vegetal	Antioxidante (µg/mL)	Anti ACh E	Artemia salina (µg/mL)	HCT - 8 (%)	MDA/MB-435 (%)	SF-295 (%)	Rend. (%)	Constituinte majoritário	íons (M+1) m/z	Tipo de alcalóide	Fenol	Flavonóide	Alcalóide
<i>E. citriodora</i>	Folhas	161,01	-	8,301	28,96	7,23	15,31	4,29	geranato de metila	238,95	benziliso quinilínico	-	-	-
	Galhos Grossos	42,78	+	100,00	16,32	41,17	0,82	2,50	geranato de metila	300,06	aporfínico	+	-	-
<i>E. sericeae</i>	Folhas	9,77	-	90,260	37,56	3,89	47,19	0,13	espatulenol	329,95	aporfínico	+	+	-
	Galhos Grossos	50,92	-	100,011	30,15	17,91	24,30	0,10	óxido de cariofileno	330,09	aporfínico	+	-	+
	Galhos Finos	14,44	-	229,766	21,80	46,39	7,73	0,11	óxido de cariofileno	329,88	aporfínico	+	-	+
	Cascas	13,29	-	82,381	NR	NR	NR	0,06	elemol	330,09	aporfínico	+	+	+
<i>O. ceanothifolia</i>	Folhas	18,12	-	134,640	35,56	12,28	27,98	0,11	óxido de cariofileno	299,92	aporfínico	+	+	-
	Galhos Grossos	15,64	+	261,600	NR	NR	NR	0,07	óxido de cariofileno	299,92	aporfínico	+	+	+
	Galhos Finos	14,43	+	262,121	NR	NR	NR	0,05	óxido de cariofileno	299,92	aporfínico	+	+	+
	Cascas	10,17	-	134,287	32,73	50,41	0,58	NR	NR	314,06	aporfínico	+	-	-
<i>O. leucoxylin</i>	Folhas	52,51	-	388,560	38,31	12,47	36,90	0,13	óxido de cariofileno	370,13	aporfínico	+	-	+
	Galhos Grossos	50,88	+	165,150	29,04	9,55	11,88	0,05	beta-cariofileno	369,92	aporfínico	+	-	+
	Galhos Finos	82,61	+	254,856	17,75	38,72	24,59	0,02	óxido de cariofileno	369,92	aporfínico	+	-	+
<i>O. minor</i>	Folhas	8,21	+	83,040	29,64	3,69	4,36	0,11	beta-cariofileno	143,89	triptamínico	+	-	+
	Galhos Grossos	9,08	+	146,791	74,30	12,51	75,36	0,04	óxido de cariofileno	205,07	NI	+	+	+
	Galhos Finos	7,31	+	230,218	22,20	5,14	16,66	NR	NR	205,07	NI	+	+	+
	Cascas	7,57	-	243,004	33,41	4,19	4,14	0,06	óxido de cariofileno	285,58	benziliso quinilínico	+	+	+
<i>R. recurva</i>	Folhas	110,46	-	129,990	18,34	5,20	5,41	0,06	beta-selineno	330,16	aporfínico	-	-	-
	Galhos Grossos	198,26	-	386,74	1,26	11,06	8,01	0,02	espatulenol	330,02	aporfínico	-	-	+
	Galhos Finos	125,38	-	211,285	31,83	7,71	27,98	0,03	espatulenol	330,02	aporfínico	-	-	+
	Cascas	55,11	-	243,85	30,41	12,96	27,03	0,04	beta-eudesmol	NR	NI	-	-	+
<i>R. crenaticupula</i>	Folhas	78,16	-	167,512	36,71	4,65	5,11	0,58	delta-cadineno	436,91	NI	-	-	+
	Galhos Grossos	67,01	-	471,571	11,94	33,44	10,12	0,02	ácido hexadecanóico	286,06	benziliso quinilínico	+	-	+

# Anexos

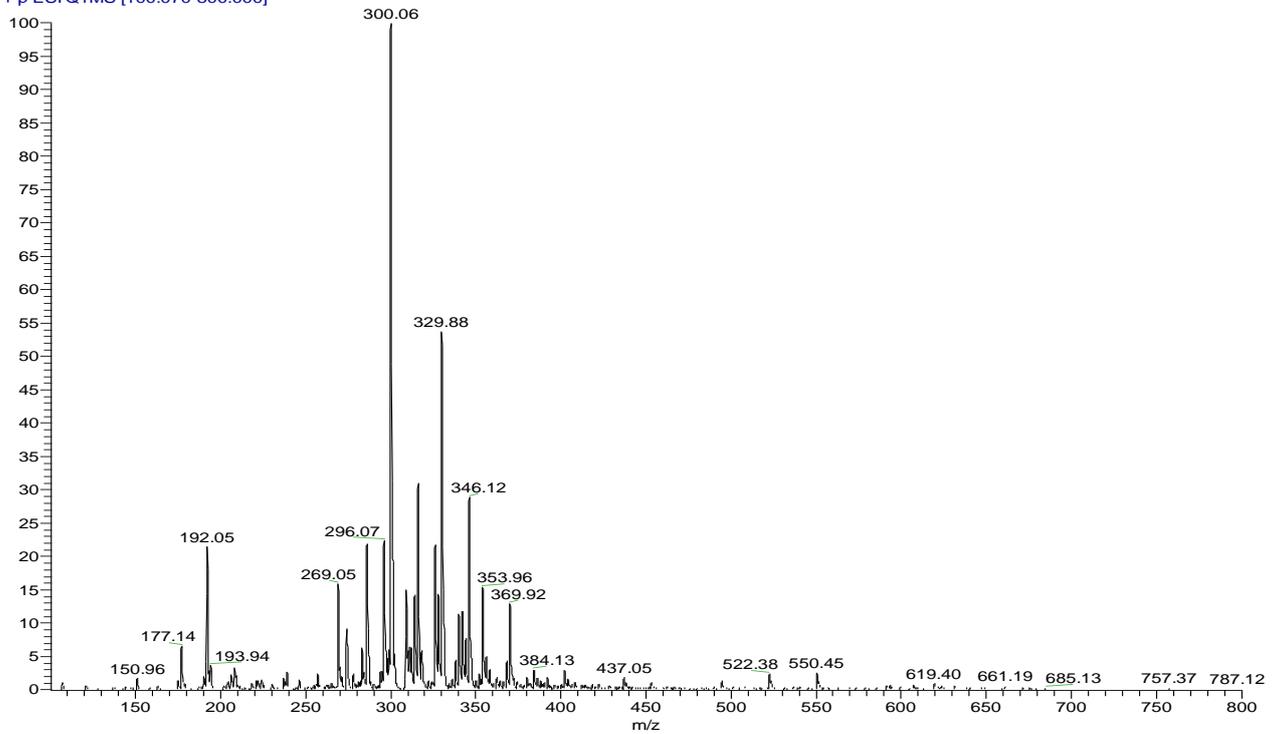
Desktop\_110324154738 #1-12 RT: 0.00-0.20 AV: 12 NL: 2.02E7  
T: + p ESI Q1MS [100.070-800.000]



Espectro de massa de *Endlicheria citriodora* Folhas

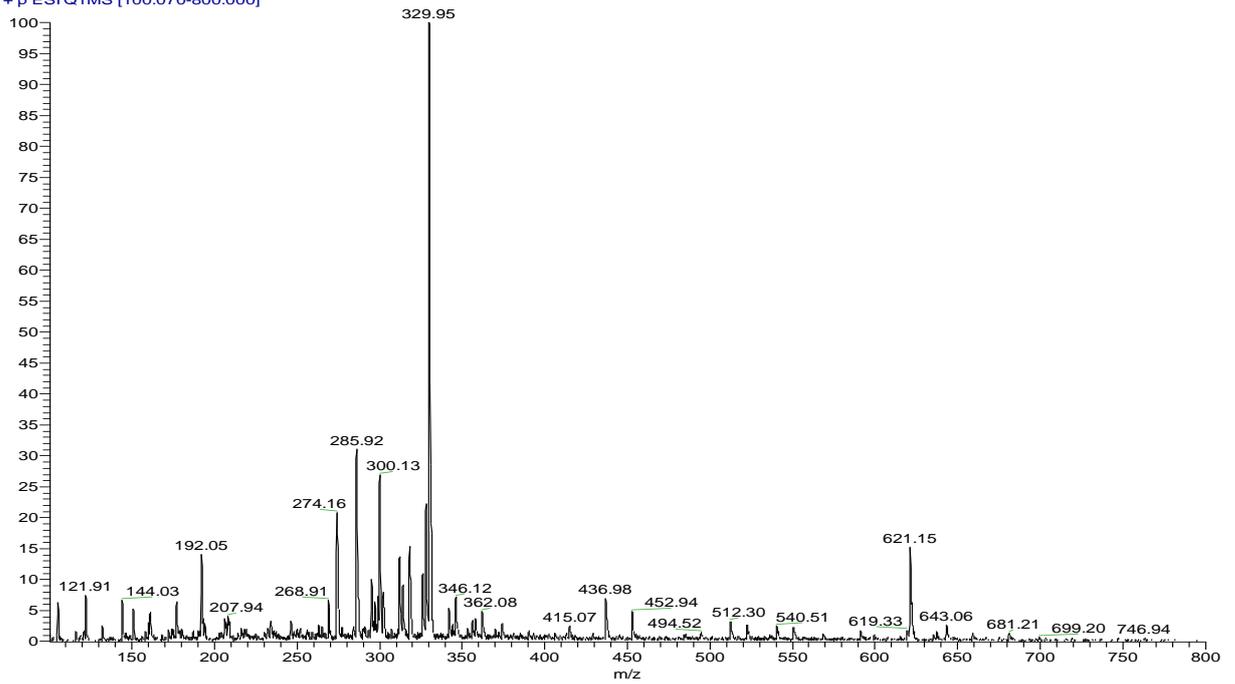
Espectro de massa de *Endlicheria citriodora* Galhos

Desktop\_110322181603 #1-12 RT: 0.00-0.20 AV: 12 NL: 2.88E7  
T: + p ESI Q1MS [100.070-800.000]



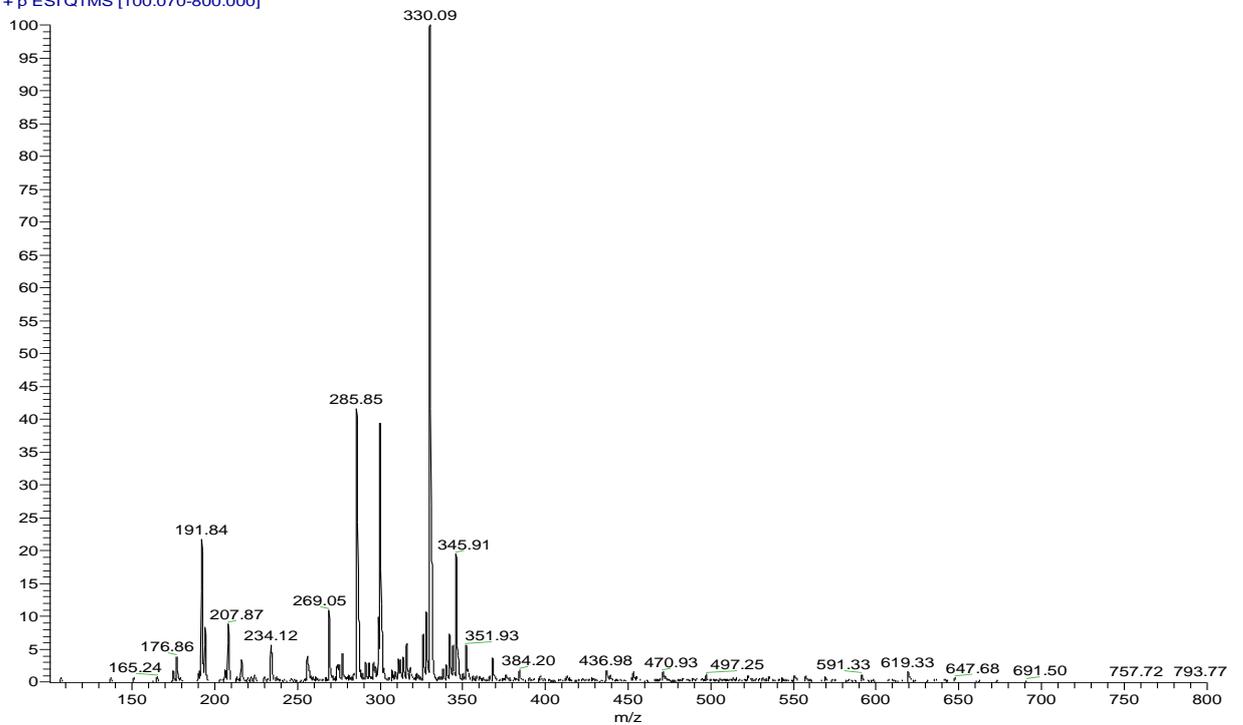
Espectro de massa de *Endlicheria citriodora* Galhos

Desktop\_110322160544\_110322160544 #1-12 RT: 0.00-0.19 AV: 12 NL: 1.75E7  
T: + p ESI Q1MS [100.070-800.000]



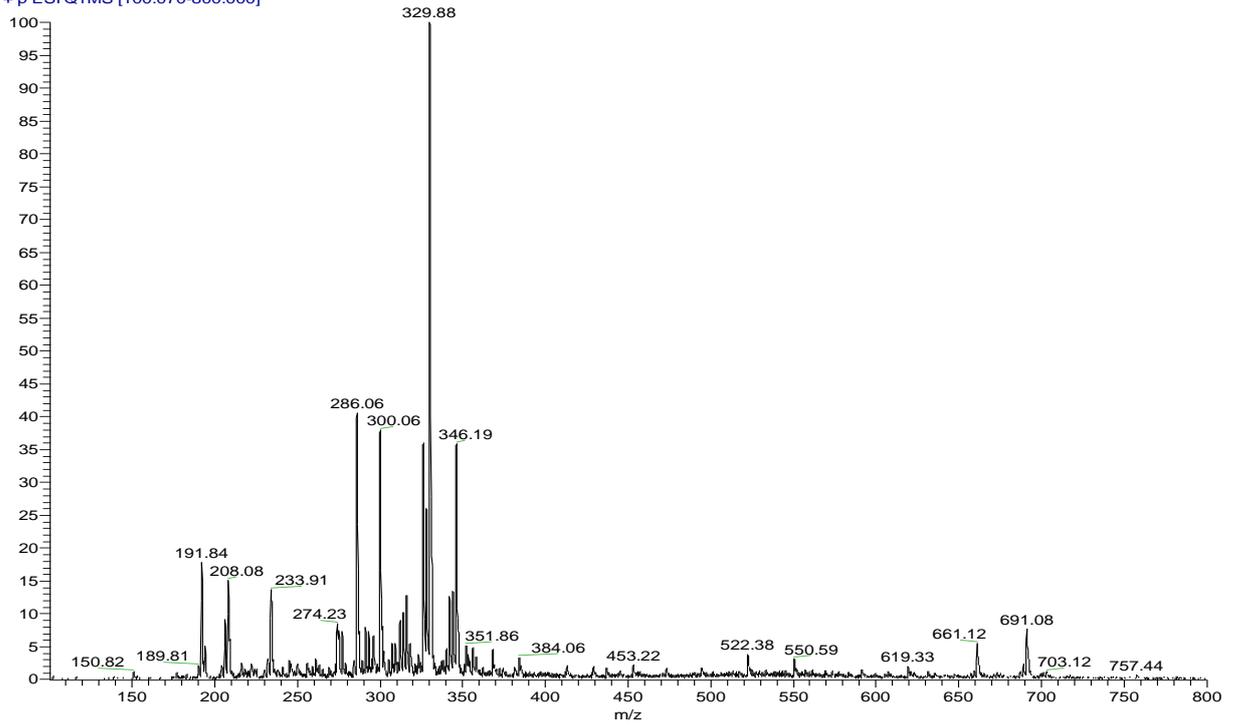
Espectro de massa de *Endlicheria sericea* Folhas

Desktop\_110322171533 #1-7 RT: 0.01-0.11 AV: 7 NL: 5.49E7  
T: + p ESI Q1MS [100.070-800.000]



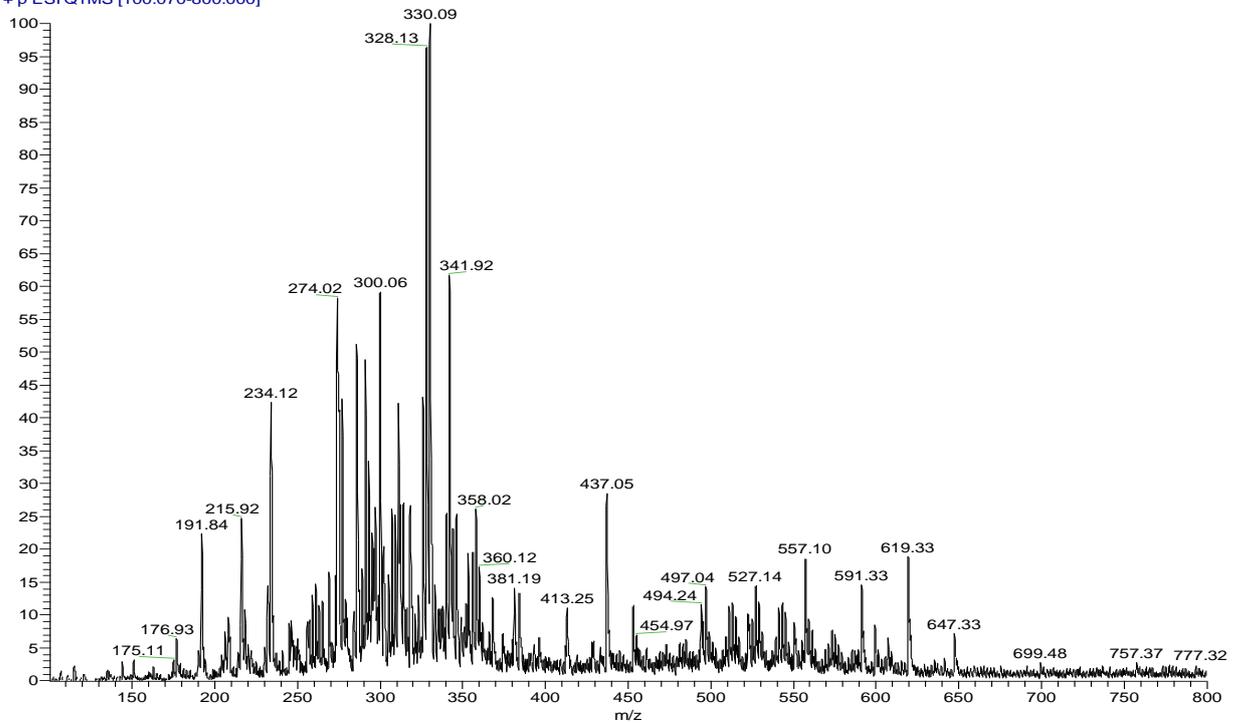
Espectro de massa de *Endlicheria sericea* Cascas

Desktop\_110322193119 #1-14 RT: 0.00-0.23 AV: 14 NL: 1.67E7  
T: + p ESI Q1MS [100.070-800.000]



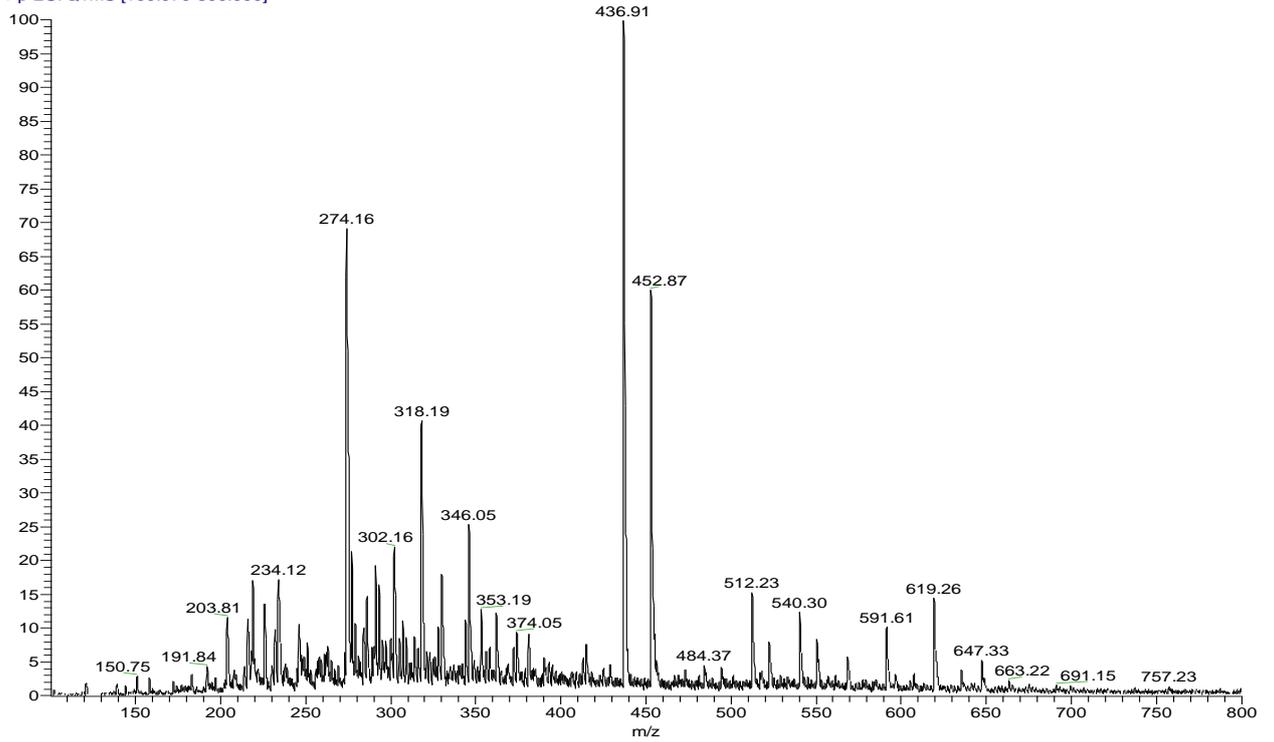
Espectro de massa de *Endlicheria sericea* Galhos finos

Desktop\_110322190205 #1-13 RT: 0.01-0.22 AV: 13 NL: 6.38E6  
T: + p ESI Q1MS [100.070-800.000]



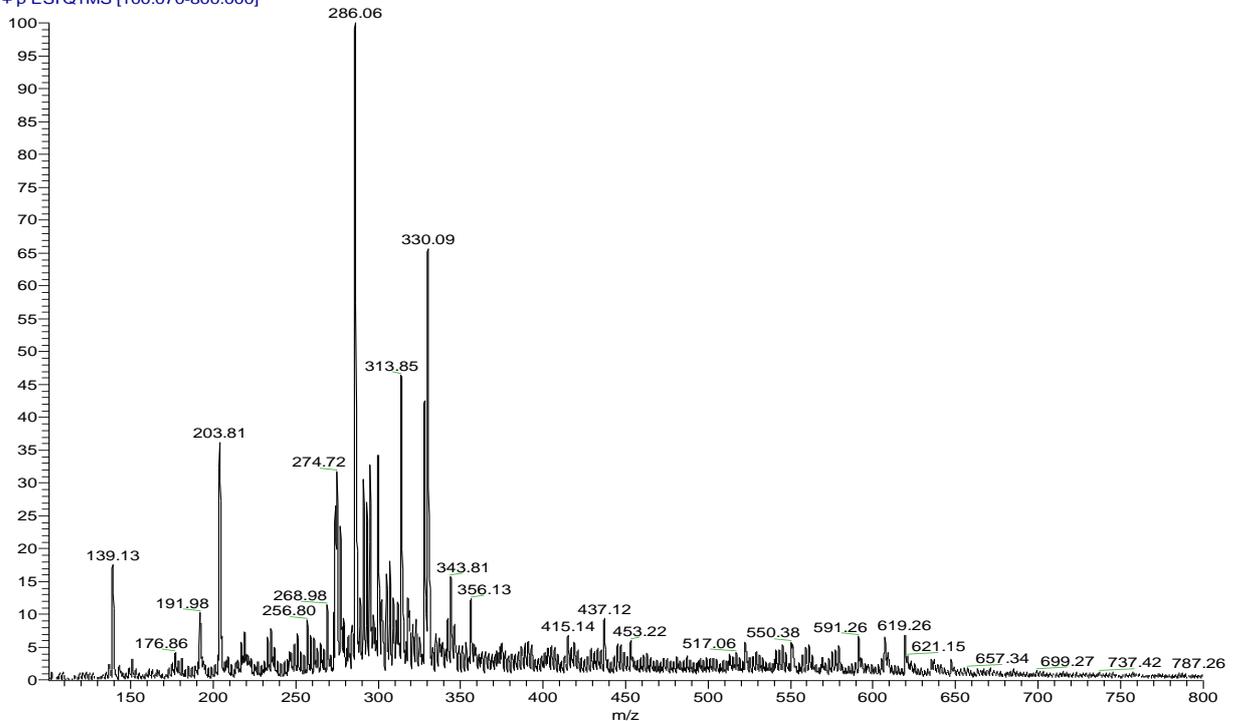
Espectro de massa de *Endlicheria sericea* Galhos grossos

Desktop\_110324163345 #1-31 RT: 0.01-0.53 AV: 31 NL: 6.84E6  
T: + p ESI Q1MS [100.070-800.000]



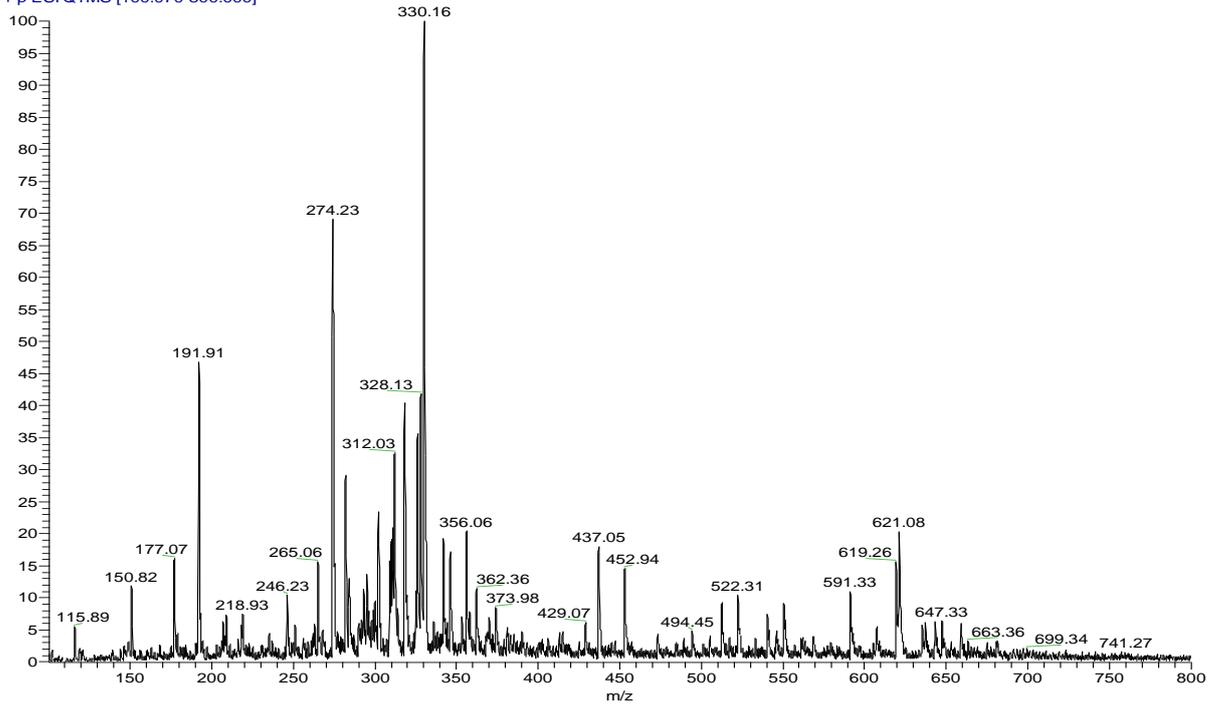
Espectro de massa de *Rhodostemonodaphne crenaticupula* Folhas

Desktop\_110324160838 #1-25 RT: 0.00-0.42 AV: 25 NL: 1.06E7  
T: + p ESI Q1MS [100.070-800.000]



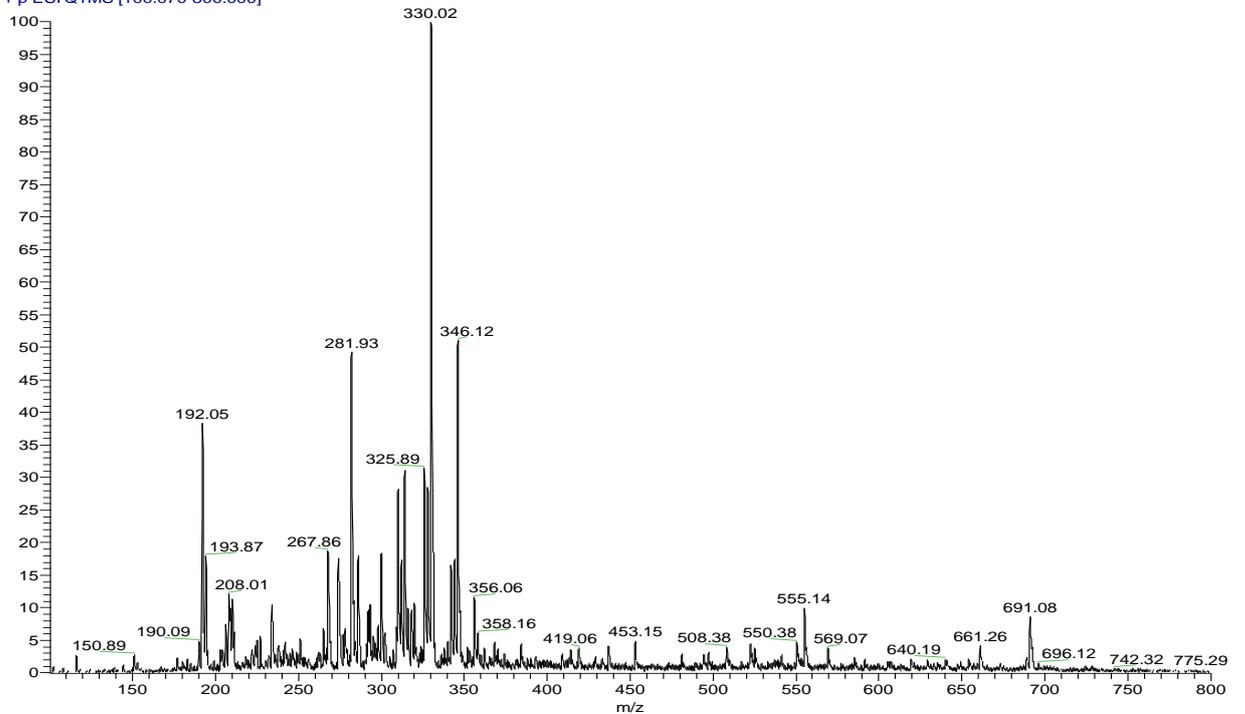
Espectro de massa de *Rhodostemonodaphne crenaticupula* Galhos

Desktop\_110322164317 #1-11 RT: 0.01-0.19 AV: 11 NL: 5.70E6  
T: + p ESI Q1MS [100.070-800.000]



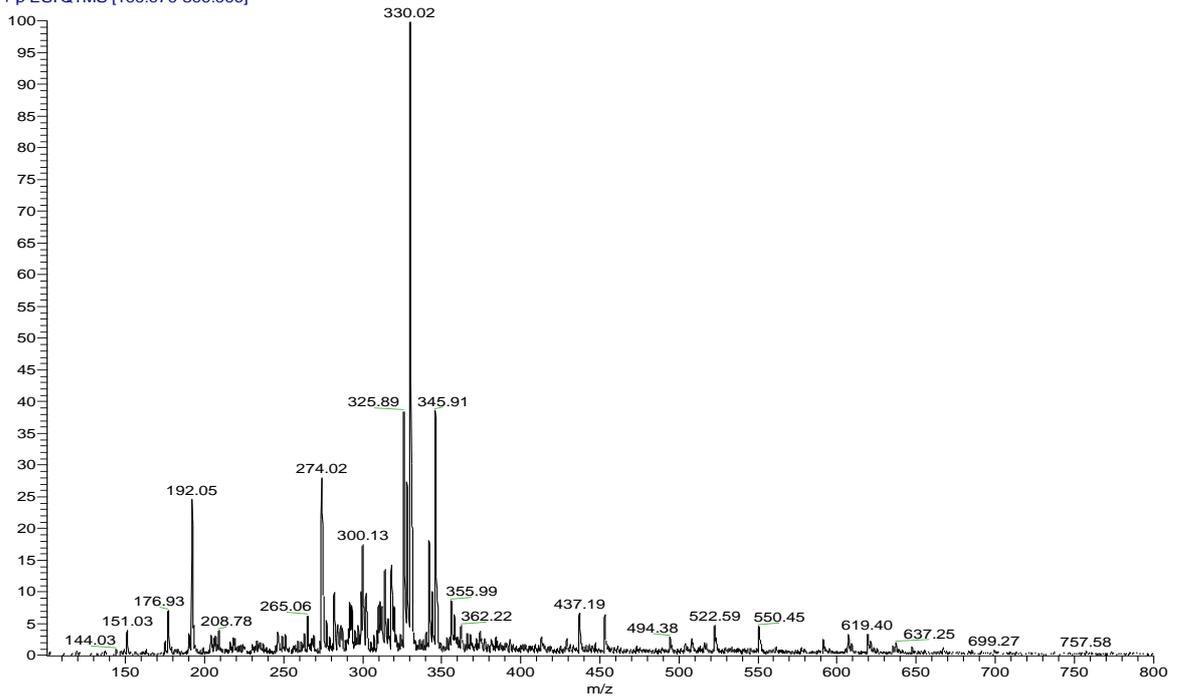
Espectro de massa de *Rhodostemonodaphne recurva* Folhas

Desktop\_110322202301 #1-11 RT: 0.00-0.18 AV: 11 NL: 1.24E7  
T: + p ESI Q1MS [100.070-800.000]



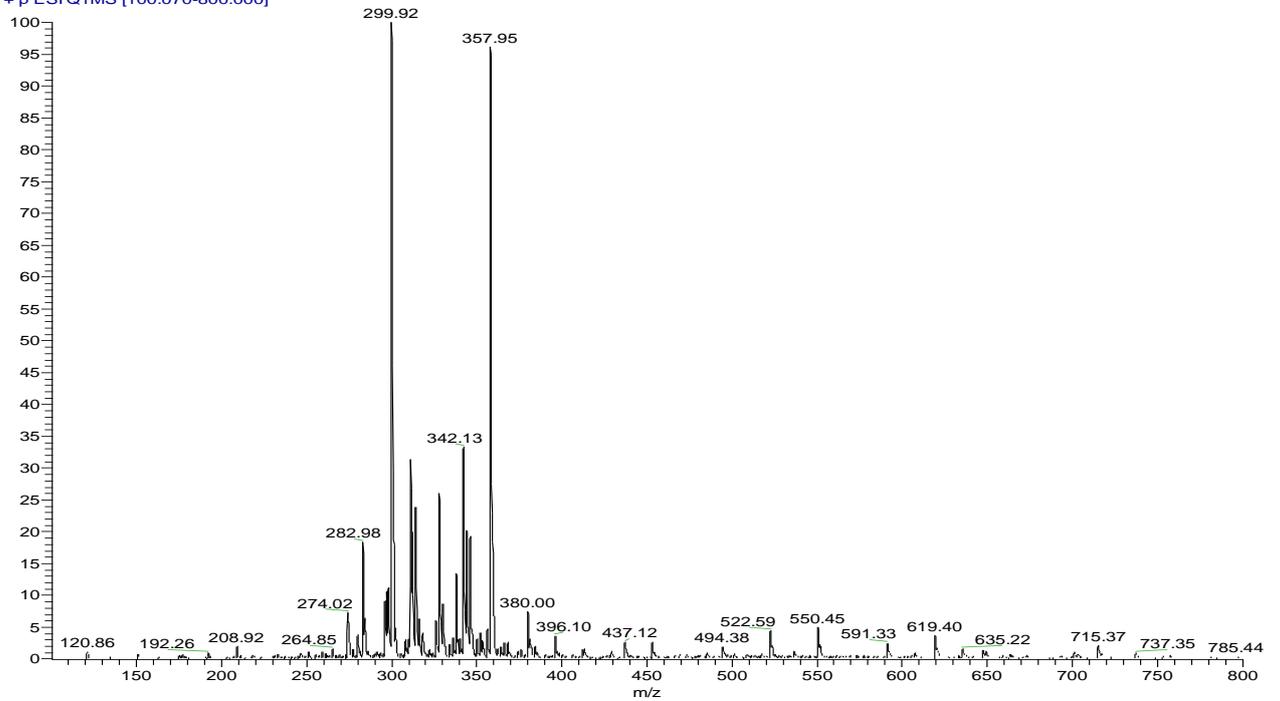
Espectro de massa de *Rhodostemonodaphne recurva* Galhos finos

Desktop\_110322190322 #1-21 RT: 0.01-0.36 AV: 21 NL: 1.04E7  
T: + p ESI Q1MS [100.070-800.000]



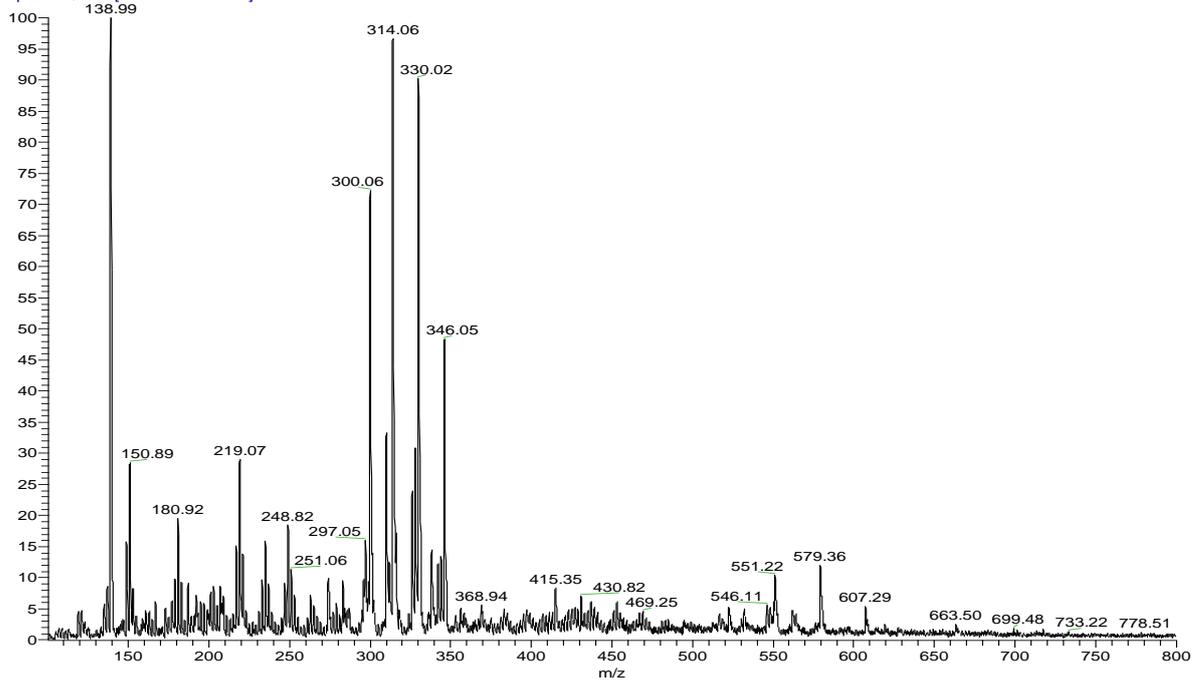
Espectro de massa de *Rhodostemonodaphne recurva* Galhos grossos

Desktop\_110322154038 #1-22 RT: 0.00-0.37 AV: 22 NL: 3.66E7  
T: + p ESI Q1MS [100.070-800.000]



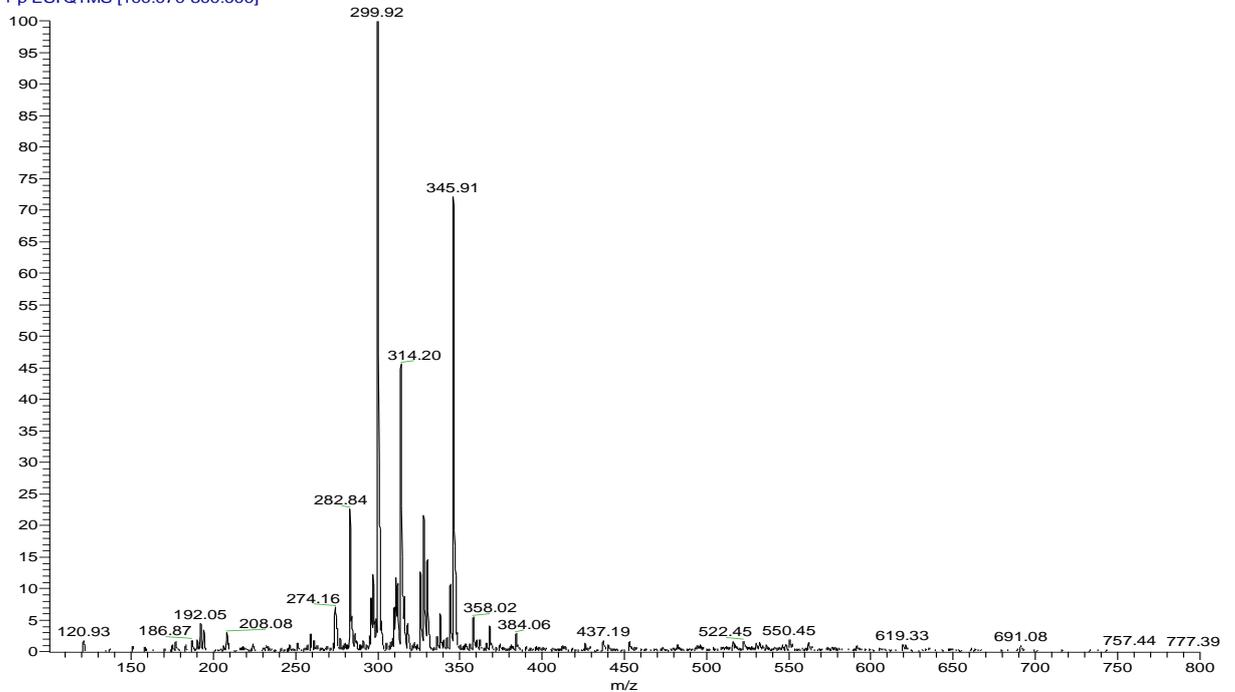
Espectro de massa de *Ocotea ceanothifolia* Folhas

Desktop\_110324160707 #1-18 RT: 0.01-0.30 AV: 18 NL: 7.30E6  
T: + p ESI Q1MS [100.070-800.000]



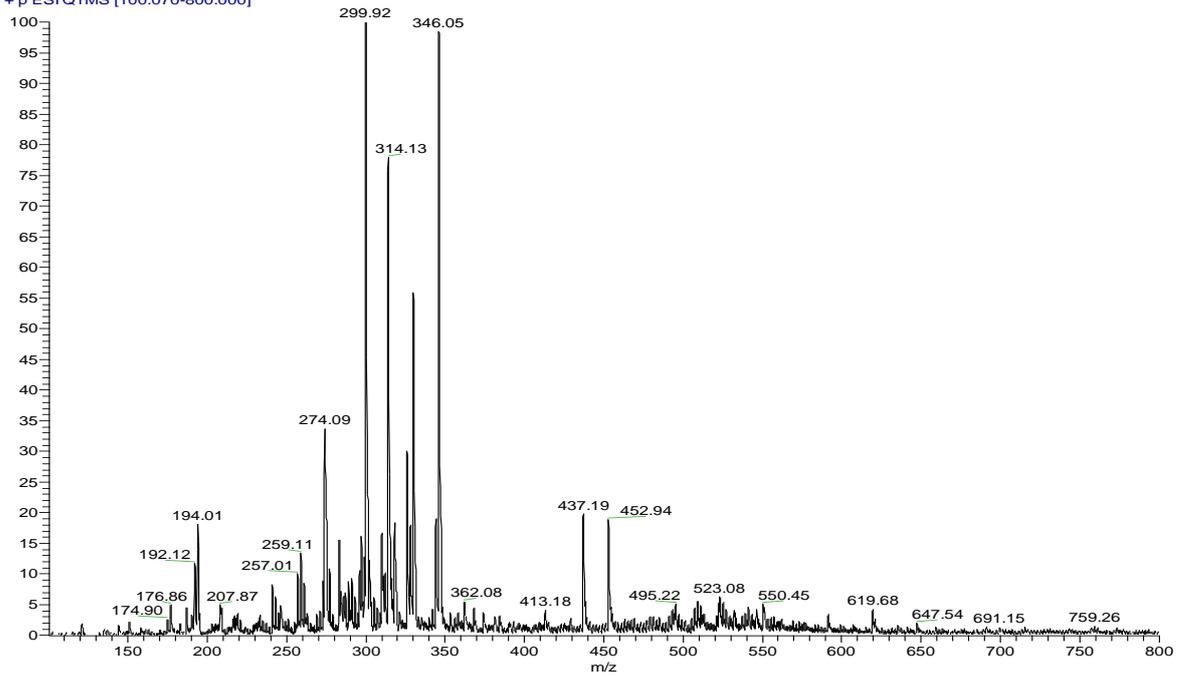
Espectro de massa de *Ocotea ceanothifolia* Cascas

Desktop\_110322194703 #1-14 RT: 0.01-0.24 AV: 14 NL: 2.66E7  
T: + p ESI Q1MS [100.070-800.000]



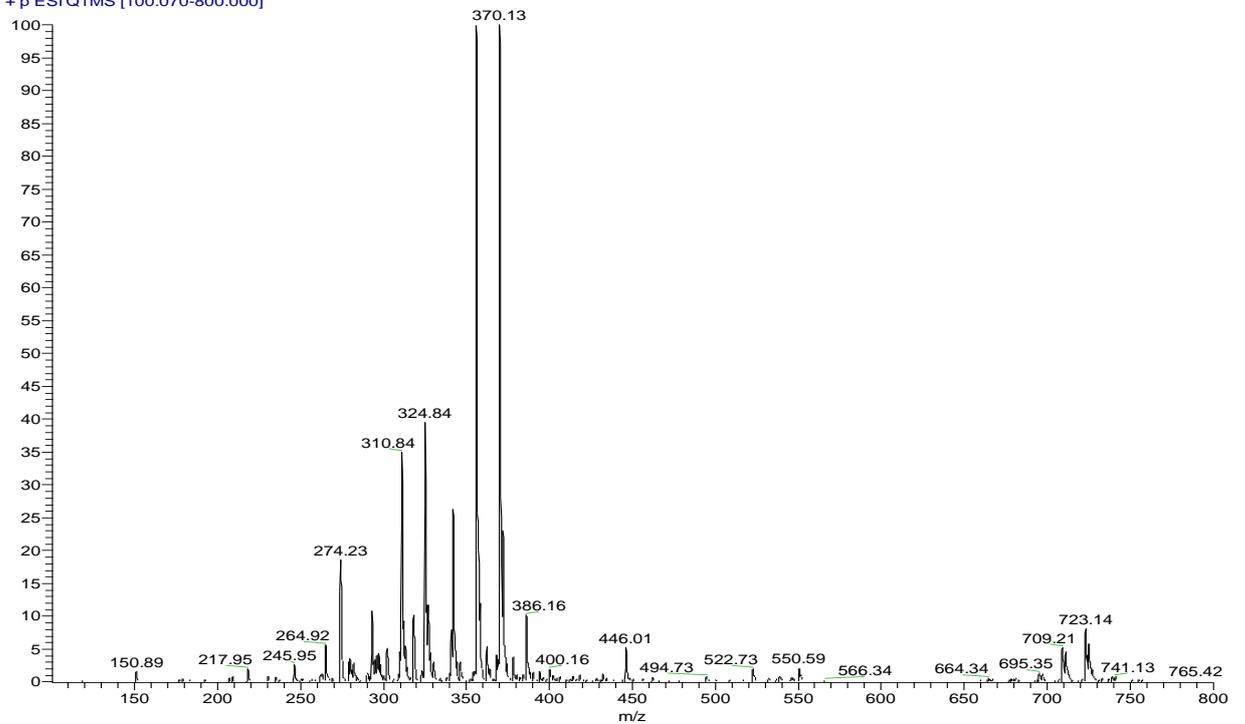
Espectro de massa de *Ocotea ceanothifolia* Galhos finos

Desktop\_110322183118 #1-11 RT: 0.00-0.18 AV: 11 NL: 1.18E7  
T: + p ESI Q1MS [100.070-800.000]



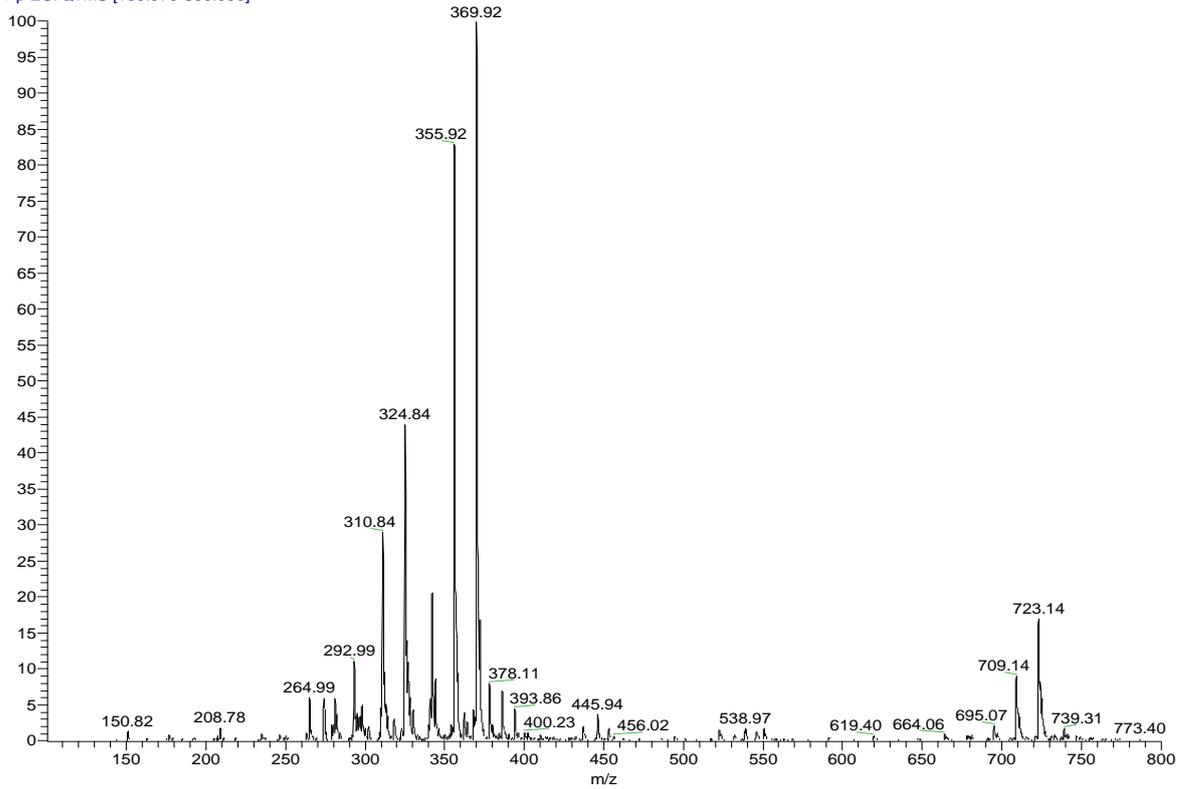
Espectro de massa de *Ocotea ceanothifolia* Galhos grossos

Desktop\_110322162056 #1-12 RT: 0.01-0.20 AV: 12 NL: 3.41E7  
T: + p ESI Q1MS [100.070-800.000]



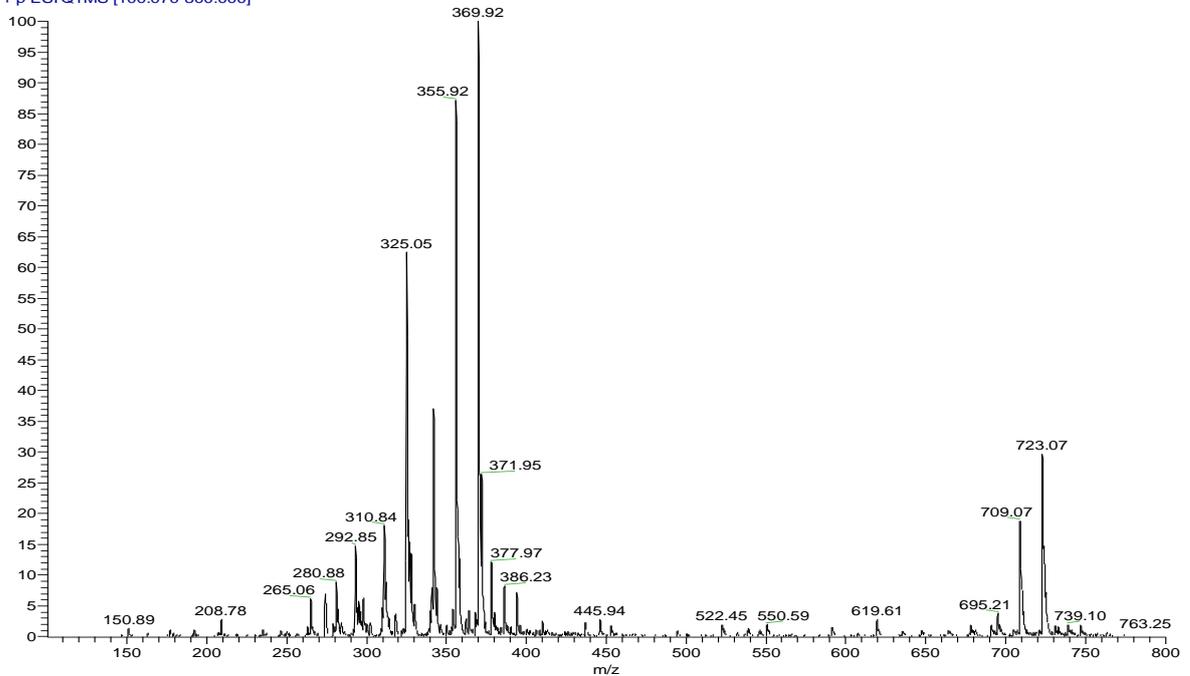
Espectro de massa de *Ocotea leucoxylon* Folhas

Desktop\_110322201310 #1-10 RT: 0.01-0.17 AV: 10 NL: 3.30E7  
T: +p ESI Q1MS [100.070-800.000]



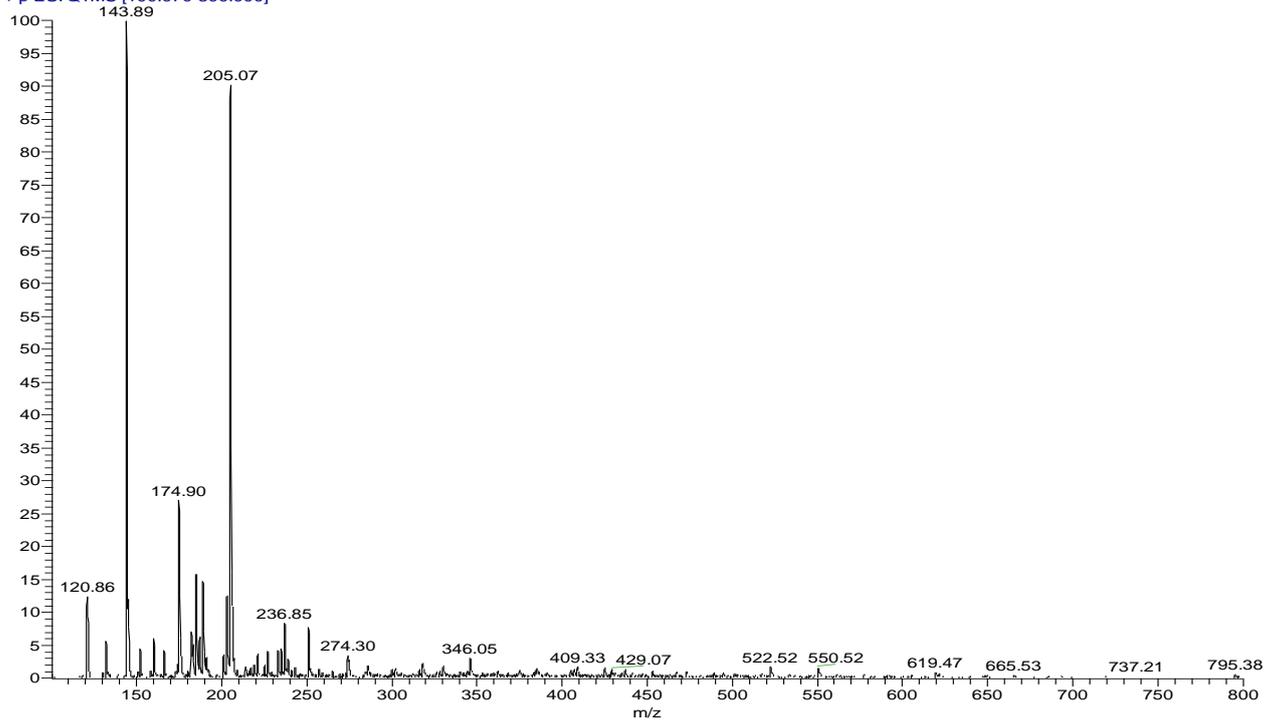
### Espectro de massa de *Ocotea leucoxylon* Galhos finos

Desktop\_110322174442 #1-11 RT: 0.01-0.18 AV: 11 NL: 2.40E7  
T: +p ESI Q1MS [100.070-800.000]



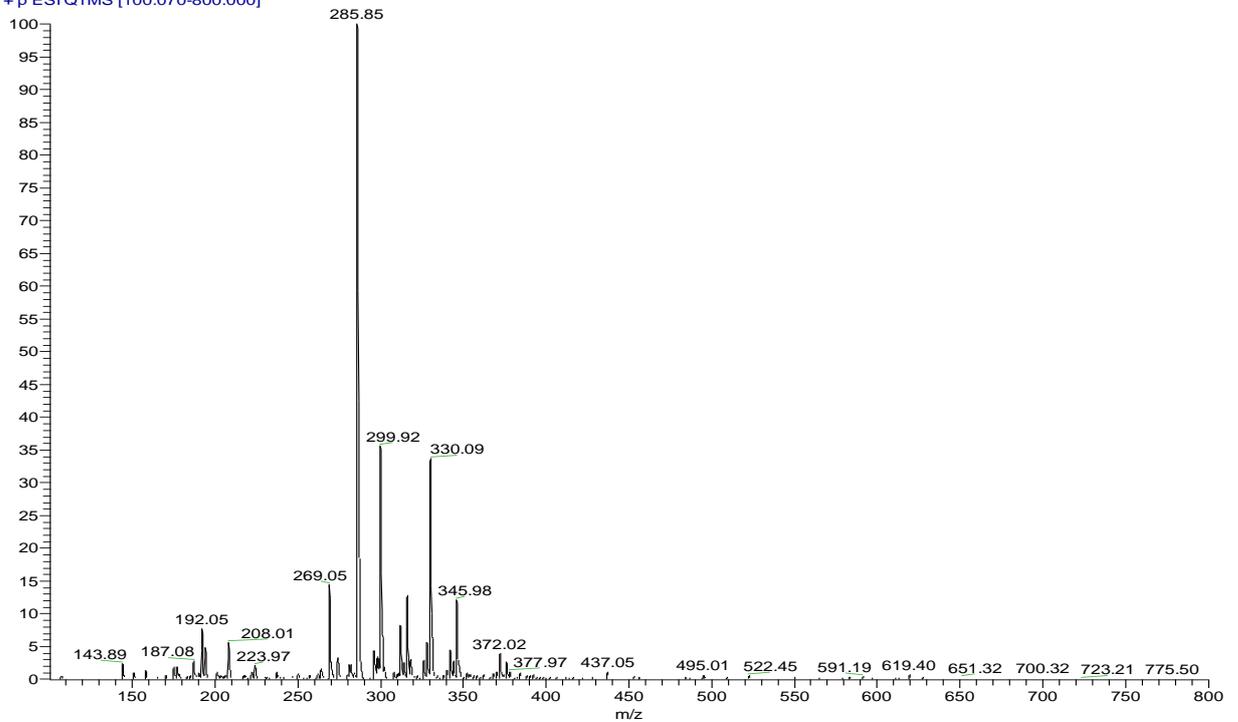
### Espectro de massa de *Ocotea leucoxylon* Galhos grossos

Desktop\_110322165516 #1-9 RT: 0.01-0.15 AV: 9 NL: 3.21E7  
T: + p ESI Q1MS [100.070-800.000]



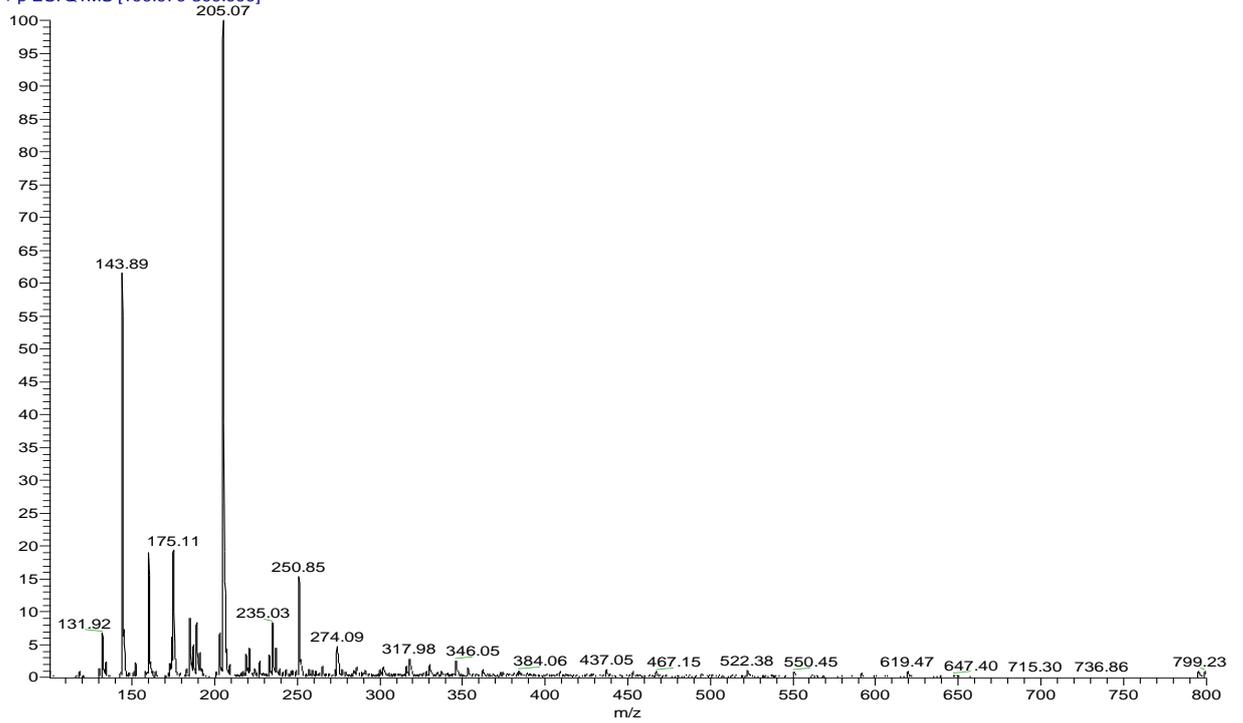
Espectro de massa de *Ocotea minor* Folhas

Desktop\_110322171506 #1-9 RT: 0.00-0.14 AV: 9 NL: 9.17E7  
T: + p ESI Q1MS [100.070-800.000]



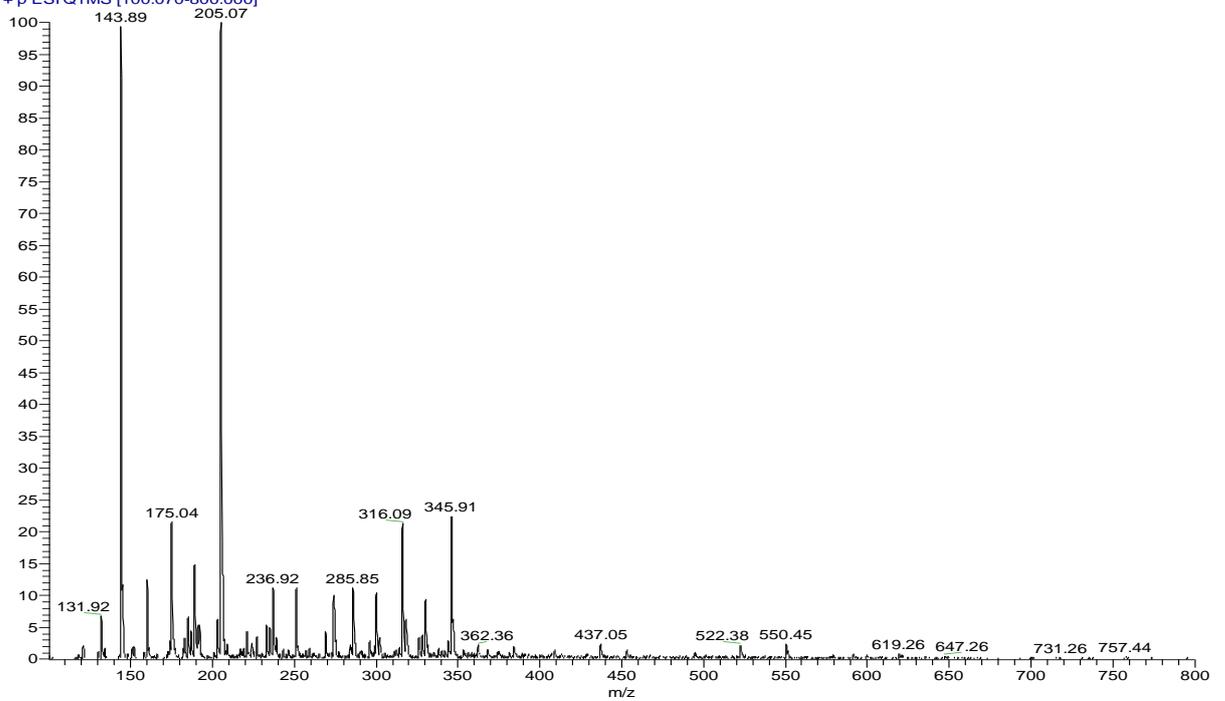
Espectro de massa de *Ocotea Cascas*

Desktop\_110322200126 #1-16 RT: 0.00-0.26 AV: 16 NL: 2.62E7  
T: + p ESI Q1MS [100.070-800.000]



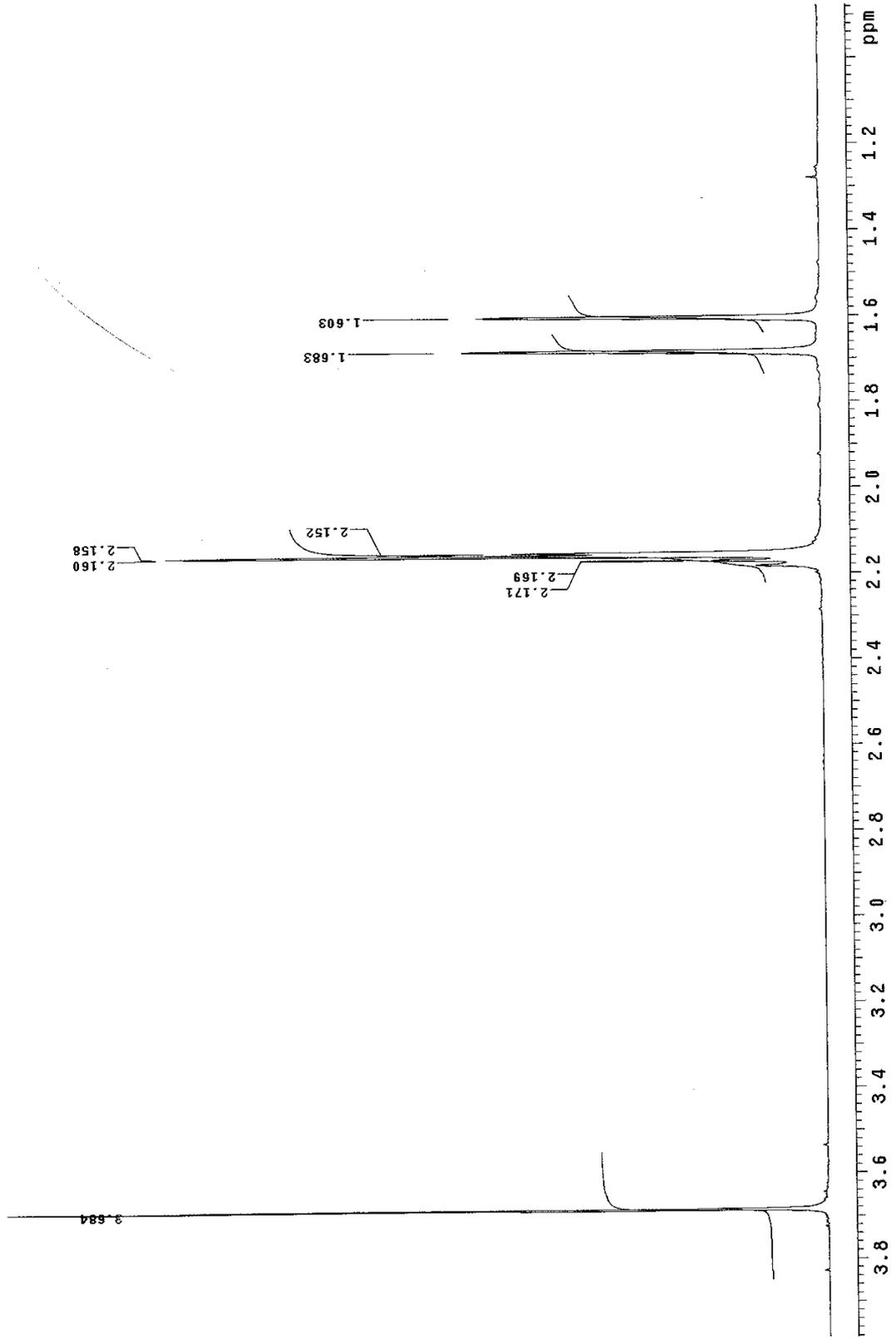
Espectro de massa de *Ocotea minor* Galhos finos

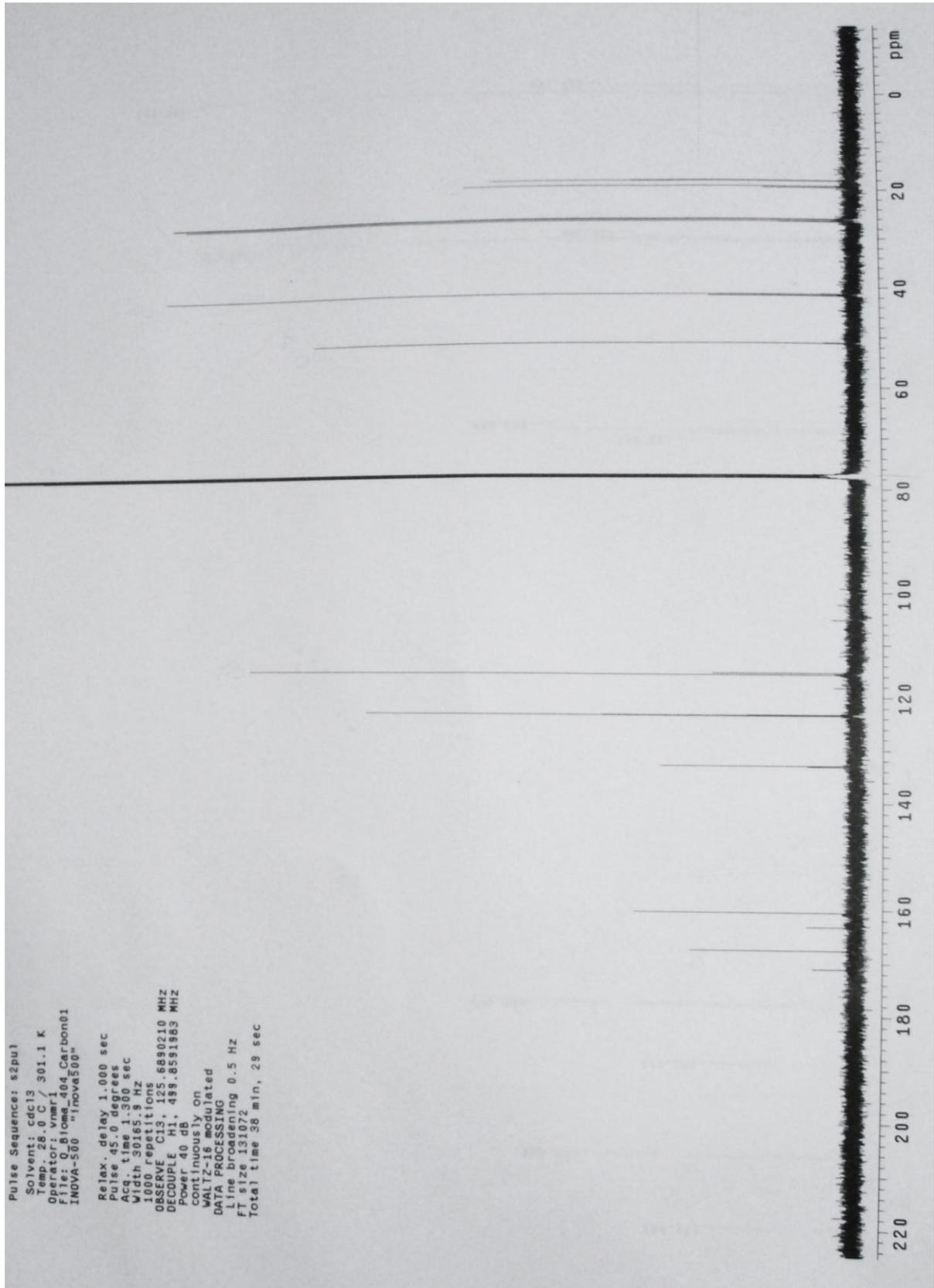
Desktop\_110322185001 #1-10 RT: 0.01-0.17 AV: 10 NL: 1.78E7  
T: + p ESI Q1MS [100.070-800.000]

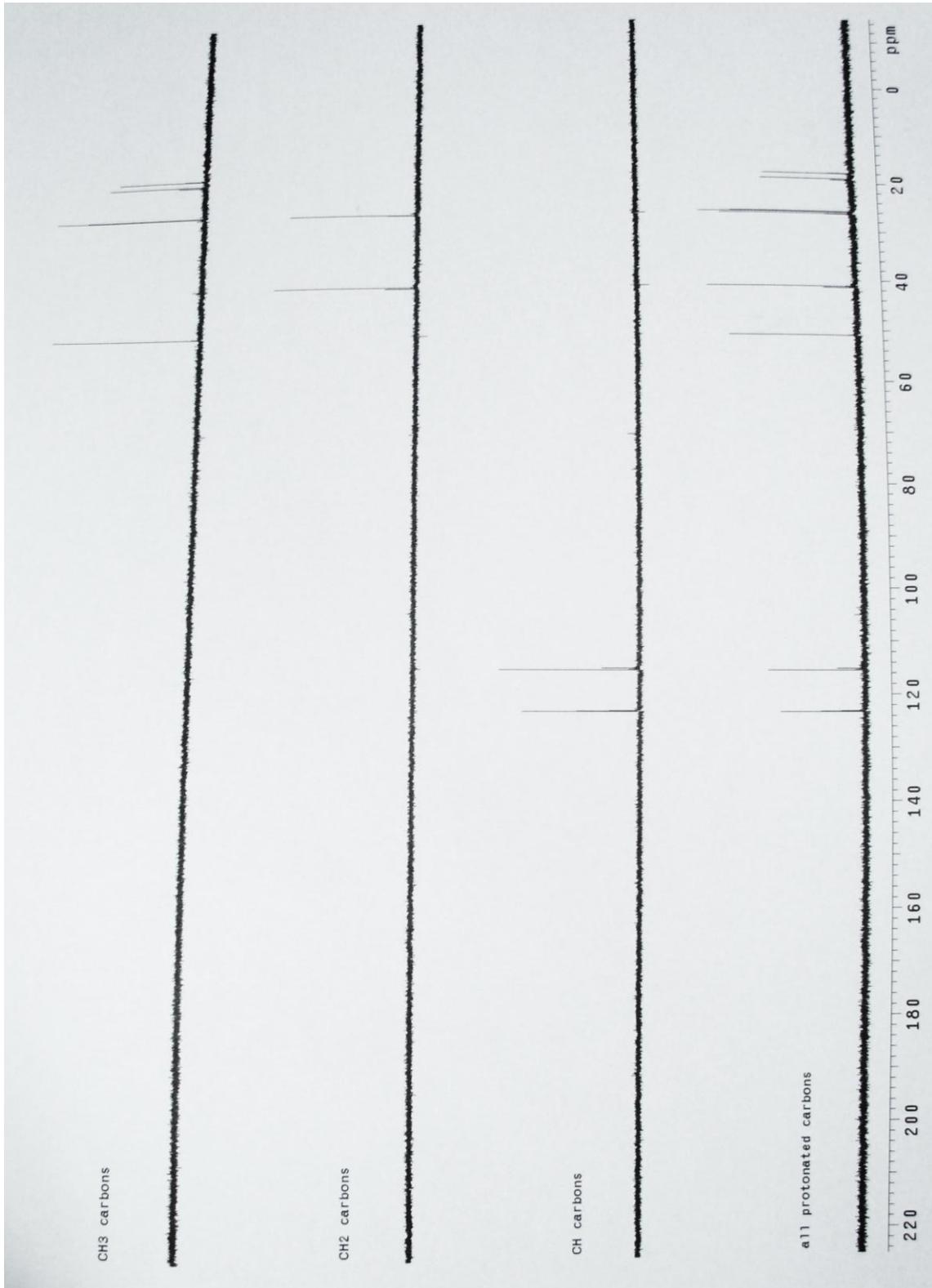


Espectro de massa de *Ocotea minor* Galhos grossos

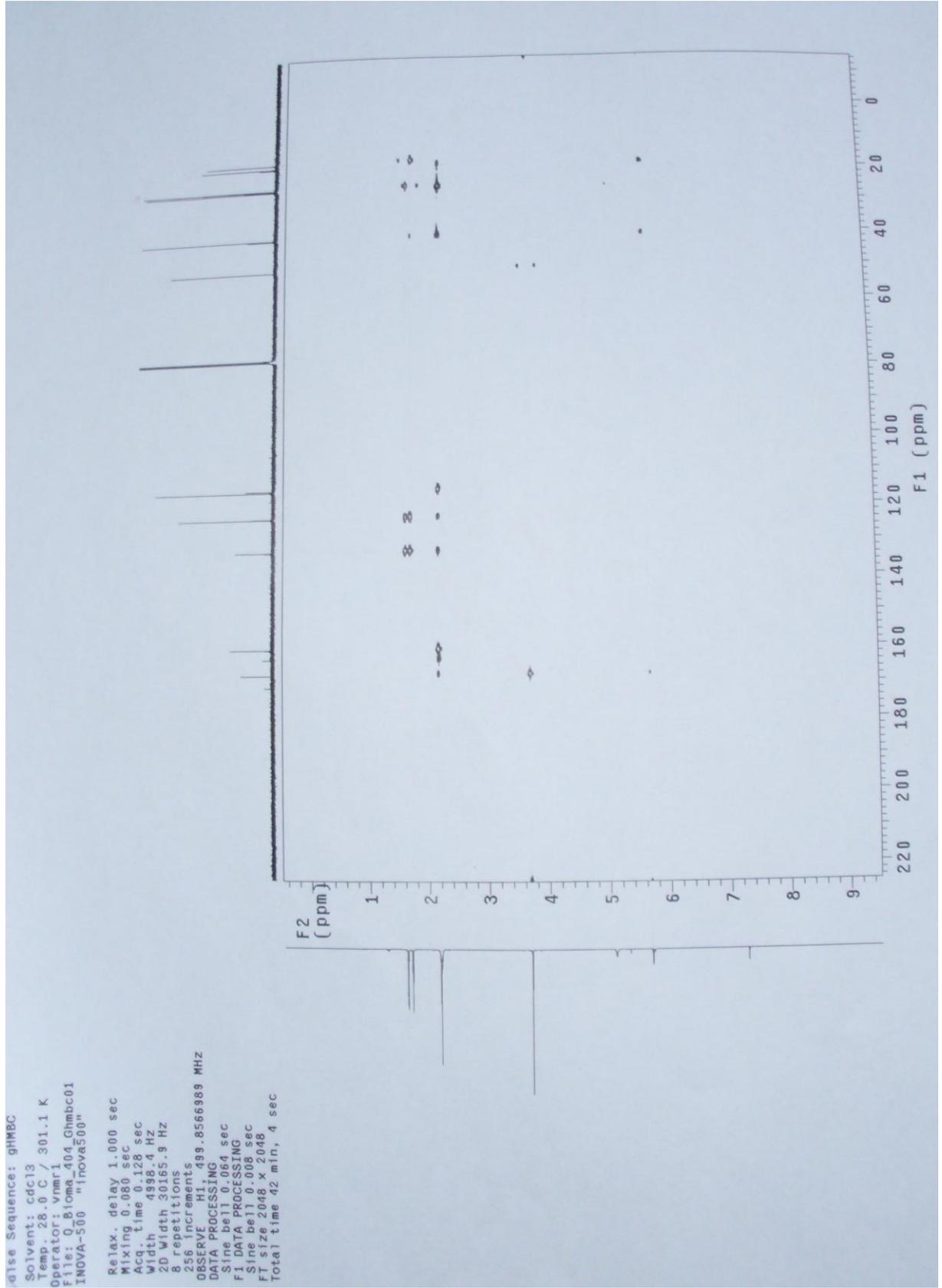
File: Q\_BIoma\_404\_Proton\_May\_12\_201101  
Pulse Sequence: e2pu1



Espectro de RMN <sup>13</sup>C



Espectro de DEPT



Espectro de HSQC