

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS**

**BIANCA GONÇALVES VASCONCELOS DE ALCÂNTARA**

**METABOLÔMICA E FITOQUÍMICA DE ESPÉCIES DE LAURACEAE E  
AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DAS PRINCIPAIS VIAS INFLAMATÓRIAS POR  
SEUS EXTRATOS E SUBSTÂNCIAS PURIFICADAS**

**Alfenas/MG**

**2018**

**BIANCA GONÇALVES VASCONCELOS DE ALCÂNTARA**

**METABOLÔMICA E FITOQUÍMICA DE ESPÉCIES DE LAURACEAE E  
AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DAS PRINCIPAIS VIAS INFLAMATÓRIAS POR  
SEUS EXTRATOS E SUBSTÂNCIAS PURIFICADAS**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos  
para obtenção do título de Mestre em Química  
pelo Programa de Pós-Graduação em Química da  
Universidade Federal de Alfenas.

Área de concentração: Química Orgânica

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Daniela A. Chagas de Paula

**Alfenas/MG**

**2018**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas

Alcântara, Bianca Gonçalves Vasconcelos de.

A347m Metabolômica e fitoquímica de espécies de Lauraceae e avaliação da inibição das principais vias inflamatórias por seus extratos e substâncias purificadas. / Bianca Gonçalves Vasconcelos de Alcântara -- Alfenas/MG, 2018.

73 f.: il. --

Orientadora: Daniela A. Chagas de Paula.

Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Alfenas, 2018.

Bibliografia.

Ficha Catalográfica elaborada por Fátima dos Reis Goiatá

Bibliotecária-Documentalista CRB6/425

**Bianca Gonçalves Vasconcelos de Alcântara**

**“Metabolômica e Fitoquímica de espécies de Lauraceae e avaliação da inibição das principais vias inflamatórias por seus extratos e substâncias purificadas”**

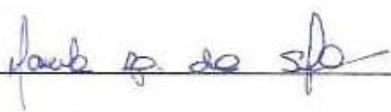
A Banca examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Química Orgânica.

Aprovada em: 17/05/2018

Profa. Dra. Daniela Aparecida Chagas de Paula  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas –  
UNIFAL-MG

Assinatura:  \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Marcelo Aparecido da Silva  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas –  
UNIFAL-MG

Assinatura:  \_\_\_\_\_

Prof. Dr. João Henrique Ghilard Lago  
Instituição: Universidade Federal do ABC –  
UFABC-SP

Assinatura:  \_\_\_\_\_

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer à Deus, ao Deus Pai, Jesus e ao Espírito Santo, por todo o amparo, consolo, fé e tantas vitórias e alegrias! Não teria conseguido chegar aqui sem Ele! Também tenho muito a agradecer à minha mãe, Maria Helena, que sempre cuidou de mim e me apoiou em todos meus sonhos! Louvado seja Deus por sua vida, por ser minha mãe, amo muito você! Agradeço a minha irmã Lara, por estar sempre perto de mim e por sua amizade, você é muito especial para mim!

Em especial também agradeço ao meu namorado Thiago, que sempre esteve perto de mim e aguentou meus momentos de estresse e cansaço. Muito obrigada pelo seu amor e dedicação comigo! Também quero agradecer minha irmã Marielle, que tem tornado minha vida mais especial com seu carinho e zelo por mim.

Agradeço também todas as minhas amigas que sei que torcem pela minha vitória e felicidade, Lídia, Ana Paula, Karoline, aos amigos da minha igreja e é claro aos meus pequeninos do Estação Vida que alegrem meus sábados e encham minha vida de amor, amo cada um de vocês.

Agradeço ao grupo LFQM, que gentilmente abriram as portas para mim e me receberam com muito carinho! Em especial à minha orientadora Dani Chagas, você é única, amiga, generosa, compreensiva, uma verdadeira mestre e exemplo a ser seguido! Sou muito grata à Deus por ter me encaminhado até você!

Agradeço também às professoras Marisi Soares e Danielle Dias por todos os momentos compartilhados no laboratório, pelos conselhos sábios e pelos ensinamentos que sempre vão aperfeiçoando a todos os alunos desse grupo! Muito obrigada por tudo! Agradeço a cada amigo e colega que passou pelo LFQM ao longo desses dois anos, em especial alguns, como minha amiga de tão longa data, Olívia, muito obrigada por ter sido usada por Deus para me apresentar o laboratório e me ajudar a fazer parte dessa equipe. Saiba que você é muito especial para mim e espero que ainda tenhamos muitos momentos juntas!

Também agradeço a Tatiane Maiolini, pela amizade e contribuição no meu projeto! Agradeço ao Welton Rosa, uma pessoa incrível, sempre disposto a ensinar e sempre alegrando nossos dias de laboratório, assim como a Laís que sempre está com um sorriso acolhedor para nós. Agradeço também em especial ao meu amigo pós doc, Mário Santos,

você chegou já quase no final do meu mestrado, mas com certeza nos cativou como se sempre tivesse estado perto! Muito obrigada por todos os ensinamentos e risadas que compartilhamos. Ainda agradeço ao João Baldim por todos os momentos compartilhados e conhecimentos transmitidos! Agradeço também Felipe Policarpo que trabalhou comigo nesse mestrado, obrigada por ajudar que esse projeto chegasse até aqui! E agradeço ainda a Marcela, Aline, Paula, Albert, Cris, Victor, Luíza, Dani Cabral, Dani Garcia, Felipe Bley, Larissa e Patrícia, com certeza cada um de vocês deixou algo especial marcado em minha vida! Agradeço também a Glorinha, por ajudar manter o nosso laboratório sempre em ordem!

Também gostaria de agradecer a todos que contribuíram na minha formação, à toda equipe do ASTEBIOCHEM de Ribeirão Preto, que auxiliou nas análises de UHPLC-UV-HRMS-ESI-ORBITRAP e pelo acesso ao software SIMCA-P. À professora RuAngélie Edrada-Ebel pela contribuição sobre as abordagens metabolômicas, muito obrigada! Ao professor Ivo Caldas, que sempre muito atencioso contribui em minha formação. Ao João Pedro Costa Elias por nos ajudar nas coletas das plantas, muito obrigada! De modo geral agradeço à UNIFAL-MG e todos os funcionários que trabalham para tornar todo esse processo possível e em especial à Marcela, secretária do PPGQ, por sempre auxiliar em todos os momentos. Aos órgãos de fomento, CAPES, CNPQ, FAPEMIG (APQ-02353-17) e FINEP pelos financiamentos que viabilizaram esta pesquisa.

## RESUMO

Neste trabalho, através de abordagens metabolômicas, 19 espécies da família Lauraceae foram submetidas aos estudos massas de alta resolução (UHPLC-UV- HRMS-ESI-Orbitrap), visando-se obter a construção de um modelo capaz de realizar uma predição da atividade anti-inflamatória para espécies desta família ainda não investigadas *in vivo* e, assim, escolher uma espécie promissora para os estudos metabolômicos e fitoquímicos. A espécie *Ocotea odorifera* (Vellozo) Rohwer, que já é uma planta com histórico etnofarmacológico para a atividade anti-inflamatória, mostrou-se promissora no modelo estatístico utilizado, sendo predita por esse como possivelmente ativa na inibição dual das enzimas ciclooxigenase (COX) e lipoxigenase (LOX). Nesse sentido, buscou-se avaliar pela primeira vez esse potencial anti-inflamatório dual, além de utilizar técnicas da fitoquímica clássica para isolamento de um biomarcador da atividade estudada. Assim, primeiramente foi realizada a avaliação do extrato bruto das folhas e as frações da *Ocotea odorifera*, quanto a inibição dual de COX e LOX através de um modelo *in vivo*. E com esses resultados desenvolveu-se um novo modelo metabolômico específico para a *O. Odorífera*, visando guiar o isolamento de um biomarcador. Logo, também foram avaliados os óleos essenciais das folhas e dos galhos da *O. odorifera*, nas concentrações 0,5 e 2,5%, além do decocto das folhas, simulando o modo tradicionalmente utilizado pela população para o tratamento do reumatismo. Após, realizou-se as etapas cromatográficas juntamente com as análises estatísticas visando o isolamento do biomarcador presente na fração rica em alcaloides. Isolou-se da fração clorofórmio, a substância reticulina, um alcaloide muito comum no gênero *Ocotea* sp. A reticulina também foi submetida aos bioensaios. As frações alcaloídica, acetato de etila e hidroetanólica, bem como a reticulina e os óleos essenciais apresentaram atividade anti-edematogênica e inibição do recrutamento de neutrófilos, ou seja, inibindo de forma dual as vias COX e LOX. Já o decocto, demonstrou apenas o efeito anti-edematogênico similar aos fármacos não esteroidais disponíveis no mercado. Esse resultado corrobora o uso popular desta espécie como anti-inflamatória e o uso de estratégias metabolômicas para guiar o isolamento de substâncias com alto potencial farmacológico, bem como proporcionar um direcionamento na escolha de uma espécie já promissora para determinada propriedade.

Palavras-chave: *Ocotea odorifera*. Lauraceae. Inflamação. Metabolômica. Alcaloide.

## ABSTRACT

In this work, 19 species of the Lauraceae family were submitted to high-resolution masses (UHPLC-UV-HRMS-ESI-Orbitrap), aiming to obtain a model capable of predicting the activity -inflammatory for species of this family not yet investigated *in vivo* and, thus, to choose a promising species for the metabolomic and phytochemical studies. The species *Ocotea odorifera* (Vellozo) Rohwer, which is already a plant with an ethnopharmacological history for the anti-inflammatory activity, has shown to be promising in the statistical model used, being predicted by this as possibly active in the dual inhibition of cyclooxygenase (COX) and lipoxygenase (LOX). In this sense, we sought to evaluate for the first time this dual anti-inflammatory potential, in addition to using classic phytochemistry techniques to isolate a biomarker of the studied activity. Thus, the evaluation of the raw leaf extract and the *Ocotea odorifera* fractions were evaluated first, as well as the dual inhibition of COX and LOX through an *in vivo* model. And with these results a new metabolic model was developed specific for the *O. odorifera*, to guide the isolation of a biomarker. Therefore, the essential oils of *O. odorifera* leaves and branches were evaluated in 0.5 and 2.5% concentrations, in addition to leaf decoction, simulating the traditional method used by the population to treat rheumatism. Afterwards, the chromatographic steps were performed together with the statistical analyzes aiming the isolation of the biomarker present in the alkaloid rich fraction. From the chloroform fraction, the substance reticulín was isolated, an alkaloid very common in the genus *Ocotea* sp. Reticulín was also submitted to bioassays. The alkaloid, ethyl acetate and hydroethanolic fractions, as well as reticulín and essential oils showed anti-edematogenic activity and inhibition of neutrophil recruitment, that is, dual inhibition of the COX and LOX pathways. The decoction, however, demonstrated only the anti-edematogenic effect like the nonsteroidal drugs available in the market. This result corroborates the popular use of this species as anti-inflammatory and the use of metabolomic strategies to guide the isolation of substances with high pharmacological potential, as well as to provide a guide in the selection of an already promising species for a given property.

Key words: *Ocotea odorifera*. Lauraceae. Inflammation. Metabolomics. Alkaloid.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Principais vias da cascata do ácido araquidônico .....	20
Figura 2 -	Estrutura química do Zileuton.....	21
Figura 3 -	Estrutura química dos fármacos aspirina, indometacina e cetoprofeno.....	22
Figura 4 -	Estrutura química dos fármacos meloxicam, naproxeno, nimesulide, celecoxibe e rofecoxibe.....	22
Figura 5 -	Estrutura química do hormônio cortisol e dos fármacos dexametasona e betametasona.....	23
Figura 6 -	Estrutura química do licofelone.....	24
Figura 7 -	Estrutura química de algumas classes de compostos presentes na família Lauraceae.....	25
Figura 8 -	Estrutura química da colchicina.....	25
Figura 9 -	<i>Ocotea odorifera</i> (Vell.) Rohwer.....	26
Figura 10 -	Estrutura química do safrol.....	27
Figura 11 -	Fluxograma do processo cromatográfico para obtenção do composto isolado.....	35
Figura 12 -	Oxidação da 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina a 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina-diimina .....	39
Figura 13 -	Cromatograma (modo positivo) de todos os extratos sobrepostos, obtidos através de UPLC-UV-HRFTMS.....	40
Figura 14 -	Avaliação da atividade anti-inflamatória do extrato bruto e frações e decocto no modelo de edema de orelha em camundongos.....	44
Figura 15 -	Efeito do extrato bruto e frações e decocto no recrutamento de neutrófilos via dosagem de mieloperoxidase (MPO).....	46
Figura 16 -	Cromatograma (modo positivo) do extrato bruto e frações de <i>O. odorifera</i> sobrepostos, obtidos através de UPLC-UV HRFTMS.....	47
Figura 17 -	Distribuição do extrato bruto e frações de <i>O. odorifera</i> obtidos na análise por PCA.....	48
Figura 18 -	Distribuição dos extratos de <i>O. odorifera</i> de acordo com a propriedade anti-inflamatória obtidos na análise por PLS.....	49
Figura 19 -	VIPs correlacionadas com a atividade anti-inflamatória do extrato bruto e frações.....	50

Figura 20 -	Visão geral dos coeficientes correlacionados com a atividade anti-inflamatória do extrato bruto e frações.....	51
Figura 21 -	Ampliação dos coeficientes correlacionados com a atividade anti-inflamatória do extrato bruto e frações.....	51
Figura 22 -	Cromatograma do grupo 12, obtido da fração alcaloídica por HPLC-UV-DAD.....	54
Figura 23 -	Estrutura química da reticulina.....	55
Figura 24 -	Espectro de massas da reticulina.....	70
Figura 25 -	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da reticulina, 300 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> .....	70
Figura 26 -	Ampliação do espectro de RMN de $^1\text{H}$ da reticulina, 300 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> .....	71
Figura 27 -	Ampliação do espectro de RMN de $^1\text{H}$ da reticulina, 300 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> .....	71
Figura 28 -	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da reticulina, 75 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> .....	72
Figura 29 -	DEPT 135 da reticulina, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> .....	72
Figura 30 -	Estrutura química dos compostos majoritários do óleo essencial dos galhos de <i>O. odorifera</i> .....	58
Figura 31 -	Estrutura química dos compostos majoritários dos óleos essenciais das folhas de <i>O. odorifera</i> .....	59
Figura 32 -	Avaliação da atividade anti-inflamatória dos óleos essenciais e reticulina no modelo de edema de orelha em camundongos.....	60
Figura 33 -	Efeito dos óleos essenciais e reticulina no recrutamento de neutrófilos via dosagem de mieloperoxidase (MPO).....	62

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Identificação das espécies da família Asteraceae utilizadas para construção do modelo de predição.....	32
Tabela 2 -	Predição da atividade anti-inflamatória dos extratos de Lauraceae, obtida no software SIMCA-P.....	41
Tabela 3 -	Percentagem de inibição do edema de orelha do extrato bruto, frações e decocto de <i>O. odorifera</i> .....	44
Tabela 4 -	Avaliação do recrutamento de neutrófilos do extrato bruto, suas frações e decocto de <i>O. odorifera</i> .....	46
Tabela 5 -	Desreplicação das VIPs correlacionadas com a atividade anti-inflamatória pela análise PLS, do extrato bruto e frações de <i>O. odorifera</i> , no modo positivo.....	53
Tabela 6 -	Rendimento da substância isolada da fração alcaloídica.....	54
Tabela 7 -	Dados de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ da reticulina, 300 MHz, DMSO- $d_6$ .....	56
Tabela 8 -	Desreplicação do óleo essencial dos galhos obtido de <i>O. odorifera</i> .....	57
Tabela 9 -	Desreplicação do óleo essencial das folhas obtido de <i>O. odorifera</i> .....	58
Tabela 10 -	Percentagem de inibição do edema de orelha dos óleos essenciais de <i>O. odorifera</i> , da reticulina e dos controles positivos.....	60
Tabela 11 -	Avaliação do recrutamento de neutrófilos dos óleos essenciais e da reticulina.....	61

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	-	Ácido araquidônico
Ac	-	Acetato
AIEs	-	Anti-inflamatórios esteroidais
AINEs	-	Anti-inflamatórios não esteroidais
ANOVA	-	Análise de variância - Erro médio padrão
Ca	-	Caule
CC	-	Cromatografia em coluna
CCD	-	Cromatografia em camada delgada
CEUA	-	Comissão de Ética no Uso de Animais
Cl	-	Fração clorofórmio
CONCEA	-	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
COSY	-	<i>Correlation Spectroscopy</i>
COX	-	Ciclooxigenase
CYP	-	Citocromo P450
d	-	Dubleto
DAD-UV/Vis	-	Detector ultravioleta-visível com arranjo de diodos
dd	-	Duplo dubleto
DEPT	-	<i>Distortion Leds Enhancement by Polarization Transfer</i>
DMSO	-	Dimetilsufóxido MeCN - Acetonitrila
DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub>	-	Dimetilsufóxido deuterado
DNP	-	<i>Dictionary of Natural Products</i>
EtB	-	Extrato bruto
EDTA	-	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
ESI	-	Ionização por electrospray
Et	-	Fração hidroetanólica
FM	-	Fórmula molecular
Fo	-	Folhas
HCA	-	<i>Hierarchical cluster analysis/</i> Análise hierárquica de agrupamentos
HPLC	-	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HRGC	-	<i>High Resolution Gas Chromatography</i>
HRMS	-	<i>High Resolution Mass Spectrometry</i>

HTS	-	<i>High-throughput screening</i>
Hz	-	Hertz
ID	-	Número de identificação
IK	-	Índice de <i>Kovats</i>
IS	-	Índice de similaridade
J	-	Deslocamento químico
LC	-	<i>Liquid Chromatography</i>
LFQM	-	Laboratório de Fitoquímica e Química Medicinal
LOX	-	Lipoxigenase
LTB4	-	Leucotrieno B4
MeOH	-	Metanol
ML3000	-	Licofelone
<i>m/z</i>	-	massa/carga
MS	-	<i>Mass Spectrometry</i>
<i>O. odorifera</i>	-	<i>Ocotea odorifera</i>
OPSL	-	<i>Orthogonal Partial Least Squares/</i> Método dos mínimos quadrados parciais ortogonais
PCA	-	<i>Principal component analysis/</i> Análise de componentes principais
PGs	-	Prostaglandinas
PGE2	-	Prostaglandina E2
PLA2	-	Fosfolipase A2
PLS	-	<i>Partial Least Squares/</i> Método dos mínimos quadrados parciais
Q2	-	Coefficiente de correlação
R2	-	Coefficiente de correlação
RDBE	-	<i>Ring double bond equivalentes</i>
RMN de <sup>13</sup> C	-	Ressonância magnética nuclear de carbono
RMN de <sup>1</sup> H	-	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN	-	Ressonância Magnética Nuclear
rpm	-	Rotação por minuto
s	-	Singleto
t	-	Tripleto
TMB	-	3,3',5,5'-tetrametilbenzidina
TOF	-	<i>Time-of-flight</i>

$t_R$	-	Tempo de retenção
UHPLC	-	<i>Ultra-High-Performance Liquid Chromatography</i>
VIP	-	Variável importante para a projeção
X	-	Variáveis preditoras
Y	-	Variáveis dependentes
$\delta C$	-	Deslocamento químico do carbono
$\delta H$	-	Deslocamento químico do hidrogênio
$\lambda$	-	Comprimento de onda

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	17
2.1	METABOLÔMICA .....	17
2.2	ASPECTOS DA INFLAMAÇÃO .....	19
2.4	FAMÍLIA LAURACEAE .....	24
2.5	GÊNERO <i>OCOTEA</i> .....	25
2.6	ESPÉCIE <i>OCOTEA ODORIFERA</i> (VELL.) ROHWER .....	26
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	28
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	28
4.1	OBJETIVO GERAL.....	28
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	29
<b>5</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	29
5.1	METABOLÔMICA .....	29
5.2	ESTUDO FITOQUÍMICO DA ESPÉCIE SELECIONADA .....	33
5.3	PREPARO DO DECOCTO E EXTRAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS .....	35
5.4	ANÁLISE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>O. odorifera</i> POR CG-MS.....	36
5.5	DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL .....	36
5.6	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA .....	36
5.6.1	Animais .....	37
5.6.2	Edema de orelha .....	37
5.6.3	Ensaio de MPO para avaliar recrutamento de neutrófilos .....	38
<b>6</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	39
6.1	METABOLÔMICA .....	39
6.2	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA .....	43
6.2.1	Edema de orelha .....	43
6.2.2	Ensaio de MPO para avaliar recrutamento de neutrófilos .....	45
6.3	METABOLÔMICA DA ESPÉCIE ESCOLHIDA .....	47
6.4	DESREPLICAÇÃO .....	52
6.5	ESTUDO FITOQUÍMICO .....	54
6.6	DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL .....	55
6.7	ANÁLISE DOS COMPONENTES DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>O. odorifera</i> .....	56
6.8	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DOS ÓLEOS E RETICULINA....	59
6.8.1	Edema de orelha .....	59
6.8.2	Ensaio de MPO para avaliar recrutamento de neutrófilos .....	61

<b>8 CONCLUSÃO .....</b>	<b>63</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>64</b>
<b>APÊNDICE .....</b>	<b>70</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O reconhecimento da composição química presente em produtos naturais vem ganhando um grande destaque nos últimos anos, pois possibilita triagens por substâncias desejadas e isolamentos bioguiados, visando determinada propriedade. Muitas das vezes essa propriedade é de ordem terapêutica, visto que existem diversos fármacos e medicamentos no mercado que são de origem natural. Apesar de ser reconhecida a importância dos produtos naturais na busca de novos compostos, faz-se necessário o uso de abordagens mais abrangentes e sensíveis, como as estratégias metabolômicas, associadas as técnicas convencionais da fitoquímica clássica (HUR et al., 2013; KURITA; GLASSEY; LININGTON, 2015).

A estratégia denominada como metabolômica traz uma abordagem geral do organismo através de procedimentos técnicos e analíticos que garantam sensibilidade e reprodutibilidade analítica, resultando em um perfil completo, quantitativamente e qualitativamente. Já uma análise mais rápida visando obter apenas informações de um grupo específico de metabólitos de determinada via ou classe metabólica, têm-se o chamado perfil metabólico. O perfil metabólico pode ser dividido ainda em *fingerprinting* e *footprinting*. *Fingerprinting*, chamada de impressão digital metabólica, considera padrões e diferenças dos metabólitos intracelulares de amostras, permitindo assim uma comparação entre elas. Enquanto o *footprinting*, um termo ainda pouco utilizado, expressa esses padrões e diferenças quanto aos metabólitos extracelulares (ERNST et al., 2014; FIEHN, 2002; WOLFENDER et al., 2015).

Os metabólitos de baixa massa molecular, aqueles com massa menor que 1000 Da, presentes em um organismo ou matriz biológica, são denominados como metaboloma (GROMSKI et al., 2015; WOLFENDER et al., 2015). As diferentes metodologias que podem ser empregadas para analisar o metaboloma, podem ser classificadas como metabolômica alvo (*targeted*), que tem como foco um conjunto de metabólitos conhecidos e metabolômica global ou não-direcionada (*untargeted*), que avalia os perfis metabolômicos de forma mais global (GORROCHATEGUI et al., 2016).

Qualquer uma das estratégias metabolômicas permite o estudo de matrizes extremamente complexas, como é o caso dos extratos vegetais, que possuem uma composição muito grande e diversificada. Sendo que um amplo conjunto de dados espectroscópicos ou espectrométricos são gerados e devem ser processados e analisados por diferentes abordagens analíticas e estatísticas, visando o resultado que se espera obter. Entre as ferramentas que podem ser utilizadas inclui-se softwares que permitem refinar esses dados, além de outros que permitem fazer análise estatística multivariada dos dados. Através de análises estatísticas é possível classificar as amostras de acordo com seu perfil químico ou monitorar variações na composição de determinadas espécies,

de acordo com mudanças ambientais e climáticas, ou ainda predizer uma atividade biológica ou determinar aqueles compostos relacionados com a mesma, dentre outras aplicações (CHAGAS-PAULA et al., 2015b; SUMNER et al., 2014). Além disso, é possível realizar a desreplicação dos dados acelerando processos de caracterização, identificação e isolamento de substâncias (NIELSEN et al., 2011).

A inflamação consiste em uma reação do organismo frente a diferentes estímulos, e está associada a diversas doenças, podendo apresentar-se de forma aguda ou crônica. Seu tratamento ou controle se dá através do uso de agentes anti-inflamatórios. Os anti-inflamatórios estão entre a classe de medicamentos mais utilizados, contudo eles apresentam eficácia limitada e efeitos adversos, principalmente quando utilizados em tratamentos mais longos ou em situações de cronicidade. Dessa forma, a busca contínua por novos agentes anti-inflamatórios é primordial, visando substâncias que possam ser mais bem toleradas, gerando menos efeitos adversos e possuindo uma eficácia mais acentuada. Nesse contexto, os agentes anti-inflamatórios são capazes de inibir mais de uma via da cascata da inflamação, como a inibição dual das vias COX e LOX, revelam uma alternativa promissora para novos fármacos (CARDINAL et al., 2015; CHAGAS-PAULA, 2013).

A família Lauraceae está presente em países com clima tropical e subtropical. Ela compreende muitos gêneros e espécies, distribuídos principalmente na Ásia e América. Possui cerca de 67 gêneros, com mais de 2500 espécies, sendo que o Brasil abriga cerca de 25 gêneros e mais de 400 espécies (CUSTÓDIO; FLORÊNCIO, 2014). Sendo que o gênero *Ocotea* sp. representa uma importante fonte de espécies com interesse ao homem, como por exemplo a espécie *Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer, conhecida popularmente como sassafrás, que apresenta relato etno-farmacológico, demonstrando propriedades anti-inflamatórias, sendo utilizada na forma de decocto para tratamento crônico da reumatismo (TRIBESS et al., 2015). Nesse contexto, a espécie *O. odorifera* representa um importante alvo para estudos voltados à atividade anti-inflamatória sendo que não há relato científico sobre esta propriedade de seus extratos ou substâncias isoladas. Além disso, as demais espécies desta família também merecem estudos, em especial aquelas presentes em áreas remanescentes da Mata Atlântica, considerado um bioma *hotspot*, sob risco de extinção prioritário para estudo e preservação (GONTIJO; BRANDÃO; GONTIJO, 2017).

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

Nesta seção serão apresentados os principais assuntos abordados neste projeto.

### 2.1 METABOLÔMICA

As técnicas fitoquímicas tradicionais já são utilizadas há anos, exibindo um papel importante na descoberta de novos compostos e substâncias com determinada propriedade farmacológica (NEWMAN; CRAGG, 2016). Com o advento cada vez mais pronunciado de técnicas analíticas sensíveis e reprodutíveis, a fitoquímica pode então ser aliada à metabolômica para guiar o isolamento de substâncias ativas e/ou inéditas, mesmo que sejam minoritárias (DAVID B; WOLFENDER; DIAS, 2015).

As abordagens metabolômicas são realizadas empregando-se técnicas com alta sensibilidade e seletividade, com reprodutibilidade analítica, além de permitirem obtenção de resultados muito mais rápidos. As principais técnicas empregadas incluem a cromatografia líquida (LC) de alta e de ultra-alta eficiência (HPLC e UHPLC, respectivamente), a cromatografia gasosa de alta resolução (HRGC), a ressonância magnética nuclear (RMN), a espectrometria de massas de alta resolução, com diversas fontes de ionização e analisadores, além de outras técnicas menos empregadas, como a eletroforese capilar, acoplada a espectrômetro de massas (MS) ou ultravioleta-visível com arranjo de diodos (DAD-UV/Vis) (ARETZ; MEIERHOFER, 2016; GORROCHATEGUI et al., 2016).

É importante mencionar que não existe um único método analítico ideal capaz de detectar todos os metabólitos, de diferentes massas, polaridades e propriedade físico-químicas, em uma única análise. Portanto, é comum verificar a associação de métodos capazes de analisar a faixa de compostos de interesse para o estudo. Dentre estes, uma das hifenações comuns é a cromatografia líquida de alta ou ultra alta eficiência acoplada a espectrometria de massas com fonte de ionização tipo *electrospray* e analisador de alta resolução de tecnologia *Orbitrap* (UHPLC-UV-HRMS-ESI-*Orbitrap*) (SUMNER; MENDES; DIXON, 2003). O *electrospray* (ESI) é um dos métodos de escolha, sendo capaz de ionizar a grande maioria dos metabólitos comuns em estudos metabolômicos, exceto substâncias sem grupos funcionais específicos ou que sofrerem supressão iônica pela presença de sal e outras variáveis na amostra (CROTTI, 2006). Sendo que o analisador *Orbitrap*<sup>TM</sup> registra a oscilação dos íons, cuja frequência fornece informações sobre a massa do íon com alta resolução (LIU; LOCASALE, 2017).

Essas técnicas isoladas e muitas vezes em associação garantem a quantificação e determinação qualitativa de grande parte das classes de substâncias, que são quimicamente

diferentes entre si (ARETZ; MEIERHOFER, 2016). A faixa dinâmica dos analisadores dos espectrômetros de massas tem melhorado, então, permite avaliar metabólitos que estão presentes em diversas concentrações na amostra. Através da RMN é possível obter a elucidação estrutural de um composto, bem como uma visão geral dos metabólitos presentes em uma amostra mais complexa, contudo, a RMN não apresenta uma sensibilidade tão alta como a MS, assim, a associação dessas duas técnicas se torna uma ferramenta importante para a metabolômica (KELLOGG et al., 2016).

Após obtenção do conjunto de dados gerados, estes devem sofrer um processo de tratamento e refinamento, onde os dados brutos são transformados em um formato específico para ser analisado por determinado software. Há vários softwares disponíveis destinados ao tratamento de dados metabolômicos, sendo que o MZmine (<http://sourceforge.net/projects/mzmine/>), é o software utilizado neste trabalho (YI et al., 2016).

Durante o processamento de dados nesse software, várias etapas são realizadas, afim de tornar os dados mais refinados para as análises estatísticas futuras. Algumas etapas importantes consistem na filtragem, detecção de picos, deconvolução, a eliminação dos isótopos, alinhamento, *gapfilling*. Através do método de filtragem os ruídos dos dados são reduzidos. A etapa de detecção de picos permite identificar todos os sinais correspondentes aos íons, evitando que sejam detectados falsos positivos. A deconvolução separa os picos que estão sobrepostos. Os isótopos são eliminados, restando apenas a massa monoisotópica com peso molecular maior. O alinhamento dos picos permite corrigir as diferenças de tempo de retenção de um mesmo metabólito nas diferentes corridas. Já o *gapfilling* busca por substâncias que podem estar presentes na amostra, mas que possivelmente devem ter ficado abaixo dos parâmetros de corte (KATAJAMAA; OREŠIČ, 2007; YI et al., 2016).

Após os dados metabolômicos serem devidamente tratados, eles podem então ser analisados estatisticamente por diversos softwares com distintas metodologias. Um software muito utilizado é o SIMCA-P; nele é possível realizar análises supervisionadas e não supervisionadas. Dentre essas pode-se citar os métodos de regressão multivariada não supervisionados, que geram gráficos de análise de componentes principais (PCA) e análise hierárquica de agrupamentos (HCA), que exploram de modo geral um conjunto de dados, verificando tendências e formando conglomerados de dados ou *clusters* de acordo com as similaridades das amostras (CHAGAS-PAULA et al., 2015b).

Enquanto que os métodos supervisionados avaliam conjuntos de dados conhecidos, afim de verificar padrões e regras para classificar amostras, determinar biomarcadores e prever informações sobre novos dados, como por exemplo quanto a atividades farmacológicas, através da comparação por similaridade com amostras já sabidamente ativas e não ativas. Os métodos supervisionados podem ser classificados como lineares, tais como o método dos mínimos

quadrados parciais (PLS), o método dos mínimos quadrados parciais ortogonais (OPSL), sendo que os métodos lineares permitem a identificação de biomarcadores mais facilmente a partir do modelo. Também existem os métodos não lineares, como é o caso das redes neurais artificiais (ANN) e algoritmo genético (GOLBRAIKH; TROPSHA, 2002; MAHADEVAN et al., 2008; MADSEN; LUNDSTEDT; TRYGG; HOLMES, 2007; YI et al., 2016).

Após o devido tratamento de dados, é possível realizar o processo de desrepliação. Neste processo a massa exata do composto, descrita através da chamada razão massa/carga ( $m/z$ ) de seus prováveis íons, permite uma comparação com bases de dados, possibilitando uma avaliação preliminar da composição presente na amostra. Essas medições de massas precisas reduzem o número de composições elementares previstas, o que facilita as buscas em bancos de dados de substâncias (NIELSEN et al., 2011). A desrepliação pode ser efetuada tanto para os biomarcadores de determinada atividade biológica encontrados nas análises estatísticas, como também pode ser realizada para o toda a amostra/extrato desejado.

Esse processo pode ser realizado no próprio MZmine, utilizando-se bancos de dados abrangentes como o DNP<sup>®</sup> ou banco de dados específico para determinada espécie estudada. Ainda pode ser realizada em softwares como o Qualbrowser/Xcalibur<sup>®</sup>, onde são geradas possíveis fórmulas moleculares para uma dada  $m/z$ . Considera-se ainda diversos parâmetros para chegar a fórmula molecular mais provável para aquele dado, tais como padrão isotópico, regra no N, entre outras. A desrepliação pode ainda guiar o isolamento de substâncias potencialmente inéditas, que não tenham nenhum *hit* (candidato, substâncias relatada) para a fórmula molecular encontrada em nenhum banco de dados abrangente ou relato na literatura (CHAGAS-PAULA et al., 2015b; TAWFIK et al., 2017).

## 2.2 ASPECTOS DA INFLAMAÇÃO

A inflamação é uma condição presente em diversas patologias e está associada tanto em processos agudos quanto crônicos. Pode ser considerada como um agente responsável por desencadear inúmeras outras enfermidades como, por exemplo, a artrite reumatoide, a asma, doenças cardiovasculares, obesidade, diabetes, osteoporose, doença de Alzheimer, certos tipos de cânceres e o acidente vascular cerebral. O processo inflamatório consiste em uma resposta de defesa do organismo frente à algum dano, desordem ou lesão, que podem ser gerados por micro-organismos, traumas físicos ou agentes químicos (MEDZHITOV, 2010; SLAVICH, 2015).

Frente a esse dano, ocorre liberação do ácido araquidônico (AA) presente na membrana fosfolipídica das células, pela ação da enzima fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) (Figura 1). O ácido araquidônico liberado, consiste em um ácido graxo poli-insaturado de 20 carbonos, membro da série de ácidos graxos ômega-6 (PARENTE, 2001). O ácido araquidônico será então

metabolizado por diferentes enzimas envolvidas na cascata da inflamação, levando à liberação de diferentes mediadores atuantes no processo inflamatório (PARENTE, 2001; SLAVICH, 2015).

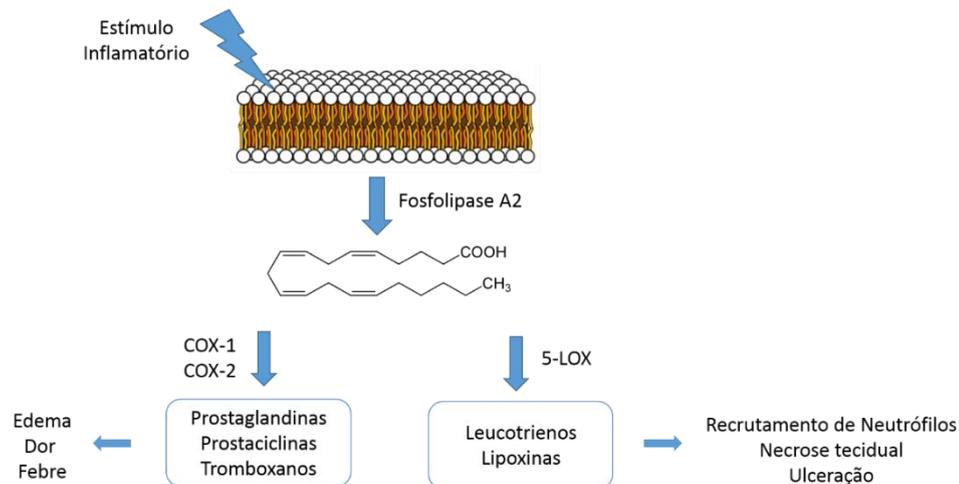


Figura 1 – Principais vias da cascata do ácido araquidônico.

Fonte: Do autor.

A enzima ciclooxigenase (COX), está presente em três isoformas, sendo as mais estudadas COX-1 e COX-2, e a recém-descoberta COX-3. A maioria dos anti-inflamatórios agem inibindo seletivamente a isoforma COX-2 e em menor proporção a COX-1. A ação anti-inflamatória exibida por tais medicamentos está relacionada a inibição seletiva da COX-2, enquanto os efeitos adversos exibidos pelos mesmo, principalmente no trato gastrointestinal, está relacionado a inibição da COX-1. Isso porque a COX-1 está associada com a regulação e proteção de algumas funções, como a homeostase dependente de plaquetas, a integridade da mucosa gástrica e a regulação do fluxo sanguíneo renal. Quando a via da COX é inibida, não há a formação de mediadores inflamatórios prostanóides, como as prostaglandinas (PGs), tromboxanos (TXs) e prostaciclina (MEIRER, STEINHILBER, PROSCHAK, 2014; PARENTE, 2001).

Uma outra via muito importante na cascata da inflamação envolve a enzima lipoxigenase (LOX), uma dioxigenase. Essa é responsável pela produção dos mediadores inflamatórios leucotrienos (LCs) e as lipoxinas (LX). Esses mediadores são responsáveis pelo recrutamento das células de defesa, em especial os neutrófilos. Os leucotrienos apresentam um sistema trieno conjugado de duplas ligações, sendo considerados mediadores que regulam a resposta imune inata e desempenham um papel significativo nas doenças inflamatórias crônicas. As drogas que visam a via LOX podem atuar em diferentes estágios, como inibição direta de LOX, inibição da proteína ativadora da LOX, inibição de intermediários na formação do leucotrieno, bem como antagonismo do receptor de LCs. Os primeiros inibidores da via LOX foram desenvolvidos há mais de 25 anos, mas o único aprovado para o mercado em diversos países, assim como para os EUA, ainda é

Zileuton, nome comercial Zyflo (Figura 2), um medicamento usado para o tratamento da asma crônica persistente, apresenta restrições devido a sua toxicidade hepática e meia-vida curta (MEDZHITOV, 2010; MEIRER; STEINHILBER; PROSCHAK, 2014; PARENTE, 2001).

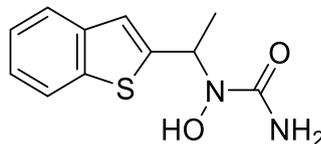


Figura 2 – Estrutura química do Zileuton.

Fonte: Do autor.

O sistema enzimático P450 também pode levar a metabolização do AA, formando ácidos epoxieicosatrienóicos (EET). Essas substâncias são agentes com propriedades anti-inflamatória, anti-hipertensiva, além de atenuarem a agregação plaquetária (MEIRER; STEINHILBER; PROSCHAK, 2014).

Os mediadores da inflamação gerados durante o processo inflamatório podem atuar de diferentes formas. As PGs agem como mediadores inflamatórios e da dor, especialmente a PGE<sub>2</sub>, que é responsável por sintomas como aumento da permeabilidade vascular, formação de edema, vermelhidão e dor. No trato gastrointestinal, as PGs inibem a secreção de ácido clorídrico e pepsina, melhoram o fluxo sanguíneo da mucosa gástrica e estimulam a formação de muco, bem como a secreção de bicarbonato (PARENTE, 2001).

Os leucotrienos exibem uma associação importante nas doenças inflamatórias crônicas, sendo o leucotrieno B<sub>4</sub> (LCB<sub>4</sub>) um dos principais envolvidos nesta via. Eles são considerados quimiotáticos sobre os neutrófilos e macrófagos, células da defesa imune do hospedeiro envolvidas nas reações inflamatórias, levando à degranulação e liberação de enzimas lisossômicas e citocinas, acarretando em lesão tecidual. Os leucotrienos também estão envolvidos em reações de hipersensibilidade imediata, além de serem constritores potentes da musculatura lisa das vias aéreas, levando à broncoconstrição (MEIRER; STEINHILBER; PROSCHAK, 2014; PARENTE, 2001).

Desta forma, considerando que a os principais mediadores pró-inflamatórios, PGE<sub>2</sub> e LCB<sub>4</sub>, são oriundos das vias COX e LOX, respectivamente, um agente anti-inflamatório não esteroideal capaz de promover uma inibição dual dessas vias, seria um promissor fármaco no tratamento dos processos inflamatórios (MEIRER; STEINHILBER; PROSCHAK, 2014; MENG; LIU; LAI, 2015).

A classe de medicamentos mais utilizada no mundo é a dos anti-inflamatórios. Esses podem ser classificados como anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) e anti-inflamatórios esteroidais (AIEs). Os AINEs atuam na cascata da inflamação sobre as enzimas COX-1 e COX-

2, agindo não seletivamente em ambas as enzimas, acarretando na diminuição do principal mediador dessa via, a PGE<sub>2</sub>. Alguns desses medicamentos incluem a aspirina, a indometacina e o cetoprofeno (Figura 3). Dessa forma, esses agentes diminuem os sintomas agudos da inflamação, porém por não serem seletivos, apresentam efeitos adversos gastrointestinais pela inibição da enzima COX-1 (CHAGAS-PAULA et al., 2015a; MEIRER; STEINHILBER; PROSCHAK, 2014).

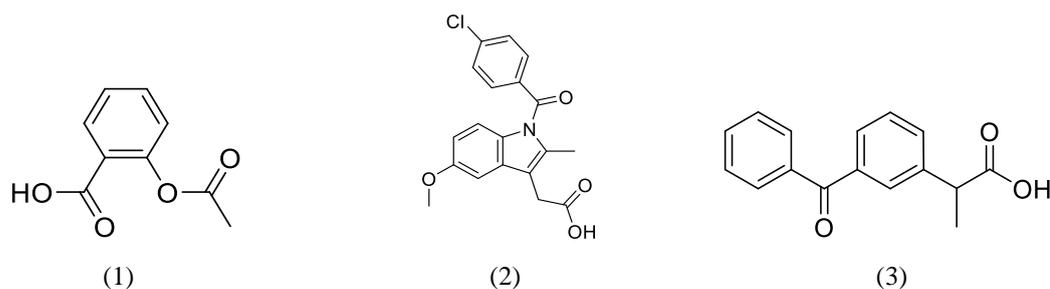


Figura 3 – Estrutura química dos fármacos aspirina (1), indometacina (2) e cetoprofeno (3).

Fonte: Do autor.

Em decorrência dessa ausência de seletividade, desenvolveu-se os inibidores seletivos de COX-2, os chamados coxibes (Figura 4); esses apresentam as mesmas propriedades anti-inflamatórias, anti-pirais e analgésicas observadas nos AINEs tradicionais, contudo não apresentam os efeitos adversos decorrentes da inibição de COX-1 (PARENTE, 2001).

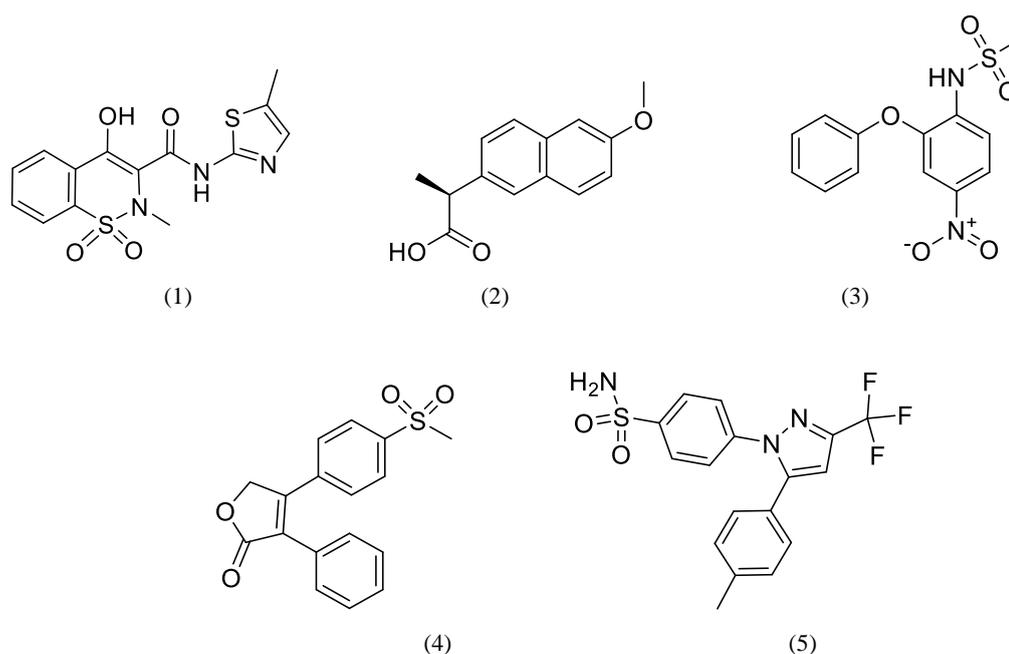


Figura 4 – Estrutura química dos fármacos meloxicam (1), naproxeno (2), nimesulide (3) celecoxibe (4) e rofecoxibe (5).

Fonte: Do autor.

Estes inibidores foram classificados quanto ao grau de inibição da COX-2 em: inibidores seletivos da COX-2 de primeira geração, onde encontram-se: meloxicam, naproxeno e nimesulide; e inibidores altamente seletivos da COX-2, de segunda geração, como celecoxibe, rofecoxibe, entre outros. Porém, devido a efeitos adversos cardiovasculares severos, vários coxibes foram retirados do mercado (MENG; LIU; LAI, 2015; MINUTOLI et al., 2015; PARENTE, 2001).

Os AIEs, também chamados corticoides ou glicocorticóides, são medicamentos utilizados principalmente nas doenças crônicas. Dentre os corticoides disponíveis no mercado pode-se citar a dexametasona e a betametasona (Figura 5). A eficácia desses fármacos no alívio de distúrbios inflamatórios ocorre devido a mimetização dos efeitos do hormônio cortisol (Figura 5), exibindo fortes efeitos anti-inflamatórios e imunossupressores. Eles inibem tanto as manifestações agudas quanto as crônicas da inflamação, isto é, não apenas o rubor, o calor, a dor e o edema iniciais, mas também os estágios posteriores de cicatrização e reparo de feridas e reações proliferativas observadas na inflamação crônica. Porém, esses medicamentos exibem significativos efeitos colaterais, como o retardo de crescimento em crianças, imunossupressão, hipertensão, osteoporose e distúrbios metabólicos, entre outros. Todas estas propriedades nocivas contraindicam a terapia prolongada com os corticoides (NEWTON, 2014; RHEN; CIDLOWSKI, 2005).

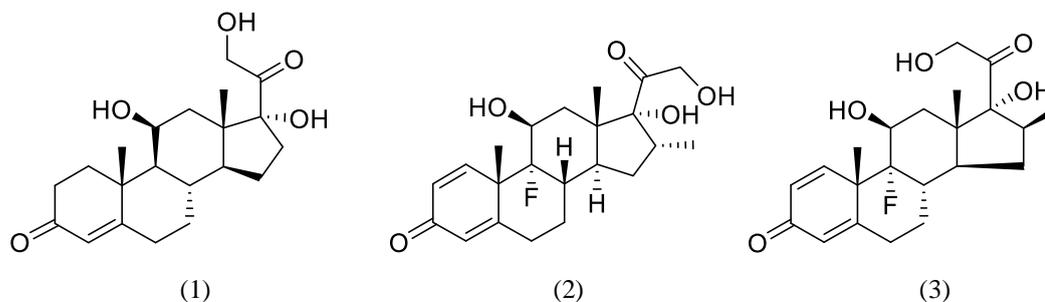


Figura 5 – Estrutura química do hormônio cortisol (1) e dos fármacos dexametasona (2) e betametasona (3).

Fonte: Do autor.

Devido a todos esses efeitos adversos observados nas terapias anti-inflamatórias disponíveis e a escassez de medicamentos não esteroidal que atuem em mais de uma via da cascata da inflamação, torna-se essencial a busca por substâncias multialvos. Nesse sentido a busca por compostos que inibem a via da COX e a via da LOX, representa uma importante alternativa para tratamentos anti-inflamatórios (CHAGAS-PAULA et al., 2015a; MEIRER; STEINHILBER; PROSCHAK, 2014).

A indústria farmacêutica já vem explorando substâncias que possuam mecanismo dual, atuando nas vias COX e LOX, como o licofelone (ML 3000) (Figura 6), que está na fase III dos testes clínicos e possui indicação terapêutica para o tratamento da osteoartrite (KAUR; SILAKARI, 2017).

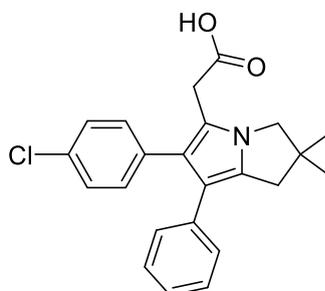


Figura 6 – Estrutura química do licofelone.

Fonte: Do autor.

Para avaliar o potencial de inibição dual da via da COX e da via da LOX, utiliza-se o ensaio anti-inflamatório *in vivo* de edema de orelha induzido por óleo de cróton. Observando a diminuição ou não da formação do edema nas orelhas dos animais tratados com agentes anti-inflamatórios, pode-se constatar a inibição ou não da via da COX. Ainda neste ensaio, a inibição da via da LOX é avaliada através da dosagem de mieloperoxidase (MPO), uma enzima expressa pelos neutrófilos, sendo que pequenas concentrações dessa enzima na orelha indica que poucos neutrófilos foram recrutados e que houve considerável inibição da via da LOX (SOSA et al., 2002; TUBARO; DRI; MELATO; et al., 1986a; TUBARO; DRI; DELBELLO; et al., 1986b).

## 2.4 FAMÍLIA LAURACEAE

A família Lauraceae consiste em cerca de 2500 espécies, distribuídas em torno de 67 gêneros. Encontram-se em regiões de clima tropical e subtropical, predominando no sudoeste da Ásia e na América do Sul. Sendo que o Brasil abriga cerca de 25 gêneros e mais de 400 espécies. As espécies da família Lauraceae são amplamente utilizadas pelo homem, tanto na medicina popular, quanto pela indústria alimentícia e madeireira ( CUSTÓDIO; FLORÊNCIO, 2014; YAMAGUCHI et al., 2011).

A composição química de espécies da família Lauraceae é diversificada, várias classes de substâncias são descritas (Figura 7), dentre elas: alcaloides, flavonoides, cumarinas, lignanas, neolignanas, derivados do ácido cinâmico, derivados nitro, ésteres de benzoíla, pironas, acetilenos, sesquiterpenos e lactonas sesquiterpênicas.

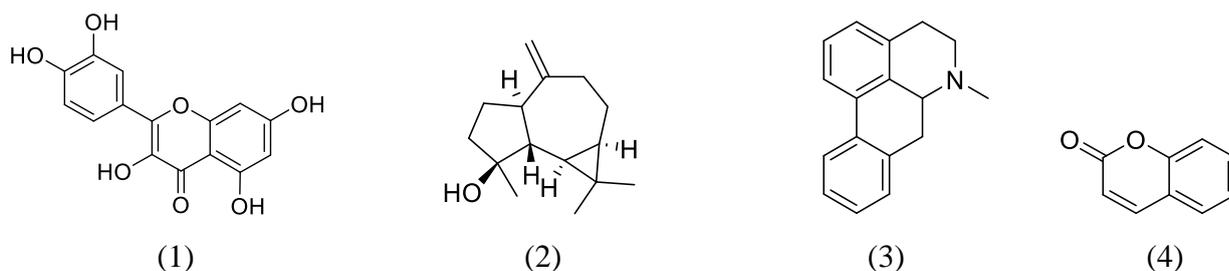


Figura 7 – Estrutura química de algumas classes de compostos presentes na família Lauraceae.

Fonte: Do autor.

Nota: (1) Quercetina representando os uma classe dos flavonoides; (2) espatulenol representando uma das classes dos sesquiterpeno; (3) aporfina representando uma classe de alcaloides e (4) representando a classe das cumarinas.

Algumas substâncias, apesar de terem grande potencial anti-inflamatório, como as lactonas sesquiterpênicas e os alcaloides, geralmente podem apresentar toxicidade associada. No entanto, mesmo as classes de substâncias com potencial tóxico podem ter eficácia relevante e merecem ser estudadas, a colchicina (Figura 8), por exemplo, é um alcaloide muito utilizado na clínica médica para o tratamento de reumatismo e vasculite leucocitoclástica (BARBOSA-FILHO et al., 2006; CUSTÓDIO; FLORÊNCIO, 2014; YANG et al., 2017).

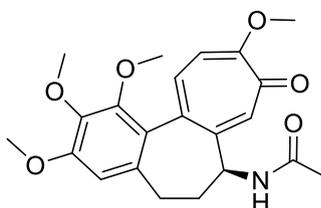


Figura 8 – Estrutura química da colchicina.

Fonte: Do autor.

## 2.5 GÊNERO *OCOTEA*

O gênero *Ocotea* apresenta mais de 350 espécies, encontradas nas faixas de clima tropical e subtropical, sendo que aproximadamente 160 dessas são encontradas no Brasil. Muitas delas são plantas medicinais, além do uso madeireiro (YAMAGUCHI et al., 2011).

Quimicamente, o gênero *Ocotea* exibe diversos tipos e classes de metabólitos secundários, como os metabólitos tipo furano, lignanas, biciclooctano, neolignanas, benzilisoquinolina, alcaloides aporfínicos, alcaloides benzilisoquinolidínicos e sesquiterpenos (CAMARGO et al., 2013; PABON; CUCA, 2010, BATISTA et al., 2010).

Diversos trabalhos relatam as atividades farmacológicas encontradas no gênero *Ocotea*, seja por seus extratos ou substâncias isoladas, como atividade antioxidante, anti-inflamatória (DESTRYANA et al., 2014), atividade depressora no sistema nervoso central (SOUSA et al., 2005), ação cardiovascular, como anti-hipertensivo (BARBOSA-FILHO et al., 2008), atividade acaricida (CONCEIÇÃO et al., 2017), atividade anti-plasmodial e contra o *Aedys aegypti* (RAKOTONDRAIBE et al., 2014), atividade antifúngica (DA SILVA et al., 2017), ação antiproliferativa em células do câncer do ovário (LIU et al., 2015), atividade anti-herpética (GARRETT et al., 2012), inibição da produção de óxido nítrico e atividade contra micobactérias (COSTA et al., 2015).

## 2.6 ESPÉCIE *Ocotea odorifera* (vell.) Rohwer

A espécie *Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer é uma planta medicinal, nativa da floresta tropical atlântica do Brasil, conhecida também pelas sinonímias botânicas *Laurus odorifera* Vellozo; *Ocotea pretiosa* (Nees) Mez; *Ocotea pretiosa* var. *pretiosa* Vattimo (Figura 9). É conhecida popularmente por diferentes nomes populares, dependendo da região, tais como canela-sassafrás ou sassafrás, sassafrasinho, casca-preciosa, canela-funcho, canela-sassafrás-folha-grande, louro-sassafrás, louro-tapinhoã, sassafrás-amarelo, sassafrás-preto, sassafrás-rajado, pau-funcho, sassafrás-do-paraná (BOTSARIS, 2007; OLTRAMARI et al., 2004; RAMALHO, 2005).



Figura 9 – *Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer

Fonte: Do autor.

O nome *Ocotea* têm sua origem de um nome tradicional na Guiana, e, *odorifera*, é porque exala um odor característico do composto safrol. É uma árvore de clima tropical, de crescimento

muito lento, com folhas alternas, simples e inteiras; quando esmagadas apresentam odor inconfundível. A floração varia de acordo com o estado, sendo que em Minas Gerais ocorre entre agosto a dezembro, sendo as flores vistas como inflorescências glabras. A frutificação em Minas Gerais ocorre entre maio a julho. Os frutos possuem coloração castanho, na forma elíptica (RAMALHO, 2005).

A *O. odorifera* possui histórico etnofarmacológico para o tratamento do reumatismo (TRIBESS et al., 2015), ação antioxidante, ação antimicrobiana e antimutagênica (GONTIJO; BRANDÃO; GONTIJO, 2017), ação antifúngica, tratamento da dermatose e da sífilis, além de relatos indígenas para febre e malária (BOTSARIS, 2007; UEDA; FRANCIELLE; GARCIA, 2011).

*O. odorifera* também teve sua madeira amplamente utilizada para fabricação de móveis e na construção civil (RAMALHO, 2005). Devido ao grande desmatamento da mata atlântica combinada com a grande exploração da espécie para diversos fins, hoje a *O. odorifera* já é considerada em extinção (OLTRAMARI et al., 2004; MARTINS et al., 2014).

Quanto aos seus constituintes químicos, *O. odorifera* têm relatos da biossíntese de alcaloides, flavonoides, polipropanoides, esteroides, cumarinas, sesquiterpenos e grandes quantidades de óleos essenciais (CUSTÓDIO; FLORÊNCIO, 2014; GONTIJO; BRANDÃO; GONTIJO, 2017).

Seu óleo essencial é constituído principalmente pelo composto safrol [5-(2-propenil)-1,3-benzodioxol] (Figura 10), um éter aromático, com odor intenso e característico. Ele possui diversas utilidades, como flavorizante em bebidas, alimentos, cosméticos, além de ter sido usado como constituinte de pesticidas. Em 1983, o Food and Drug Administration (FDA), relatou o uso do óleo de sassafrás como ingrediente em 113 formulações de medicamentos sem prescrição, geralmente de aplicação tópica, mas em alguns casos, também para administração oral (OLTRAMARI et al., 2004; MOSSI et al., 2013). Porém seu uso muitas vezes é efetuado sem o safrol, pois este demonstrou-se um agente indutor de carcinogênese (GONTIJO; BRANDÃO; GONTIJO, 2017).

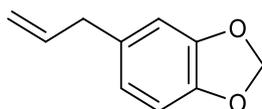


Figura 10 – Estrutura química do safrol.

Fonte: Do autor.

Todavia, a espécie *O. odorifera* ainda não possui na literatura um estudo mais completo, envolvendo o isolamento fitoquímico na busca de substâncias bioativas; um estudo da composição

química e atividade anti-inflamatória dos óleos essenciais; bem como as abordagens metabolômicas dos extratos e frações de suas folhas.

### 3 JUSTIFICATIVA

Mesmo diante do progresso tecnológico e farmacêutico, os produtos naturais ainda representam uma fonte imensurável para descoberta de novos compostos com propriedades farmacológicas, além de ser fonte para o desenvolvimento de fitoterápicos. O uso tradicional das plantas pela população deve ainda ser muito observado e estudado, pois o histórico etnofarmacológico, representa um importante aliado dos pesquisadores para identificar potenciais alvos de estudos fitoquímicos e metabolômicos.

Nesse sentido, considerando-se que muitos medicamentos utilizados na terapêutica de diversas patologias, incluindo o tratamento anti-inflamatório, apresentam diversos efeitos colaterais e eficácia limitada, a avaliação da atividade anti-inflamatória de substâncias de origem vegetal torna-se extremamente importante. Nesse contexto métodos capazes de predizer determinada propriedade biológica com mecanismo de ação requerido, como a anti-inflamatória através da inibição dual das vias da COX e LOX, são extremamente relevantes para a escolha da espécie a ser estudada. Assim, pode se guiar a descoberta de princípios ativos anti-inflamatórios com mecanismo desejado evitando o estudo de extratos e substâncias com propriedades via mecanismo de ação comum ao de fármacos já disponíveis.

Dessa forma, esse trabalho visa a realização de abordagens metabolômicas para espécies da família Lauraceae para guiar o estudo de extratos e substâncias que apresentem potencial anti-inflamatório via mecanismo de ação inovador pela inibição das vias da COX e LOX.

### 4 OBJETIVOS

Nesta seção serão apresentados os objetivos a serem alcançados ao longo do trabalho.

#### 4.1 OBJETIVO GERAL

Determinar o potencial anti-inflamatório de espécies da família Lauraceae através de estudos metabolômicos e estatísticos; realizar a avaliação da atividade anti-inflamatória do extrato bruto e frações da espécie mais promissora – *O. odorifera*, bem como do decocto e dos óleos

essenciais desta espécie; além de proceder com o isolamento de substâncias inibidoras das vias COX e LOX.

#### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Através de abordagens metabolômicas e estatísticas realizar a predição da atividade para diversas espécies de Lauraceae, auxiliando na escolha da espécie a ser estudada; além verificar os biomarcadores correlacionados com as atividades anti-inflamatórias investigadas;
- b) Obter extrato bruto e frações das folhas da espécie selecionada - *O. odorifera*;
- c) Fracionamento visando a obtenção da fração alcaloídica, em acetato de etila, hexânica e hidroalcoólica;
- d) Obter os óleos essenciais das folhas e dos galhos da *O. odorifera*;
- e) Analisar a composição dos óleos essenciais;
- f) Realizar ensaio anti-inflamatório do extrato bruto e frações, bem como do decocto;
- g) Realizar ensaio anti-inflamatório dos óleos essenciais e substância isolada;
- h) Proceder com as análises metabolômicas para o extrato bruto e frações de *O. odorifera*, bem como a desrepliação dos biomarcadores obtidos no modelo PLS.

#### 5 METODOLOGIA

Nesta seção serão apresentados os reagentes e equipamentos, assim como os métodos e ensaios biológicos utilizados para obtenção dos resultados.

##### 5.1 METABOLÔMICA

Para as abordagens metabolômicas, foram analisados extratos de 19 espécies de Lauraceae, sendo estes das folhas e alguns também do caule. Uma pequena quantidade de material vegetal foi fornecido pelo herbário da UNIFAL-MG e estas espécies estão catalogadas sob o número de tombo seguinte: #1585 - *Aiouea saligna* Meisn, #2649 - *Aniba formula* (Nees & Mart.) Mez, #1550 - *Cinnamomum glaziovii* (Mez) Kosterm, #690 - *Cinnamomum triplinerve* (Ruiz & Pav.) Kosterm, #2741 - *Cryptocarya aschersoniana* Mez, #183 - *Endlicheria paniculata* (Spreng.) J.F. Macbr., #2735 - *Nectranda grandiflora* (Ness & Mart.) ex. Ness, #182 - *Nectranda membranaceae* (Sw.) Griseb, #2672 - *Nectranda oppositifolia* Ness & Mart, #2970 - *Ocotea odorifera* Vell. Rohwer, #2736 - *Ocotea corymbosa* (Meisn.) Mez, #924 - *Ocotea aciphylla* (Nees

& Mart.) Mez, #2579 - *Ocotea diospyrifolia* (Meisn.) Mez, #710 - *Ocotea divaricata* (Ness) Mez, #1748 - *Ocotea puberula* (Rich.) Nees, #175 - *Ocotea pulchella* (Ness & Mart.) Mez, #1549 - *Ocotea bicolor* Vattimo-Gil, #2348 - *Persea major* (Ness) L.E. Kopp, #1000 - *Persea willdenovii* Kosterm.

Todas as amostras foram preparadas utilizando 20 mg das folhas ou caule secos e triturados individualmente em almofariz, utilizando pistilo e nitrogênio líquido. Ao material triturado foi adicionado 2 mL da solução etanol:água MiliQ, na proporção 7:3, em *ependorf*. Após isso, todas as amostras foram colocadas em banho de ultrassom por 15 minutos, sendo então centrifugadas para recolher o sobrenadante. Logo, realizou-se o *claen-up* por partição com hexano grau HPLC (2 x 200 µL), para garantir a retirada de substâncias apolares e, então, filtrou-se em filtro HPLC (DE VOS et al., 2007).

O método cromatográfico a ser empregado nos estudos metabolômicos foi previamente desenvolvido e padronizado por (CHAGAS-PAULA, 2013). A injeção das amostras foi realizada pelo grupo de pesquisa ASTEBIOCHEM da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, USP, pela Dra. Rosana Casoti.

Para a avaliação de todos os extratos em UHPLC-UV-HRMS-ESI-*Orbitrap* (Thermo Scientific Exactive™ equipado com tecnologia *Orbitrap*™), utilizou-se o seguinte método cromatográfico: coluna cromatográfica C<sub>18</sub> (150 x 3 mm e 3 µm de diâmetro de partícula; ACE®); fase móvel em gradiente com fluxo de 400 µL/min compreendido de MeCN/água, ambas as fases acidificadas com 0,1% ácido fórmico. O volume de amostra injetada foi de 5 µL e as temperaturas do forno e da estante foram 45°C e 10°C, respectivamente. O espectrômetro foi operado nos seguintes parâmetros: faixa de varredura de m/z 120-1200 para full MS; ESI-MS (resolução de 70.000) com lock mass; máximo tempo de injeção: 250 ms; taxa do fluxo de gás = 30; taxa do fluxo de gás auxiliar = 10; voltagem do spray no modo positivo (3.6 kV) e no modo negativo (3.2kV); nível das S-lentes = 55. Gás nitrogênio foi utilizado como nebulizador. As amostras foram analisadas aleatoriamente, sendo uma replicata da amostra e uma do branco analisadas no início, meio e fim da sequência de análise cromatográfica.

Os dados brutos foram separados em seus respectivos modos positivos e negativos e convertidos para o formato .mzXML usando o software ProteoWizard-MSconvert (Proteowizard Software Foundation, EUA). Com o emprego do software MZmine 2.10 (MZmine Development Team), os cromatogramas dos diferentes extratos foram deconvoluídos, tiveram os seus isótopos eliminados, picos idênticos nos diferentes extratos alinhados e os espaços vazios preenchidos. Os seguintes parâmetros foram empregados: detecção de massa usando o algoritmo de massa exata (nível de ruído, 2.0E6); construtor de cromatograma (intervalo de tempo mínimo em minutos, 0,1; altura mínima, 2,0E6; tolerância m/z, 0,001 m/z ou 3,0 ppm); deconvolução do cromatograma usando o ponto de corte de linha de base (altura mínima do pico, 2,0E6; duração do pico, 0,1 a

1,0; nível de base, 2,0E6); retirado dos isótopos (tolerância  $m/z$ , 0,001  $m/z$  ou 3 ppm; tolerância do tempo de retenção 15, 0,1; carga máxima, 1; isótopo representativo, mais intenso); alinhamento usando o alinhamento Join aligner (tolerância  $m/z$ , 0,001  $m/z$  à 3 ppm, peso para  $m/z$  15, tolerância do tempo de retenção 0,5 absoluto, peso para o tempo de retenção, 15); Gap filling (tolerância da  $m/z$  0,001 à 5 ppm, tolerância de intensidade 10%, tolerância da  $m/z$  0,001, à 3 ppm).

A partir dos dados cromatográficos de cada extrato, com detecção de massas nos modos positivo e negativo separadamente, juntamente com os resultados da avaliação das atividades anti-inflamatória foram realizadas as análises de correlação *in silico* com análises estatísticas multivariadas não supervisionadas, realizadas no software SIMCA-P 13.0.2.0<sup>®</sup> (Unmetrics).

As análises estatísticas realizadas neste software para o modelo de predição foram supervisionadas pelos resultados previamente descritos de um estudo, onde 57 espécies da família Asteraceae tiveram sua atividade anti-inflamatória testada, com o mecanismo dual de inibição das vias COX e LOX (CHAGAS-PAULA et al., 2015a). Os testes ocorrem em primeira instância *in vitro*, sendo que aquelas espécies que se mostraram ativas, foram posteriormente avaliadas *in vivo*, pelo ensaio de edema de orelha e MPO.

Para o modelo de predição foram utilizados os seguintes parâmetros: modelo OPLS-DA com normalização UV; total de componentes adicionados, 2; divisão das classes, inibição e não-inibição das vias COX e LOX para as amostras de Asteraceae.

Dessa forma, otimizou-se o modelo estatístico proposto por CHAGAS-PAULA et al. (2013) para prever a atividade anti-inflamatória dos 26 extratos/frações da família Lauraceae, no SIMCA-P. Foram utilizados para construção deste modelo 10 espécies que foram descritas como inibidoras da COX e LOX (I40, I41, I42, I46, I49, I56, I57, I60, I61, I66,) e 7 espécies que não inibidoras de ambas enzimas (N1, N10, N12, N14, N23, N43, N54) (Tabela 1).

Desse total, 70% das amostras foram usadas para treinar o modelo, para garantir que este irá prever corretamente: amostras treino: I41, I40, I42, I49, I57, N12, N14, N10, N1, N43; enquanto 30% foram usadas para validação do mesmo: 5 amostras que inibem COX e LOX (I46, I66, I56, I60, I61) e, outras 2 que não inibem (N54, N23). Isso para assegurar que o modelo funciona corretamente, conforme previamente descrito (CHAGAS-PAULA, 2013), visto que o resultado real da atividade biológica de cada amostra é conhecido. Então, depois de validado, realizou-se a predição dos extratos de Lauraceae. Como o modelo desenvolvido foi construído com dados de espécies da família Asteraceae, o domínio de aplicação do mesmo é para espécies desta família. No entanto, se espécies da família Lauraceae que contiver as mesmas substâncias ativas, em comum as espécies ativas da outra família, o modelo irá prever de maneira correta a sua atividade. Embora deve se ter em mente que o modelo pode sim fornecer resultados falso-negativo, uma vez que a espécie pode conter substâncias anti-inflamatórias diferentes daqueles presentes nas espécies da família Asteraceae.

Tabela 1- Identificação das espécies da família Asteraceae utilizadas para construção do modelo de predição.

<b>Amostra</b>	<b>Identificação</b>
I41	<i>Piptolepis monticola</i> Loeuille
I46	<i>Solidago microglossa</i> D.C.
I40	<i>Minasia scapigera</i> H. Rob
I42	<i>Prestelia eriopus</i> Sch. Bip.
I49	<i>Sphagneticola trilobata</i> (L.) Pruskei
N12	<i>Baccharis dracunculifolia</i> D. C.
N14	<i>Bidens pilosa</i> L.
N10	<i>Artemisia annua</i> L.
N1	<i>Achillea millefolium</i> Ledeb.
I66	<i>Vigueira robusta</i> Gardner
N43	<i>Pucea guitoc</i> D. C.
I56	<i>Tithonia diversifolia</i> (Hemsl.) A. Gray
I57	<i>Vernonia herbaceae</i> (Vell.) Rusby
I60	<i>Vernonia rubriramea</i> Mart. Ex. D. C.
I61	<i>Vigueira arenaria</i> Baker
N54	<i>Tanacetum vulgare</i> L.
N23	<i>Emilia sonchifolia</i> L. DC.

I – amostras que inibem COX e LOX; N - amostras que não inibem COX e LOX.

Fonte: Do autor.

Uma das espécies da família Lauraceae predita como ativa no modelo acima mencionado foi profundamente investigada. A partir dos dados de seus extratos e frações foi desenvolvido um segundo modelo estatístico com domínio de aplicação específico para esta espécie sendo o modelo supervisionado PLS o utilizado. Os parâmetros utilizados para construção desse modelo são: normalização UV; total de componentes adicionados, 2; divisão das classes, inibição e não-inibição das vias COX e LOX (avaliadas *in vivo*).

Desta forma, com base nos resultados gerados a partir desse modelo, utilizando a análise das VIP e o resultado de Coeficientes pode-se então guiar o isolamento de um composto altamente correlacionado com a atividade anti-inflamatória desta espécie mesmo que este fosse diferente das substâncias descritas para as espécies da família Asteraceae.

Já a análise estatística não supervisionada PCA foi realizada para explorar todas as amostras, para fornecer informações que permitem verificar as características metabolômicas dos

extratos. Isso independentemente das propriedades anti-inflamatória, exibindo um *plot* no qual demonstra a presença de *outliers* ou tendências de acordo com a composição química deles.

Após, com os dados das VIPs, pode-se realizar a desrepliação desses biomarcadores da atividade utilizando o software Qualbrowser/Xcalibur®. Nesse software as possíveis fórmulas moleculares são geradas cada *m/z* investigada, considerando-se parâmetros para chegar a fórmula molecular mais provável. Essa escolha foi realizada com base em diversos parâmetros, como a carga utilizada, no caso modo positivo; Double bond/ring equivalentes (RDBE) fracionário para ionização por electrospray; erro de tolerância máximo de 3 ppm; a abundância relativa do isótopo  $M^{+1}$  dividido pela abundância do carbono 13 (1,123) para chegar ao número provável de carbonos; presença de átomos de cloro, enxofre e bromo.

Por fim, utilizou-se o abrangente banco de dados Dictionary of Natural Products® 2015 para buscar os possíveis *hits* para cada fórmula molecular encontrada no Xcalibur.

## 5.2 ESTUDO FITOQUÍMICO DA ESPECIE SELECIONADA

O extrato bruto das folhas de *O. odorifera* (predita como ativa) foi realizado com 2 kg de folhas. Este foi coletado no centro da cidade de Alfenas-MG, aonde esta espécie foi previamente identificada por pesquisadores da Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL-MG. O material coletado foi uma pequena parte da copa da árvore, portanto a sobrevivência do indivíduo não foi comprometida. A árvore está localizada na praça Fausto Monteiro, em frente a Prefeitura Municipal de Alfenas, latitude -21425227 e longitude -45949797, coletada no dia 11/06/2016 no período da manhã. Logo, a espécie foi catalogada numa exsicata sob o número de tombo 2970 e depositada no herbário da referida universidade. As folhas foram secas em estufa de ar circulante, sob temperatura de 40°C, por 72 horas.

Após secas, o material foi triturado em moinho de facas tipo cróton TE-625. Depois realizou-se a maceração exaustiva em frasco mariote com 4,2 L de etanol 99,5% por 24 horas. Foi adicionado cerca de 1,5 L de etanol no dia seguinte para continuar a extração, este procedimento foi repetido por 4 dias no intervalo de aproximadamente 24 horas. A cada dia o extrato foi concentrado em rotaevaporador (com pressão reduzida e temperatura de 40°C) e o etanol recuperado foi reutilizado na extração novamente, adicionando-se cerca de 1,5 L de etanol para completar o volume. Os extratos rotaevaporados foram reunidos e então solubilizado em solução de etanol e água MiliQ (1:2, v/v), acidificada com ácido acético glacial até pH 2, para solubilizar e garantir que os alcaloides presentes permanecessem em forma de sal.

Com o extrato bruto solubilizado realizou-se uma série de extrações líquido-líquido, utilizando 250 mL por 3 vezes de cada um dos seguintes solventes: hexano, acetato de etila e clorofórmio. Antes da extração com clorofórmio, o pH foi ajustado para 8 adicionando solução

10% de hidróxido de sódio, para que os alcaloides que se encontravam na forma de sal devido ao pH ácido, voltassem a se solubilizar e então pudessem ser particionados. A solução hidroetanólica que restou no funil de separação, teve o pH neutralizado (pH=7). As frações foram concentradas em rotaevaporador, congeladas e liofilizadas em liofilizador LJJ04 Científica, a uma temperatura média de -42°C e pressão média de 1000 mmHg. As frações foram então novamente acondicionado ao freezer a -20 °C, até que fosse submetido às etapas posteriores.

A fração clorofórmio, foi a escolhida para os estudos fitoquímicos por se tratar da fração rica em alcaloides e ter sido predita como anti-inflamatória no segundo modelo estatístico desenvolvido, com domínio de aplicação para *O. odorifera*. Esta foi submetida a cromatografias em coluna (CC) (Figura 8), além da cromatografia em camada delgada (CCD), para acompanhar o fracionamento e verificar quais subfrações poderiam ser agrupadas, de acordo com seu perfil cromatográfico. Para a CCD foram utilizadas placas com base de alumínio sílica gel 60 e luz ultravioleta ( $\lambda = 254$  ou  $365$  nm) como revelador.

As especificações do procedimento incluem:

- a) massa da amostra: 700 mg;
- b) massa da sílica gel 60 - 70 a 230 Mesh (0,063 – 0,200 3m): 10 g;
- c) eluentes: clorofórmio 100%, clorofórmio/metanol 9:1 (v/v), clorofórmio/metanol 8/2 (v/v) clorofórmio/metanol 7:3 (v/v), clorofórmio/metanol 6:4 (v/v), clorofórmio/metanol 1:1 (v/v), metanol 100%. Todos os eluentes (250 mL) foram acidificados com 1% de ácido acético.

Foram obtidas 60 subfrações de, aproximadamente, 10 mL cada que foram agrupadas em 18 grupos de acordo com o seu perfil cromatográfico obtido por CCD. No fluxograma (Figura 11) é possível observar a sequência de etapas para obtenção da substância isolada da fração clorofórmio.

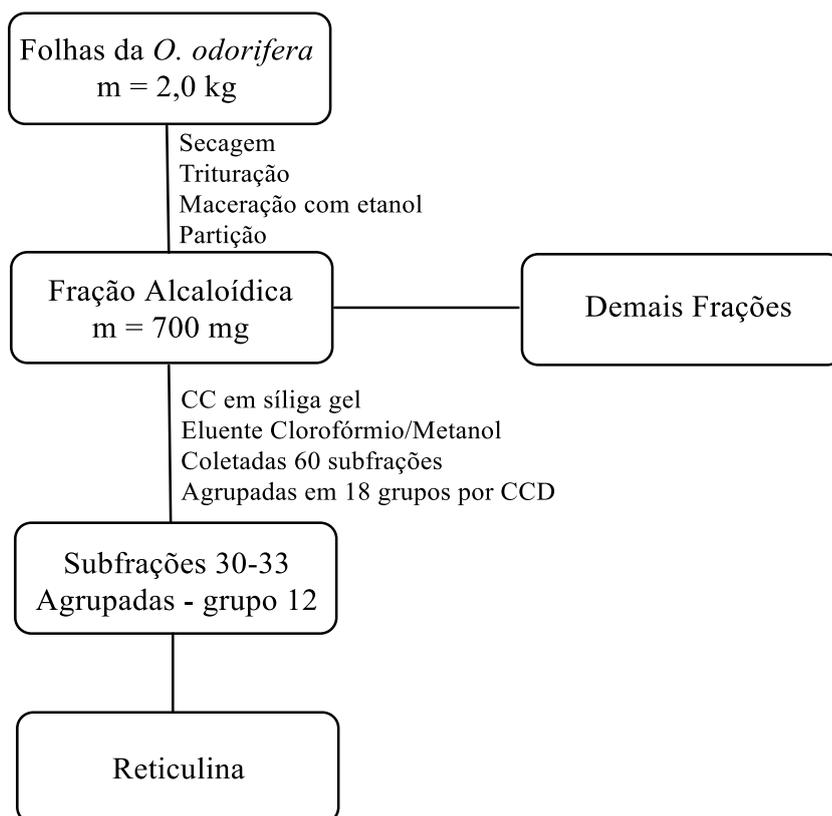


Figura 11 – Fluxograma do processo cromatográfico para obtenção do composto isolado.

Fonte: Do autor.

As subfrações desejáveis tiveram seus perfis metabólicos avaliados através de análises por HPLC-UV-DAD ultra-analítico. As análises foram desenvolvidas em coluna de fase reversa C18 ultra-analítica, 150 x 3 mm, 0,5  $\mu$ m de diâmetro de partícula, e método cromatográfico gradiente de 5% a 100% de acetonitrila em água (0,1 % ácido acético) por 40 minutos e fluxo de 1 mL/min. Sendo que o grupo 12 apresentou-se puro, sendo então posteriormente submetido a técnica de RMN.

### 5.3 PREPARO DO DECOCTO E EXTRAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

Também foi preparado o decocto, onde 1 g das folhas trituradas foram deixadas em decocção juntamente com meio litro de água destilada, por 20 minutos. Em seguida filtrou-se e então o mesmo foi congelado, liofilizado e acondicionado em freezer a -20 °C.

Os óleos essenciais foram preparados com as folhas e os galhos da *O. odorifera*. Cerca de 300 g das folhas frescas e 300 g dos galhos cortados em pedacinhos, foram submetidos a hidrodestilação, em aparelho de tipo *Clevenger*, por aproximadamente 4 horas. O óleo essencial obtido foi mantido a -20°C até ser analisado através de GC-MS e a realização do teste de atividade anti-inflamatória.

#### 5.4 ANÁLISE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *O. odorifera* POR CG-MS

A análise dos óleos essenciais foi realizada por CG-MS em um cromatógrafo a gás Shimadzu GC-17A conectado a um espectrômetro de massas MS-QP-5050A, com injetor automático split (Shimadzu AOC-20i), coluna capilar RtX-5 (5% fenil, 95% polidimetilsiloxano 30 m x 0,32 mm x 0,25 µm; Restek, Bellefonte, PA, USA) e tratamento de dados através do software GC-MS Solution. Essa análise foi realizada pela injeção de 1,0 µL, com temperatura de 225 °C, em um modo Split, split ratio, 50:1; a temperatura da interface foi de 250°C, sendo Hélio o gás carregador utilizado com uma velocidade de 46,1 cm/s linear e pressão de 99,3 KPa; a temperatura do detector foi de 240°C, operando com o seguinte programa de temperatura do forno: 60°C mantida durante 2 minutos, elevando-se a 3°C/min até 240°C, mantida durante 5 min. Sendo a temperatura da fonte de 200°C e a temperatura da interface de 250°C. As análises em EI-MS foram conduzidas sob uma voltagem de 70 eV e a temperatura da fonte ionizadora foi de 200°C. Os índices de retenção de todos os compostos foram determinados pelo índice de Kovats.

A identificação dos compostos dos óleos essenciais foi realizada individualmente comparando-se os índices de Kovats e espectros de massas juntamente com os padrões de fragmentação, dos compostos já descritos na literatura (ADAMS, 2009).

#### 5.5 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL

A substância isolada foi identificada pela técnica de ressonância magnética nuclear unidimensional de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C. A amostra foi preparada em dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-*d*<sub>6</sub>), e o espectro de ressonância magnética nuclear a 300 MHz foi obtido em espectrômetro Bruker da UNIFAL-MG. Também foi realizada análise por meio de injeção direta para a substância em espectrômetro de alta resolução, HRMS-TOF com ionização por *electrospray*, no sistema com tecnologia Waters-XEVO-G2XSQTOF-LC. Rotação ótica foi medida em polarímetro automático Quimes.

#### 5.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

Nesta seção serão abordados os ensaios anti-inflamatórios realizados.

### 5.6.1 Animais

Os animais foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo da UNIFAL-MG e mantidos com temperatura controlada ( $20 \pm 2^\circ\text{C}$ ) em ciclos claro-escuro de 12 horas, com água e ração *ad libitum*. Foram utilizados camundongos albinos *Swiss* machos, adultos (25-35 g) aclimatados às condições do laboratório, sendo agrupados em grupos de 8 animais, conforme descrito no projeto aprovado pelo comitê de ética, registrado com o número de processo 36/2016.

Os animais ficaram alojados antes do experimento no Laboratório de Parasitologia e Patologia, para ambientação, onde também foi realizado o experimento, sob autorização do professor Dr. Ivo Santana Caldas.

### 5.6.2 Edema de orelha

O teste para avaliar a atividade anti-inflamatória *in vivo* de edema de orelha foi realizado conforme a metodologia revisada por Tubaro et al. (1986b). A inflamação cutânea foi induzida na orelha esquerda dos camundongos (n=8) pela aplicação tópica de 20  $\mu\text{L}$  da solução irritante de óleo de cróton (5% v/v) dissolvido em acetona. Na orelha direita foi aplicado somente a acetona. Trinta minutos após a aplicação do óleo de cróton, foi realizado tratamento tópico com o extrato bruto e frações hexânica, acetato de etila, hidroetanólica e clorofórmica de *O. odorifera* na dose de 0,5 mg/orelha, além do decocto e dos óleos essenciais nas concentrações de 0,5 e 2,5 mg/orelha, bem como da substância isolada nas doses de 0,5 e 1,0 mg/orelha.

As amostras foram dissolvidas em 20% de acetona ou água em glicerina, dependendo de sua solubilidade em acetona. Os animais do grupo controle negativo receberam apenas a solução irritante, enquanto os do grupo controle positivo foram tratados topicamente com os fármacos de referência apropriado para cada caso. Para controle positivo dos óleos essenciais foi utilizado o fitoterápico Acheflan®, disponível comercialmente na forma farmacêutica de pomada, sendo utilizada uma camada fina deste medicamento por orelha tratada. O Acheflan® é um anti-inflamatório tópico comercial, cujo princípio ativo é o óleo essencial de *Cordia verbenacea* DC. Como demais controles positivos, utilizou-se os fármacos de referência a indometacina e a dexametasona, também nas doses de 0,5 mg/orelha, para controle de inibição do edema e do recrutamento celular, respectivamente; sendo todos aplicados 30 minutos após indução da inflamação (FACHINI-QUEIROZ et al., 2012; SARAIVA et al., 2011; ZANINI et al., 1992).

Os animais foram sacrificados por inalação de isoflurano, 6 horas após a indução da inflamação para a excisão de um fragmento de orelha de 6 mm de diâmetro de ambas orelhas,

utilizando um *punch*. Os fragmentos de orelha obtidos foram mantidos em 200  $\mu$ L de tampão NaEDTA/NaCl pH 4,7 a -20 °C até serem analisados (5.5.3).

A quantificação do edema foi determinada por meio da diferença do peso entre os fragmentos das orelhas esquerdas e das respectivas orelhas direitas. Os dados foram analisados por ANOVA one-way seguido do teste de comparação múltipla de Dunnett e expressos como média  $\pm$  erro médio padrão (EMP). O programa utilizado para a análise dos dados foi GraphPad Prism Versão 6.0. As percentagens de inibição do edema foram calculadas de acordo com a seguinte equação:

$$\% \text{ Inibição de edema} = \frac{\text{Valor médio do grupo veículo} - \text{valor médio do grupo tratado}}{\text{Valor médio do grupo veículo}} * 100$$

### 5.6.3 Ensaio de MPO para avaliar recrutamento de neutrófilos

Toda manipulação das orelhas obtidas no ensaio anti-inflamatório sempre foi realizada sob gelo e na sob baixa iluminação.

Ao início da análise, os fragmentos de orelha em solução de tampão foram transferidos para um tubo de ensaio, onde foi adicionado mais 600  $\mu$ L tampão NaEDTA/NaCl pH 4,7. Estes foram então homogeneizados utilizando o macerador de tecidos Turrax (13000 rpm; 3 vezes) e, posteriormente, centrifugados a 3000 rpm por 15 min a 4°C. O sobrenadante foi reservado e os precipitados foram ressuspensos em 600  $\mu$ L de tampão pH 5,4 contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetil amônio e homogeneizados novamente utilizando o macerador de tecidos Turrax 13.000 rpm (3 vezes). As amostras foram centrifugadas a 10000 rpm por 15 min a 4°C e os sobrenadantes utilizados para avaliar a inibição da enzima MPO.

Para a quantificação da MPO, foram adicionados 50  $\mu$ L do sobrenadante de cada amostra por poço, em uma placa de 96 poços, em triplicatas, sendo que em cada placa haviam amostras tanto do controle positivo, quanto do negativo. Após plaqueadas todas as amostras, as placas foram mantidas tampadas dentro do plástico de origem na geladeira. Foi preparada uma solução com os reagentes 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB, 1,6 mM) e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0,5 mM) do kit BD OptEIA™ na proporção de 1:1, sendo utilizados um total de 6 mL da solução por placa, 15 minutos antes da análise.

Essa reação é colorimétrica, onde o TMB é oxidado pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por meio da catálise da MPO, e a solução passa de incolor para azul quando tem MPO na amostra (Figura 12).

Para tanto, são adicionados 50  $\mu\text{L}$  da solução preparada (TMB +  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) em cada poço da placa. Após passados 10 minutos, adicionou-se 50  $\mu\text{L}$  da solução aquosa de ácido sulfúrico para interromper a reação, gerando uma coloração amarelada em substituição a azulada.

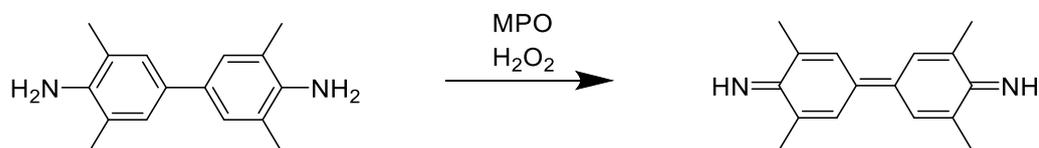


Figura 12 – Oxidação da 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina a 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina-diimina.

Fonte: Do autor.

Após mais 10 minutos foi realizada a leitura de absorvância em 450 nm. Os resultados foram analisados por ANOVA *one-way* seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunnett e expressos como média  $\pm$  erro médio padrão (EMP). O programa utilizado para computação dos dados foi GraphPad Prism Versão 6.0.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir são descritos os resultados obtidos neste trabalho.

### 6.1 METABOLÔMICA

Para as abordagens metabolômicas utilizou-se um método cromatográfico bastante abrangente e que vem sendo utilizado satisfatoriamente nas pesquisas com extratos de espécies de outras famílias (CHAGAS-PAULA et al., 2015a). De fato, foi observada uma boa distribuição das substâncias nos cromatogramas (Figura 13) das diferentes espécies incluídas neste estudo, demonstrando que este método foi adequado para este estudo.

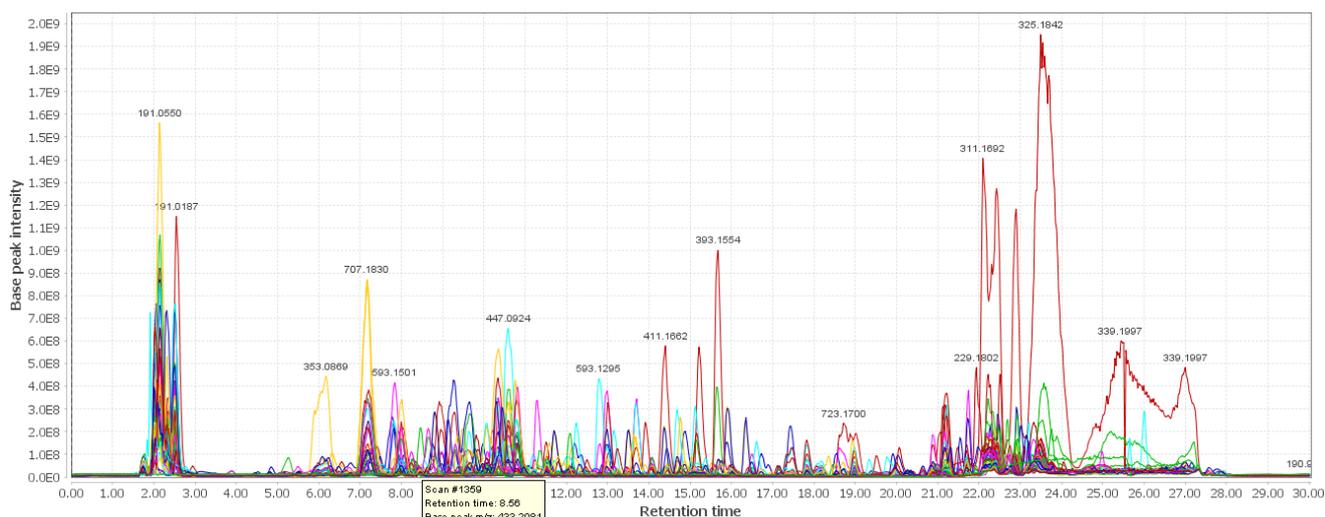


Figura 13 - Cromatograma (modo positivo) de todos os extratos sobrepostos, obtidos através de UPLC-UV-HRFTMS.

Fonte: Do autor.

O modelo de predição (OPLS-DA - Orthogonal Partial Least Squares) de atividade anti-inflamatória através da dupla inibição das vias COX e LOX apresentou os seguintes valores:  $R^2Y$  de 0,611 e  $Q^2$  de 0,539 (Tabela 2). Modelos preditivos satisfatórios em abordagens metabolômicas devem ter valores de  $R^2$  e  $Q^2 > 0,5$ .  $R^2$  informa como o modelo é ajustado e o  $Q^2$  obtido a partir da validação externa é usado como um critério da robustez e capacidade preditiva do modelo (BALDIM *et al.*, 2017). Assim, o modelo de predição mostrou-se bem ajustado e com bom poder preditivo corroborando relato prévio (CHAGAS-PAULA *et al.*, 2015a).

Contudo, valores muito perto de 1 para  $Q^2$  e  $R^2$  podem sugerir que o modelo esteja sofrendo um super ajuste ou *overfitting*. O *overfitting* ocorre em modelos que violam o princípio da parcimônia ou Navalha de *Occam*; esse princípio discorre que um bom método deve utilizar apenas o necessário para chegar a determinado resultado e nada mais. Dessa forma se uma determinada análise é justificada por um modelo estatístico mais simples, não é necessário utilizar um mais complexo (ALEXANDER; TROPSHA; WINKLER, 2015; HAWKINS, 2004).

Ao separar parte das amostras conhecidas no modelo de predição de atividade das espécies da família Lauraceae, foi utilizada uma das estratégias de detecção de *overfitting*, denominada validação externa, onde o conjunto de dados é dividido aleatoriamente, para que uma parte dos dados seja utilizada para treinar o modelo e outra parte para validá-lo (GOLBRAIKH; TROPSHA, 2002a). Primeiramente, realizou-se a construção do modelo de predição através do treino com as amostras com conhecida propriedade anti-inflamatória (variáveis Y: 1. inibem as vias COX e LOX, 2. não inibem). Logo após o treino, foi realizada a validação externa deste modelo. O modelo treinado apresentou 100% de acerto na predição das amostras reservadas para validação externa.

Tabela 2 – Predição da atividade anti-inflamatória dos extratos de Lauraceae obtida no software SIMCA-P (Continua)

Identificação	Inibição dual de COX e LOX	Predição - inibição dual de COX e LOX	Não inibição	Predição - não inibição
<i>O. odorifera</i> Et	--	0.195928	--	0.804072
<i>O. odorifera</i> Cl	--	46.6419	--	-45.6419
<i>O. odorifera</i> Ac	--	3203.64	--	-3202.64
<i>O. odorifera</i> EtB	--	60.6678	--	-59.6678
<i>O. odorifera</i> Ca	--	0.963303	--	0.0366974
<i>C. aschersoniana</i> Fo	--	105.66	--	-104.66
<i>C. aschersoniana</i> Ca	--	89.2601	--	-88.2601
<i>C. glaziovii</i>	--	0.648958	--	0.351042
<i>O. aciphylla</i>	--	741.563	--	-740.563
<i>N. grandiflora</i>	--	1923.1	--	-1922.1
<i>O. bicolor</i>	--	785.89	--	-784.89
<i>P. major</i>	--	3463.42	--	-3462.42
<i>N. membranaceae</i>	--	353.918	--	-352.918
<i>O. diospirifolia</i>	--	604.424	--	-603.424
<i>C. triplinerve</i>	--	715.425	--	-714.425
<i>O. divaricata</i>	--	0.133817	--	0.866183
<i>O. puberula</i>	--	0.134182	--	0.865818
<i>O. puchella</i>	--	5.108	--	-4.108
<i>A. firmula</i>	--	1062.38	--	-1061.38
<i>N. oppositifolia</i>	--	2.69723	--	-1.69723
<i>P. willdenovii</i>	--	691.977	--	-690.977
<i>A. saligna</i>	--	0.334982	--	0.665018
<i>O. corymbosa</i> Fo	--	1.83397	--	-0.833971
<i>E. paniculata</i> Fo	--	75.2654	--	-74.2654
<i>O. corymbosa</i> Ca	--	1.20853	--	-0.208534
<i>E. paniculata</i> Ca	--	0.195928	--	0.804072
I41	1	0.994137	0	0.00586349
I46	--	0.804561	--	0.195439
I40	1	1.00046	0	-0.000458121
I42	1	0.994472	0	0.0055277
I49	1	0.994102	0	0.00589788

Tabela 2 – Predição da atividade anti-inflamatória dos extratos de Lauraceae obtida no software SIMCA-P

Identificação	Inibição dual de COX e LOX	Predição - inibição dual de COX e LOX	(Conclusão)	
			Não inibição	Predição - não inibição
N12	0	0.0134007	1	0.986599
N14	0	-0.0258857	1	1.02589
N10	0	-0.0142381	1	1.01424
N1	0	0.0171849	1	0.982815
I66	--	4693.31	--	-4692.31
N43	0	-0.00349879	1	1.0035
I56	--	0.797514	--	0.202486
I57	1	1.01144	0	-0.0114418
I60	--	1889.16	--	-1888.16
I61	--	418.289	--	-417.289
N54	--	0.155569	--	0.844431
N23	--	-0.0485076	--	1.04851

Fonte: Do autor.

Nota: Modelo estatístico OPLS, valores  $R^2X$  de 0,584,  $R^2Y$  0,611 e  $Q^2$  de 0,539, construídos com dados do modo positivo. Amostras treino: I41, I40, I42, I49, I57, N12, N14, N10, N1, N43 são amostras da família Asteraceae com propriedade anti-inflamatória conhecida (CHAGAS-PAULA et al., 2013; CHAGAS-PAULA et al., 2015a), utilizadas para o treino do modelo. I – grupo das amostras capazes de inibir ambas as enzimas, COX e LOX. N grupo das amostras que não inibem estas enzimas. As amostras teste: I46, I66, I56, I60, I61, N54, N23, foram utilizadas para validação externa do modelo de estatístico. Todos os extratos foram efetuados com as folhas de cada espécie, exceto quando especificado (Caule). FoEtB: Extrato bruto; FoE: Fração hidroetanólica; FoCl: Fração clorofórmio; FoAc: Fração acetato de etila.

Vinte diferentes extratos de 15 espécies da família Lauraceae foram preditos como anti-inflamatórios através da inibição das enzimas COX e LOX (Tabela 2). Quando a espécie é considerada como possivelmente ativa pelo programa ele responde com a coloração verde na coluna referente a inibição. Quando o modelo diz que a espécie é possivelmente não ativa, obtêm-se o resultado com verde na coluna da não inibição. Já em laranja, pode-se observar aquelas espécies que o modelo não distinguiu similaridade nem com as amostras sabidamente ativas e nem com as não ativas, não gerando uma diferença estatística suficiente para definir a classe (Tabela 2). A única espécie que apareceu em laranja foi a *Cinnamomum glaziovii*.

Dentre as espécies ativas, a *Persea major*, por exemplo, possui relato medicinal para tratamento de doenças da pele e desordens gástricas (COSMO et al., 2007). Entre as novas amostras da família Lauraceae avaliadas, o extrato bruto, as frações clorofórmio e acetato de etila das folhas de *O. odorifera* foram preditas como ativas (Tabela 2, *O. odorifera* EtB, CL e Ac, respectivamente). Assim, essa espécie foi escolhida para o estudo fitoquímico e metabolômico, além de também se tratar de uma espécie com histórico etnofarmacológico relacionado a propriedade anti-inflamatória (TRIBESS et al., 2015) e estar na lista de espécies em risco de

extinção (MARTINS et al., 2014), o que aumenta a relevância de se estudar esta espécie antes que seja extinta e estimular sua conservação e seu uso sustentável.

Nesse sentido, esse resultado pode ser útil para direcionar a escolha de novas espécies para ensaios fitoquímicos e farmacológicos, uma vez que essas espécies têm forte indicação de atividade por meio do mecanismo de ação anti-inflamatório inovador. Além disso, a seleção pode ser obtida sem ensaios demorados e sem o uso de animais. Isso torna o uso desse tipo de estratégia ainda mais considerável, uma vez que o uso de animais para testes de triagem frequentemente se depara com questões do comitê de ética sobre o uso de animais. Embora os resultados previstos devem ser confirmados por ensaios experimentais, devido às limitações esperadas para qualquer modelo *in silico* (GOLBRAIKH; TROPSHA, 2002a).

## 6.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

A avaliação da atividade anti-inflamatória através do modelo do edema de orelha utilizando óleo de cróton é empregada para avaliar o efeito anti-edematogênico e inibição do recrutamento de neutrófilos conforme previamente mencionado (TUBARO et al., 1986b).

### 6.2.1 Edema de orelha

A avaliação da atividade anti-inflamatória foi empregada através do modelo do edema de orelha induzido por óleo de cróton, onde se avaliou o efeito anti-edematogênico e a inibição do recrutamento de neutrófilos.

A atividade anti-inflamatória do extrato bruto e frações hexânica, acetato de etila e hidroetanólica das folhas, além do decocto, de *O. odorifera* foi avaliada através do ensaio de edema da orelha induzido por óleo de cróton.

Após a aplicação de óleo cróton na orelha esquerda dos camundongos foi possível verificar uma resposta inflamatória aparente, através da formação dos sinais cardinais da inflamação como edema e vermelhidão (MEDZHITOV, 2010).

Os fármacos utilizados indometacina e dexametasona inibiram significativamente o edema da orelha, em 56,61% e 61,64% respectivamente, quando comparados ao veículo (Tabela 3).

Todas as frações dos extratos testados, com exceção do extrato bruto, apresentaram resultados significativos frente à redução do edema de orelha (Figura 14). As frações e a indometacina, fármaco utilizado como referência para este ensaio, foram estatisticamente semelhantes através do teste de comparação múltipla de Dunnett ( $p \leq 0,05$ ).

Tabela 3 - Percentagem de inibição do edema de orelha do extrato bruto, frações e decocto de *O. odorifera*.

Amostra	Edema de Orelha Média±EMP	% de Inibição
Extrato bruto	3,75±0,8 <sup>ns</sup>	0,79
Hexano	2,84±0,9 <sup>ns</sup>	24,87
Hidroetanólico	2,21±0,9*	41,53
Acetato de etila	2,41±0,7*	36,24
Clorofórmio	2,11±0,9*	44,18
Decocto	2,20±0,5*	41,80
Indometacina	1,64±0,4*	56,61
Dexametasona	1,45±0,6*	61,64
Veículo	3,78±0,5	-

Fonte: Do autor.

Nota: Os resultados foram analisados por ANOVA *one-way* seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunett e expressos como média ± EMP. \* indica diferença significativa em comparação com o veículo, onde  $p \leq 0,05$  e <sup>ns</sup> indica que não há diferença significativa em comparação com o veículo.

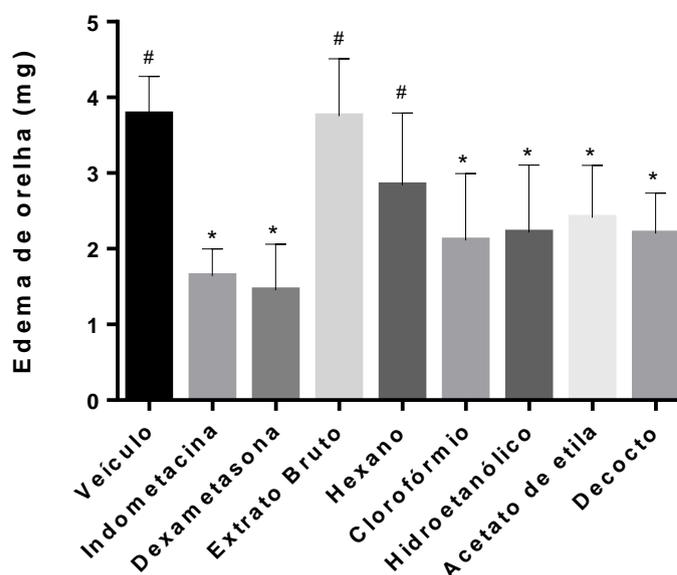


Figura 14 - Avaliação da atividade anti-inflamatória do extrato bruto, suas frações e decocto de *O. odorifera* no modelo de edema de orelha em camundongos.

Fonte: Do autor.

Nota: Os resultados foram analisados por ANOVA *one-way* seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunett. \* indica diferença significativa em comparação com o veículo, onde  $p \leq 0,05$  e # indica que não há diferença significativa em comparação com o veículo.

Dessa forma, pode-se inferir que a *O. odorifera*, deve possuir compostos de diferentes classes responsáveis pela atividade anti-inflamatória apresentada, sendo compostos de baixa, intermediária e alta polaridade. É ainda possível observar que a forma utilizada pela população, o decocto também apresentou atividade anti-edematogênica, o que corrobora o histórico etnofarmacológico desta espécie.

### 6.2.2 Ensaio de MPO para avaliar recrutamento de neutrófilos

Durante o processo inflamatório, o organismo utiliza como defesa o recrutamento de leucócitos polimorfonucleares, como, por exemplo, os neutrófilos, que são responsáveis pelas funções de fagocitose e eliminação de patógenos. Essas células de defesa são consideradas como uma das primeiras intervenções do organismo no combate ao agente inflamatório, sendo também chamadas de células de primeiro escalão. Contudo, em situações que ocorre uma migração descontrolada desses neutrófilos, eles podem vir a se tornar um fator agressor para o tecido inflamado, exacerbando os sintomas da inflamação (FACHINI-QUEIROZ et al., 2012)

Nesse sentido, através do ensaio para avaliar o recrutamento de neutrófilos, a atividade anti-inflamatória pode ser constatada pela quantificação da enzima mieloperoxidase - MPO. Esta pode ser encontrada em neutrófilos, além de outras células de defesa imunológica. A MPO, é uma enzima considerada como um marcador em tecidos inflamados, sendo que sua inibição pode gerar uma atividade anti-inflamatória (ZHONG et al., 2016).

Logo, uma diminuição na quantidade da MPO na orelha tratada indica que poucos neutrófilos foram recrutados, significando que a via da LOX foi inibida (CHAGAS-PAULA et al., 2015a; TUBARO; DRI; DELBELLO; et al., 1986b). A atividade da MPO é quantificada através dos valores de absorbância, sendo estes proporcionais à concentração da enzima nas amostras.

O fármaco de referente utilizado, a dexametasona, apresentou valor de absorbância de  $0.48 \pm 0.07$ , demonstrando significativa inibição no recrutamento de neutrófilos (Tabela 4). As frações acetato de etila, hidroetanólica e clorofórmica apresentaram também significativa inibição do recrutamento de neutrófilos.

Essas frações e a dexametasona, fármaco utilizado como referência para este ensaio, são considerados estatisticamente semelhantes através do teste de comparação múltipla de Dunnett ( $p \leq 0,05$ ) (Figura 15). Já o decocto, o extrato bruto e a fração hexânica, não apresentaram atividade significativa, sendo considerados estatisticamente semelhante ao veículo.

Tabela 4 – Avaliação do recrutamento de neutrófilos do extrato bruto, suas frações e decocto de *O. odorifera*.

Amostra	Absorbância Média±EMP
Extrato Bruto	0,75±0,26 <sup>ns</sup>
Hexano	0,87±0,15 <sup>ns</sup>
Hidroalcoólico	0,59±0,13 <sup>*</sup>
Acetato de Etila	0,61±0,11 <sup>*</sup>
Clorofórmio	0,62±0,16 <sup>*</sup>
Decocto	0,68±0,30 <sup>ns</sup>
Indometacina	0,66±0,15 <sup>*,#</sup>
Dexametasona	0,48±0,07 <sup>*</sup>
Veículo	0,86±0,04

Fonte: Do autor.

Nota: Os resultados foram analisados por ANOVA *one-way* seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunett e expressos como média ± EMP. \* indica os níveis de significância em comparação com o veículo, onde  $p \leq 0,05$  e <sup>ns</sup> indica que não há diferença estatística em comparação com o veículo. # indica os níveis de significante diferença em comparação com o fármaco referência indometacina, onde  $p \leq 0,05$ .

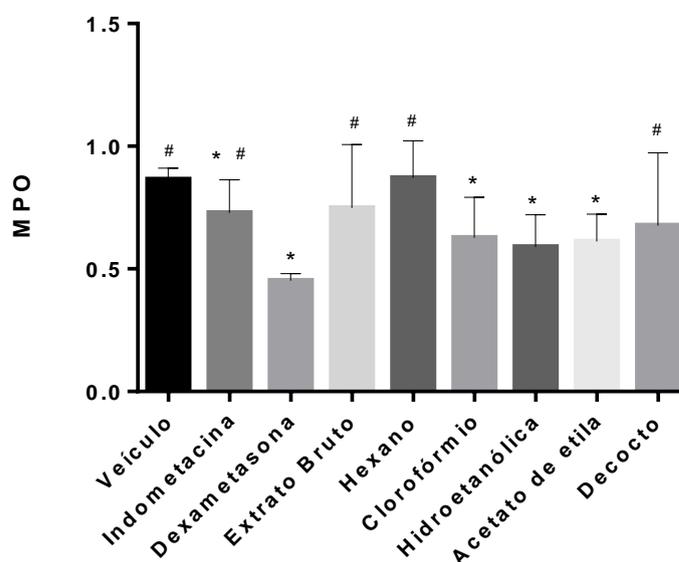


Figura 15 - Efeito do extrato bruto e suas frações e decocto de *O. odorifera* no recrutamento de neutrófilos via dosagem de MPO.

Fonte: Do autor.

Nota: Os resultados foram analisados por ANOVA *one-way* seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunett. \* indica diferença significativa em comparação com o veículo, onde  $p \leq 0,05$ ; # indica diferença significativa em comparação com o fármaco referência, dexametasona, onde  $p \leq 0,05$ .

Os resultados dos testes *in vivo* foram coerentes com o que foi previsto como ativo no modelo de predição, visto que as frações acetato de etila e clorofórmio realmente são ativas, enquanto que a hidroetanólica que foi predita como não ativa, também se mostrou ativa *in vivo*; já o extrato bruto foi predito como ativo, mas *in vivo* não demonstrou atividade anti-inflamatória. Essas divergências de resultados podem ocorrer pela diferença dos constituintes presentes entre as amostras do modelo e as amostras a serem analisadas, visto que o domínio de aplicabilidade do modelo é para Asteraceae. Assim, essa limitação pode levar a resultados falsos negativos. No entanto, se os compostos ativos (variáveis X) da família Asteraceae também estão presentes em extratos de espécies de outras famílias, como Lauraceae, então esses extratos devem ter alto potencial para exibir a atividade farmacológica prevista.

O decocto que é a forma utilizada popularmente para tratamento do reumatismo não apresentou atividade inibitória do recrutamento celular nesse no modelo e na dose avaliada. Dessa forma o decocto, mostrou atuar em apenas uma via da cascata da inflamação, possuindo atividade anti-edematogênica (Figura 10) confirmada. Porém, ação inibitória do recrutamento de neutrófilos não pode ser confirmada, assim como seu efeito sobre a via da LOX (Figura 11).

### 6.3 METABOLÔMICA DA ESPÉCIE ESCOLHIDA

Após, realizou outras análises estatísticas apenas com os dados espectrométricos tratados no Mzmine dos extratos da *O. odorifera* (Figura 16).

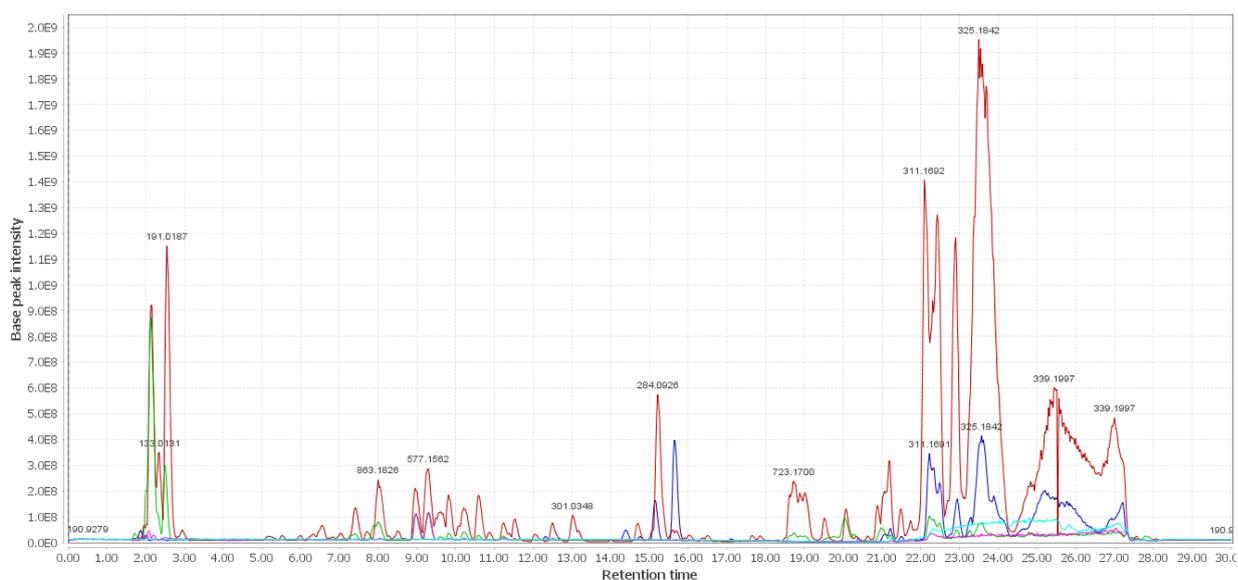


Figura 16 - Cromatograma (modo positivo) do extrato bruto e frações de *O. odorifera* sobrepostos, obtidos através de UPLC-UV HRFTMS.

Fonte: Do autor.

A análise estatística multivariada não supervisionada PCA, permite a obtenção de uma visão geral das amostras avaliadas sem utilizar a informação da atividade biológica, avaliando os extratos de acordo com sua similaridade.

Na figura 17 é possível observar uma maior similaridade entre o extrato bruto e o hidroetanólico, com a formação de um pequeno cluster, e um maior distanciamento entre as frações clorofórmio e acetato de etila. Esse resultado corrobora a diferença de compostos exibida nas diferentes frações, principalmente a clorofórmica que é rica em alcaloides.

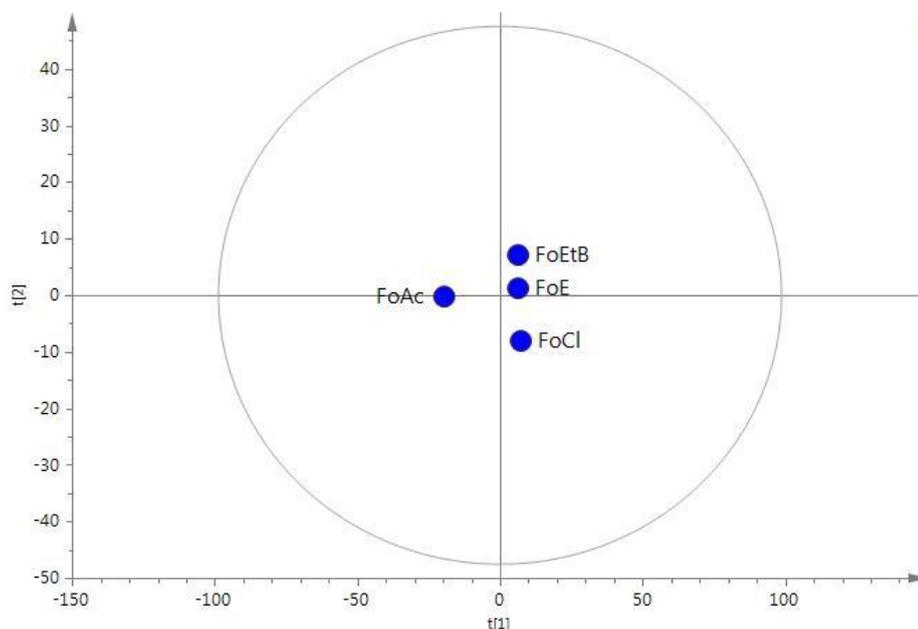


Figura 17 – Distribuição do extrato bruto e frações de *O. odorifera* obtidos na análise por PCA.

Fonte: Do autor.

Nota: FoEtB: Extrato bruto das folhas; FoE: Fração hidroetanólica das folhas; FoCl: Fração clorofórmio das folhas; FoAc: Fração acetato das folhas.

Também foi realizada a análise estatística multivariada supervisionada PLS para a classificação destas amostras de *O. odorifera* e determinação de biomarcadores de acordo com os resultados da atividade anti-inflamatória testada. As frações que apresentaram inibição tanto do edema de orelha quanto da MPO foram definidos como ativos (A), enquanto que o extrato bruto, que não apresentou atividade foi definido como não ativo (N). Este segundo modelo de predição foi realizado com dados do modo positivo e tem domínio de aplicação para estas espécies. Desta forma, poderá identificar as substâncias correlacionadas com as propriedades anti-inflamatórias mesmo que sejam diferentes das substâncias comuns nas espécies ativas da família Asteraceae, visto que o modelo possui domínio de aplicabilidade para Lauraceae e informação real dos testes realizados *in vivo* com o extrato bruto e frações de *O. odorifera*.

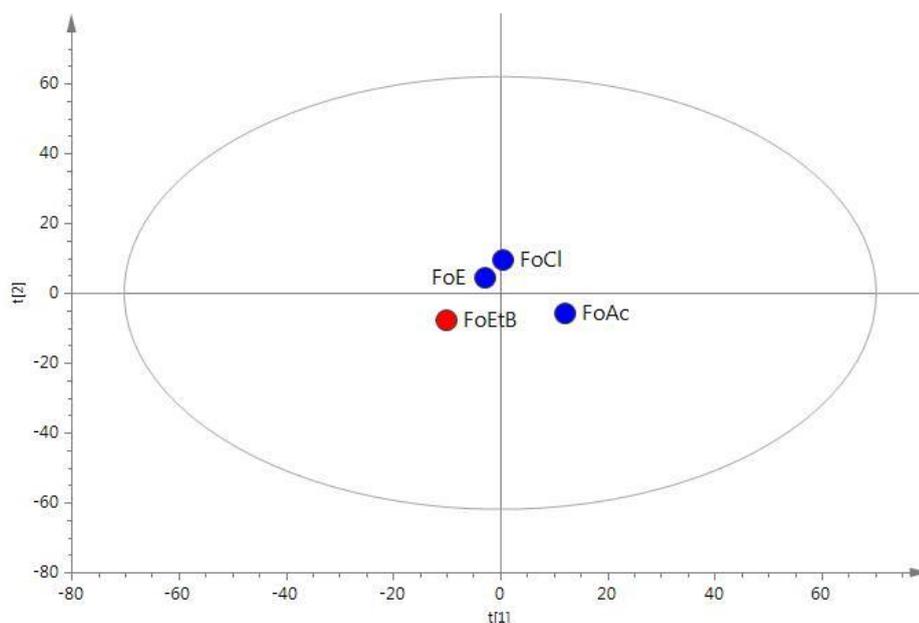


Figura 18 – Distribuição dos extratos de *O. odorifera* na análise por PLS de acordo com a propriedade anti-inflamatória avaliada *in vivo* (Figura 10 e 11), e os dados cromatográficos obtidos no UHPLC-HRMS no modo positivo.

Fonte: Do autor.

Nota: Em vermelho o extrato bruto que não inibe COX e LOX. Em azul as frações que inibe COX e LOX. FoEtB: Extrato bruto das folhas; FoE: Fração hidroetanólica das folhas; FoCl: Fração clorofórmio das folhas; FoAc: Fração acetato das folhas.

Observou-se uma separação satisfatória entre os grupos de acordo com suas propriedades biológicas na análise utilizando PLS (Figura 18), onde os valores de  $R^2 Y$  encontrados foram 0,921, e valor de  $Q^2$  de 0,757. Dessa forma o conjunto de dados foi bem explicado utilizando uma análise estatística mais simples, não sendo necessária a utilização de um modelo mais complexo, como a OPLS, que foi desenvolvida para lidar com a variação ortogonal da classe no conjunto de dados (MAHADEVAN *et al.*, 2008; YULIANA *et al.*, 2011).

A variável importante para a projeção (VIP) fornece informações da importância das variáveis independentes no modelo em relação às respostas biológicas fornecidas, sendo que valores de  $VIP > 1,0$  significam aquelas substâncias que estão mais envolvidas com essa propriedade, sendo também chamadas de biomarcadores da atividade (MAHADEVAN *et al.*, 2008).

É possível observar a presença de 22 VIPs detectadas no modo de ionização positivo (Figura 19, Tabela 5).

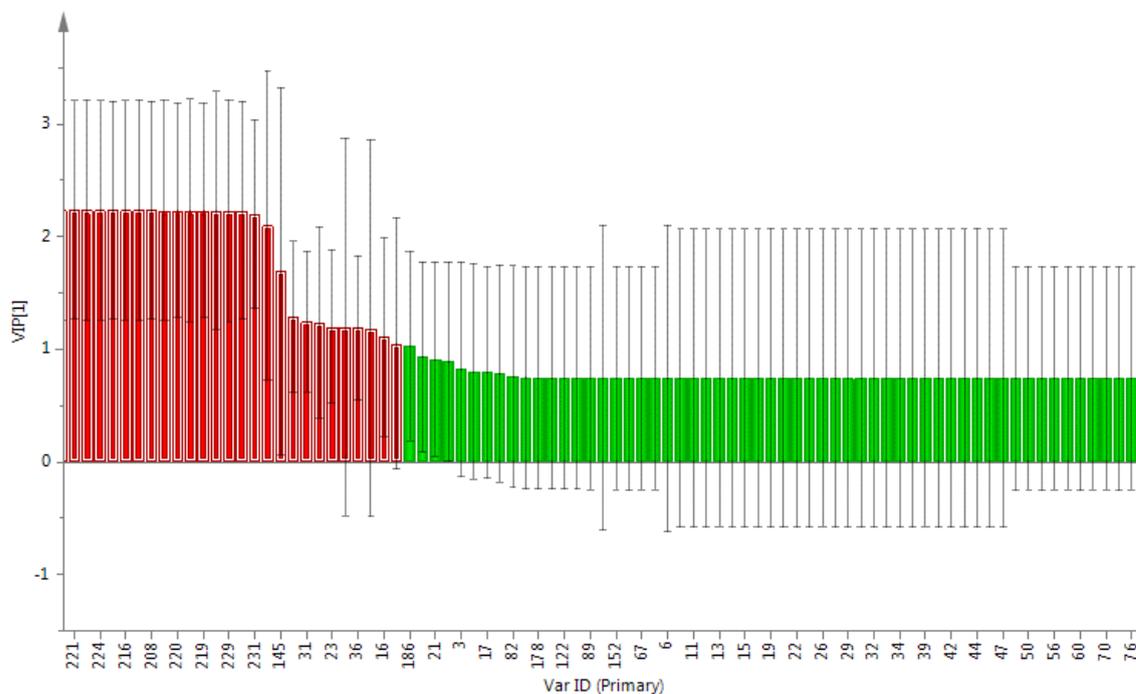


Figura 19 – VIPs correlacionadas com a atividade anti-inflamatória do extrato bruto e frações de *O. odorifera*.

Fonte: Do autor.

Nota: Em vermelho VIP > 1,0.

Outra análise importante disponível no software SIMCA-P é a análise de coeficientes, onde a magnitude dos coeficientes mostra o grau de influência da variável, enquanto que o sinal do coeficiente determina a direção da influência, seja positiva ou negativa.

Dessa forma é possível observar as VIPs que estão correlacionadas positiva ou negativamente com a propriedade anti-inflamatória. Assim, pode-se observar aquelas  $m/z$  que contribuíram diretamente na atividade biológica observada *in vivo* (Figura 20) (CHAGAS-PAULA et al., 2015b).

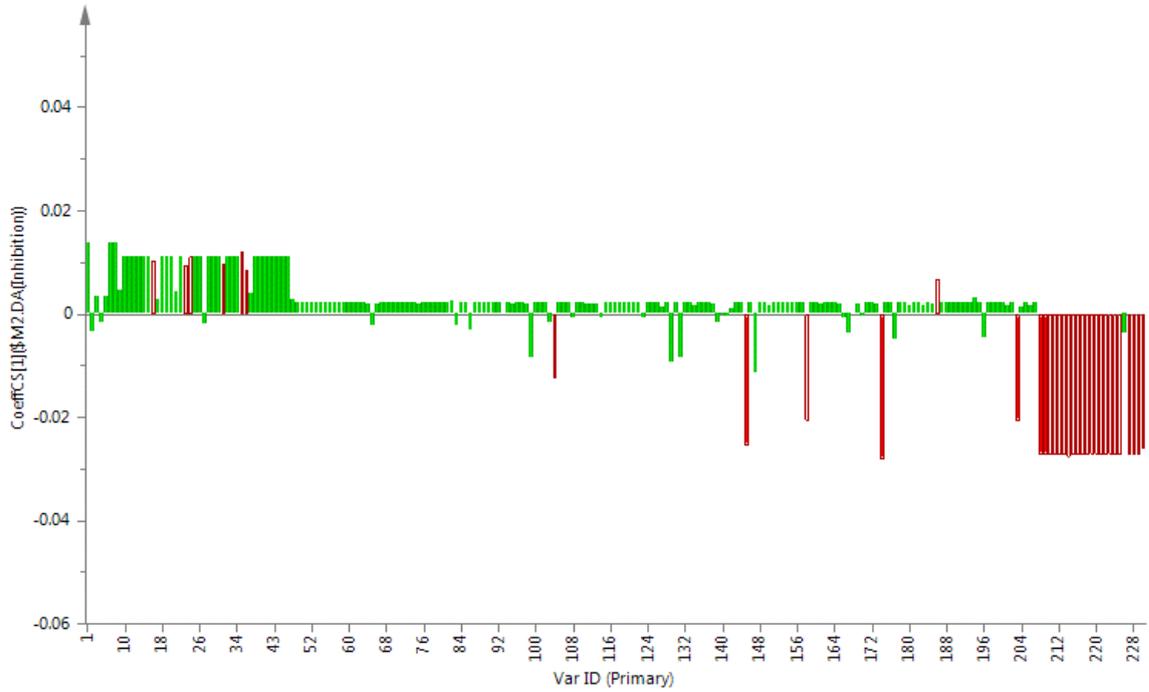


Figura 20 – Visão geral dos coeficientes correlacionados com a atividade anti-inflamatória do extrato bruto e frações de *O. odorifera*.

Fonte: Do autor.

Nota: Em vermelho e para cima VIP > 1,0 correlacionado com a atividade anti-inflamatória. Em vermelho e para baixo VIP > 1,0 não correlacionado com a atividade anti-inflamatória.

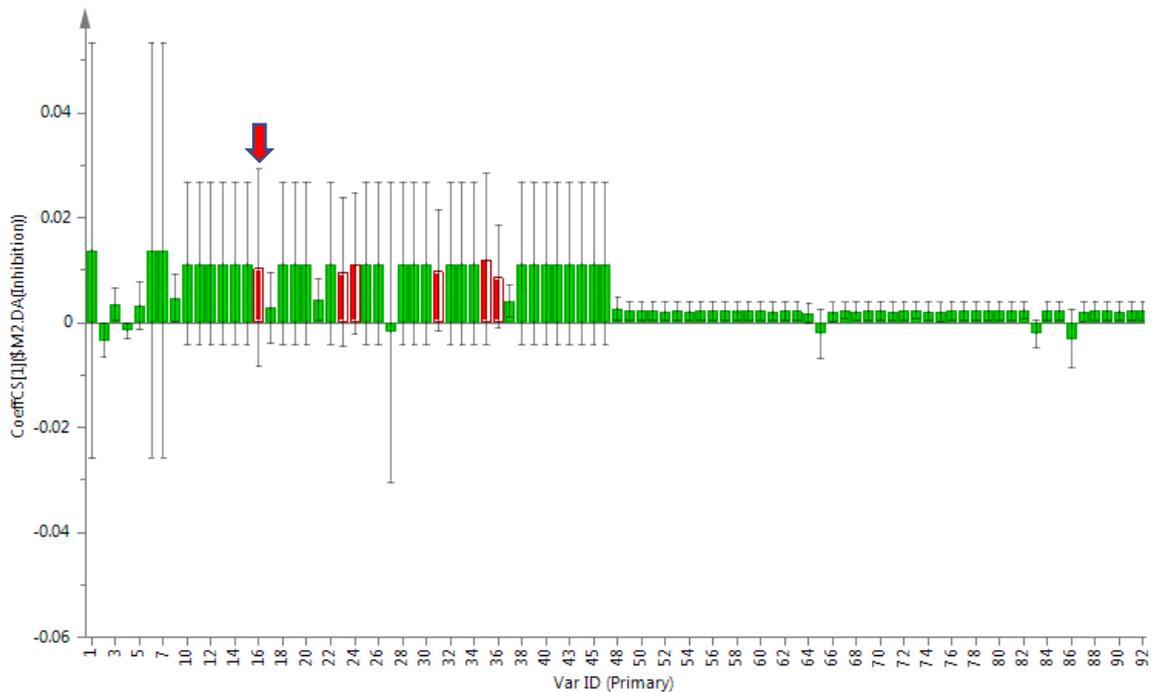


Figura 21 – Ampliação dos coeficientes correlacionados com a atividade anti-inflamatória do extrato bruto e frações de *O. odorifera*.

Fonte: Do autor.

Nota: Em vermelho e para cima VIP > 1,0 correlacionado com a atividade anti-inflamatória. A seta vermelha indica a VIP 16,  $m/z$  330,1700.

Uma das VIPs, com a identificação 16 (Tabela 4) e valor de 1.1093, apresentou-se predominante na fração clorofórmio, possibilitando seu isolamento e identificação. É possível observar que essa VIP se encontra entre as substâncias que estão correlacionadas positivamente com a propriedade de inibir COX e LOX (Figura 21, seta vermelha), com coeficiente de correlação de + 0,0104574.

#### 6.4 DESREPLICAÇÃO

A desreplicação das substâncias com valores de VIP maiores que 1,0 obtidos no modelo PLS para o extrato bruto e frações, permitiu verificar a possível fórmula molecular para cada uma das variáveis importantes para a projeção do modelo, além dos *hits* encontrados para algumas estruturas.

Como esperado para a espécie *O. odorifera*, a maioria das substâncias encontrada detectadas no modo de ionização positivo tratam-se de compostos nitrogenados (Tabela 5), alcaloides que é uma classe de substâncias comumente encontradas nesta espécie e são potencialmente ativos no modelo anti-inflamatório estudado (SALLEH; AHMAD, 2017). Contudo, para diversas VIPs não foi encontrado nenhum *hit*, mesmo empregando tais bancos de dados abrangentes, o que sugere que estas se tratam de substâncias possivelmente inéditas.

O ID 16, com  $m/z$  330,1700, apresentou diversos *hits* encontrados no banco de dados DNP. Os *hits* são referentes à diversos alcaloides encontrados em diferentes espécies, sendo que entre, 2 são referentes aos isômeros do alcaloide denominado reticulina.

Em vermelho é possível observar as substâncias que estão correlacionadas positivamente com a propriedade de inibir COX e LOX, sendo que entre essas três VIPs, um deles não apresentou nenhum *hit*, o que sugere que seja uma substância possivelmente inédita.

Tabela 5 – Desrepliação das VIPs correlacionadas com a atividade anti-inflamatória pela análise PLS, do extrato bruto e frações de *O. odorifera*, no modo positivo.

ID	VIP	m/z	TR	Erro (ppm)	FM [M+H] <sup>+</sup>	Hits – DNP
227	2,23551	400,378	21,5762	-0,477	C <sub>24</sub> H <sub>50</sub> O <sub>3</sub> N	0
217	2,23551	362,326	19,0707	-1,781	C <sub>20</sub> H <sub>44</sub> O <sub>4</sub> N	0
218	2,2355	356,352	21,6631	-0,803	C <sub>22</sub> H <sub>46</sub> O <sub>2</sub> N	0
209	2,23549	318,3	19,0216	-0,976	C <sub>18</sub> H <sub>40</sub> O <sub>3</sub> N	1 2-Amino-1,3,4-octadecanetriol
212	2,23549	330,336	21,4031	-1,078	C <sub>20</sub> H <sub>44</sub> O <sub>2</sub> N	0
221	2,23549	290,269	16,128	-2,379	C <sub>16</sub> H <sub>36</sub> O <sub>3</sub> N	1 2-Amino-1,3,4-hexadecanetriol
215	2,23548	346,331	20,6107	-0,868	C <sub>20</sub> H <sub>44</sub> O <sub>3</sub> N	6 - Isômeros do 2-Amino-1,3,4-eicosanetriol
224	2,23548	262,237	12,7697	-0,459	C <sub>14</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub> N	0
213	2,23547	246,243	15,9096	-0,633	C <sub>14</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub> N	0
216	2,23547	218,211	12,4117	-1,813	C <sub>12</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub> N	0
210	2,23547	302,305	20,5613	-1,707	C <sub>18</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub> N	1 - 2-Amino-1,3-octadecanediol
208	2,23532	274,274	18,8476	-1,261	C <sub>16</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub> N	0
225	2,23455	513,413	23,5141	0,856	C <sub>26</sub> H <sub>53</sub> O <sub>4</sub> N <sub>6</sub>	0
228	2,23436	557,438	23,5142	0,511	C <sub>28</sub> H <sub>57</sub> O <sub>5</sub> N <sub>6</sub>	0
219	2,23434	425,36	23,5548	-0,05	C <sub>22</sub> H <sub>45</sub> O <sub>2</sub> N <sub>6</sub>	0
214	2,23108	478,322	21,4359	-0,240	C <sub>33</sub> H <sub>40</sub> N <sub>3</sub>	0
229	2,23087	437,194	20,3873	1,62	C <sub>22</sub> H <sub>33</sub> O <sub>3</sub> N <sub>2</sub>	1 - Racemosina – alcaloide diterpênico
223	2,23045	312,326	22,7092	-0,33	C <sub>20</sub> H <sub>42</sub> ON	1 - 2-Eicosanona
31	1,24625	331,217	15,1762	-0,982	C <sub>23</sub> H <sub>27</sub> N <sub>2</sub>	0
23	1,19955	316,284	22,2965	-0,729	C <sub>18</sub> H <sub>38</sub> O <sub>3</sub> N	5 – Leptofilina A, alcaloide
16	1,1093	330,17	8,72806	-1,196	C <sub>19</sub> H <sub>24</sub> O <sub>4</sub> N	63 - Alcaloides, reticulina
104	1,05268	279,159	22,2136	-0,629	C <sub>16</sub> H <sub>23</sub> O <sub>4</sub>	77 – metabólitos de diversas espécies

Fonte: Do autor.

## 6.5 ESTUDO FITOQUIMICO

Com o rendimento de 10,18%, a massa obtida no extrato bruto da espécie *O. odorifera* foi de 203,75 g. Após o particionamento, o isolamento foi direcionado para a fração clorofórmio, por se tratar da fração rica em alcaloides e VIPs, substâncias potencialmente ativas pelo mecanismo de ação requerido. O rendimento desta fração foi de 0,72g ou 0,35% do extrato bruto.

Parte da fração foi submetida ao processo de cromatografia em coluna para a separação dos seus constituintes. O procedimento foi acompanhado por cromatografia em camada delgada analisada em câmara de UV de  $\lambda = 254$  e 365nm para o agrupamento das frações obtidas. Além disso, utilizou-se o revelador de *Dragendorff* e confirmou-se a presença de alcaloides na fração alcaloídica obtida. Na presença deste revelador, compostos nitrogenados heterocíclicos originam precipitados alaranjados, de modo que a cor varia de acordo com o tipo de composto, variando desde amarelo a até vermelho acastanhado. No caso dos alcaloides presentes nesta planta, estes precipitaram com coloração vermelha escuro-acastanhado.

Foram obtidas 60 subfrações que foram agrupadas em 18 grupos de acordo com o seu perfil cromatográfico obtido por CCD. O grupo 12 (subfrações 30-33) foi então submetido as técnicas de HPLC-UV-DAD ultra analítico, confirmando sua pureza (Figura 22) e, após, foi encaminhado para a técnica de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . Além de ser determinada sua massa através de análise direta em espectrômetro de massa de alta resolução.

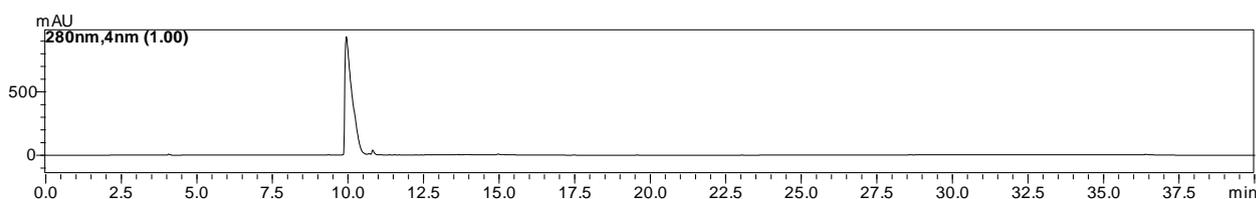


Figura 22 – Cromatograma do grupo 12, obtido da fração alcaloídica por HPLC-UV-DAD

Fonte: Do autor.

Nota: Coluna C18 – 5  $\mu\text{m}$  7,6 mm x 250 mm, fluxo de 1,0 mL/min , eluente: 5% a 100% de ACN:H<sub>2</sub>O com 0,1% de ácido acético por 40 min.

O rendimento do composto isolado representado pelo grupo 12 foi de 0,1079 mg, 0,053% da fração alcaloídica (Tabela 6). As demais subfrações não apresentaram pureza satisfatória, nem massa suficiente para continuar o isolamento.

Tabela 6 – Rendimento da substância isolada da fração alcaloídica.

Alcaloide	Massa (mg)	Rendimento (%)
Grupo 12	0,1079	0,053

Fonte: Do autor.

## 6.6 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL

A partir da análise espectroscópica de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  da amostra, obtida em DMSO deuterado, verificou-se que a mesma se tratava de uma substância já isolada, muito comum no gênero *Ocotea*, um alcaloide denominado reticulina CUSTÓDIO; FLORENCIO, 2014).

A reticulina (1 mg,  $[\alpha]_D^{25} +57^\circ c 0.1$ , MeOH) (Figura 23) foi isolada na forma de um sólido amorfo, amarelo-escuro. O espectro de massa HRMS-TOF, apresentou um íon  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $m/z$  330,1710 (Figura 24), correspondente a fórmula molecular  $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{NO}_4$  (massa calculada 330,1700, erro: 0,49 ppm).

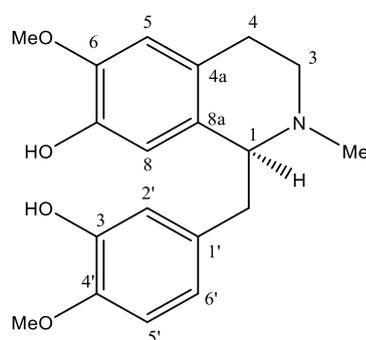


Figura 23 – Estrutura química da reticulina.

Fonte: Do autor.

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figuras 25, 26 e 27) foram identificados dois grupos metoxila sobrepostos em  $\delta$  3,88, correspondente a Ome-6 e Ome-4'. Também se observou a presença de cinco prótons aromáticos nos deslocamentos  $\delta$  6,61 (1H, d,  $J= 2,0$  Hz),  $\delta$  6,71 (1H, d,  $J= 8,2$  Hz),  $\delta$  6,49 (1H, dd,  $J= 8,2$  e  $2,0$  Hz) referentes ao anel tri-substituído e  $\delta$  6,55 (1H, s) e  $\delta$  6,36 (1H, s) referentes ao tetra-substituído. Uma metila ligada a um nitrogênio, apresentando um singlete em  $\delta$  2,30 (3H, s). Sinais de H metilênicos em [ $\delta$  2,47 (1H, m) e 2,65 (1H, m)], [ $\delta$  2,56 (1H, m) e 3,03 (1H, m)] e H metilênicos em [ $\delta$  2,60 (1H, dd,  $J= 15,0$  e  $5,0$  Hz) e  $\delta$  2,83 (1H, dd,  $J= 15,0$  e  $7,3$  Hz)]. Sinal do hidrogênio metínico em  $\delta$  3,56 (1H, t,  $J= 5,0$  e  $7,3$ ) (Tabela 7) (SAIDI et al., 2011).

Na análise de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 28) observou-se 19 sinais de carbonos que foram coerentes com a estrutura da reticulina, onde foram observados os sinais de três metilas, três carbonos metilênicos, seis metinas e sete carbonos quaternários. Sendo que através da análise do experimento DEPT 135 (Distortion Leds Enhancement by Polarization Transfer) (Figura 29) confirmou-se a presença dos carbonos metilênicos.

Tabela 7 – Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  da reticulina, 300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>.

Posição	$\delta$ $^1\text{H}$ (m, J/Hz)	$\delta$ $^1\text{H}$ (m, J/Hz)*	$\delta$ $^{13}\text{C}$	$\delta$ $^{13}\text{C}$ *
1	3,56 (1H, <i>t</i> , <i>J</i> = 5,0 e 7,3 Hz)	3.69 (1H, <i>m</i> )	64,3	64.5
3	2,56 (1H, <i>m</i> ) e 3,03 (1H, <i>m</i> )	2.78 (1H, <i>m</i> )	47,1	46.8
4	2,47 (1H, <i>m</i> ) e 2,65 (1H, <i>m</i> )	2.52 (1H, <i>m</i> ) e 2.72 (1H, <i>m</i> )	24,8	25,0
4 <sup>a</sup>	-	-	129,9	130.3
5	6,55 (1H, <i>s</i> )	6.51 (1H, <i>s</i> )	112,2	110.6
6	-	-	146,2	143.4
7	-	-	144,6	143.4
8	6,36 (1H, <i>s</i> )	6.35 (1H, <i>s</i> )	114,8	113.7
8 <sup>a</sup>	-	-	124,6	125.3
$\alpha$	2,60 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 15,0 e 5,0 Hz) 2,83 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 15,0 e 7,3 Hz)	2.70 (1H, <i>m</i> ) 2.99 (1H, <i>m</i> )	40,6	41,0
1'	-	-	132,9	133.3
2'	6,61 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2,2 Hz)	6.74 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2.2)	117,2	115.7
3'	-	-	146,4	145.3
4'	-	-	146,3	145.0
5'	6,71 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8,1 Hz)	6.71 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8.2)	112,2	110.6
6'	6,49 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 8,2 e 2,0 Hz)	6.56 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 2,0, 8.2)	120,4	120.9
Ome – 6	3,88 (3H, <i>s</i> )	3.82 (3H, <i>s</i> )	55,9	55.9
Ome – 4	3,88 (3H, <i>s</i> )	3.82 (3H, <i>s</i> )	56,00	55.9
N – Me	2,30 (3H, <i>s</i> )	2.43 (3H, <i>s</i> )	42,5	42.5

Fonte: Do autor.

Nota: \* 400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, (FADAEINASAB, 2014).

O alcaloide isolado, reticulina, se trata de um dos biomarcadores da atividade anti-inflamatória correlacionado positivamente com a propriedade de inibir COX e LOX. Este se trata de um alcaloide do tipo benzilisoquinolínico, muito encontrado na família Lauraceae (CUSTÓDIO; FLORÊNCIO, 2014).

Essa substância já demonstrou atividade anti-inflamatória (YANG et al., 2017), contudo é a primeira vez que será avaliada sua atividade com mecanismo dual nas vias COX e LOX.

## 6.7 ANÁLISE DOS COMPONENTES DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *O. odorifera*

As folhas e caules frescos após serem hidrodestilados proporcionaram grande quantidade de ambos os óleos, onde se obteve cerca de 10 mL do óleo essencial dos galhos e 5 mL do óleo essencial das folhas. O óleo essencial das folhas apresentou-se mais esverdeado, enquanto o dos galhos teve coloração amarelada, ambos apresentam cheiro intenso e marcante. Os óleos

essenciais foram analisados por GC-MS (coluna capilar RTX-5). Os compostos individuais foram desreplicados de acordo com os  $t_R$  obtidos, comparando-se com o tempo de retenção teórico e os seus respectivos índices de Kovats (IK), ambos em comparação com os espectros de massa obtidos na literatura (ADAMS, 2009). Também foram comparados os seus índices de similaridade (IS) obtidos pela biblioteca NIST08s (Tabela 8).

Tabela 8 – Desreplicação do óleo essencial dos galhos obtida de *O. odorifera*.

Compostos	$t_R$	$t_R$ - Teórico**	IS*	IK - Calculado	IK - Teórico**	Porcentagem relativa (%)
$\alpha$ -pineno	5,6	5,9	97	-	939	0,60
Canfeno	6,0	6,3	96	-	954	0,87
$\beta$ -pineno	6,9	7,0	96	-	979	0,43
Mirceno	7,2	7,4	92	1001	990	0,37
$\alpha$ -felandreno	7,7	7,9	97	1014	1002	0,12
Cimeno	8,4	8,5	96	1033	1024	0,27
Limoneno	8,6	8,7	96	1037	1029	1,33
Linalol	11,3	11,3	92	1109	1096	2,50
Cânfora	13,2	13,2	96	1154	1146	14,15
Terpine-4-ol	14,5	14,7	94	1185	1177	0,56
$\alpha$ -terpineol	15,1	15,2	91	1199	1188	1,08
Safrol	19,6	19,6	91	1304	1287	72,29
1-nitro 2-feniletano	19,9	19,9	-	1309	1295	0,24
6,9-guaiadiene	25,8	26,4	-	1452	1444	0,19
cis- $\beta$ - guaieno	28,4	28,5	-	1517	1493	0,49
$\delta$ -amorfenol	29,0	29,3	-	1533	1512	0,15
Guaiol	31,9	32,9	-	1608	1600	0,71
TOTAL	-	-	-	-	-	96,35

Fonte: Do autor.

Nota: \*Biblioteca NIST08s; IS = Índice de Similaridade \*\*Adams 2009; TR= tempo de retenção; IK = Índice de Kovats.

Foram observados 17 compostos no óleo dos galhos (Tabela 8) que juntos representaram aproximadamente 96,35 % da composição total de óleo. O óleo é composto na sua maioria pelo safrol (72,29%), cânfora (14,15 %) e linalol (2,50%) (Figura 30). Como esperado para o óleo essencial de desta espécie o composto majoritário é o safrol, que é o responsável por diversas propriedades exibidas por esse óleo, como a atividade inseticida (MOSSI et al., 2013). Sabe-se que a cânfora também exibe diversas propriedades biológicas, inclusive anti-inflamatória (RESSLER-EHRNHOFER et al., 2013).

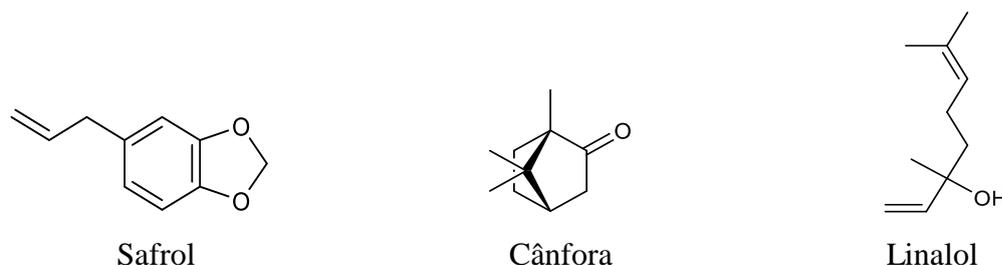


Figura 30 – Estrutura química dos compostos majoritários do óleo essencial dos galhos de *O. odorifera*.

Fonte: Do autor.

Também se realizou a desreplificação para os principais compostos presentes no óleo essencial das folhas de *O. odorifera* (Tabela 9).

Tabela 9 – Desreplificação do óleo essencial das folhas obtida de *O. odorifera*.

Compostos	t <sub>R</sub>	t <sub>R</sub> – Teórico**	IS* (%)	IK - Calculado	IK – Teórico**	Porcentagem relativa (%)
α-pineno	5,6	5,8	97	-	939	1,14
Canfeno	6,0	6,2	96	-	954	1,06
Sabineno	6,7	6,9	94	-	975	1,55
β-pineno	6,8	7,0	96	-	979	0,77
Mirceno	7,2	7,4	92	1001	990	0,57
α-felandreno	7,7	7,9	97	1014	1002	0,25
Limoneno	8,6	8,6	96	1037	1029	1,66
1,8-cineol	8,7	8,8	-	1039	1031	0,32
δ-terpineno	9,7	9,8	94	1067	1059	0,23
Linalol	11,3	11,3	92	1109	1096	0,26
Cãnfora	13,2	13,2	96	1153	1146	7,97
Terpinen-4-ol	14,5	14,6	94	1185	1177	0,63
α-terpineol	15,1	15,2	91	1199	1188	0,35
Safrol	19,6	19,6	92	1304	1287	70,64
β- elemeno	23,7	24,2	-	1400	1390	0,27
6,9-guaiadiene	25,7	26,4	-	1452	1444	1,38
Espirolepequino	26,0	26,7	-	1457	1451	0,58
Germacreno D	27,3	27,9	90	1489	1481	0,27
Biciclogermacreno	28,0	28,8	92	1506	1500	3,73
Espatuleno	31,1	31,9	88	1587	1578	1,48
TOTAL	-	-	-	-	-	95,11

Fonte: Do autor.

Nota: \*Biblioteca NIST08s; IS = Índice de Similaridade \*\*Adams 2009; TR= tempo de retenção; IK = Índice de Kovats.

Foram observados 20 compostos no óleo essencial das folhas de *O. odorifera*, que juntos representaram aproximadamente 95,11% da composição total de óleo (Tabela 9). O óleo é composto na sua maioria pelo safrol (70,64%), cãnfora (7,97%) e biciclogermacreno (3,73%) (Figura 31). O sesquiterpeno, biciclogermacreno, também possui atividade anti-inflamatória relatada na literatura (DUTRA et al., 2008).

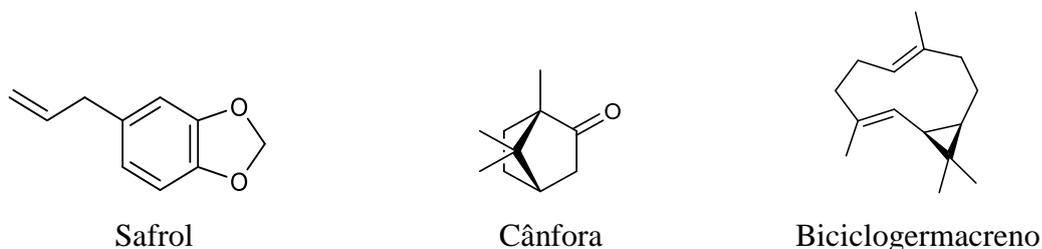


Figura 31 – Estrutura química dos compostos majoritários dos óleos essenciais das folhas de *O. odorifera*.

Fonte: Do autor.

Dessa forma todos os compostos majoritários de ambos óleos essenciais das folhas e dos galhos de *O. odorifera* possuem atividade anti-inflamatória. Além de diversos outros compostos que estão presentes em diferentes porcentagens que possuem atividade anti-inflamatória, como por exemplo o mirceno, o  $\alpha$ -pineno, o limoneno e o germacreno D (ESTEVES et al., 2005; SOUZA et al., 2003).

Desta forma, embora o óleo essencial ainda não tenha sido avaliado quanto a sua propriedade anti-inflamatória, ele possui alto potencial para isso e, portanto, teve tal propriedade investigada neste trabalho.

## 6.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DOS ÓLEOS E RETICULINA

A avaliação da atividade anti-inflamatória também foi realizada com os óleos essenciais das folhas e dos galhos, bem como da reticulina, que se trata de um biomarcador correlacionado positivamente com a propriedade de inibir COX e LOX.

### 6.8.1 Edema de orelha

O ensaio com os óleos essenciais das folhas e dos galhos, bem como da reticulina também demonstrou significativo potencial anti-inflamatório de ambos quando comparada ao veículo (Figura 32). Houve redução significativa do edema de orelha no grupo tratado com os óleos essenciais. Vale ressaltar que a reticulina exibiu valores de porcentagem de inibição equiparável ao exibido pelo fármaco referência indometacina (60,26%) (Tabela 10).

É possível observar que os óleos essenciais possuem uma excelente atividade anti-inflamatória quando comparados como o fármaco de referência, o Acheflan. Sendo que o óleo essencial dos galhos na concentração de 2,5 mg/orelha, se mostrou estatisticamente muito ativo, apresentado porcentagem de inibição de 79,21%, superior ao controle positivo (Tabela 10).

Tabela 10 - Percentagem de inibição do edema de orelha dos óleos essenciais de *O. odorifera*, da reticulina e dos controles positivos.

Amostra	Edema de Orelha (mg) Média±EMP	% de Inibição
Reticulina 0,5	1,41±0,9*	62,89
Reticulina 1,0	1,32±0,7*	65,26
Óleo das folhas 0,5	2,02±0,8*	46,84
Óleo das folhas 2,5	1,73±0,8*	54,47
Óleo dos galhos 0,5	1,25±0,6*	67,10
Óleo dos galhos 2,5	0,79±0,3*,**	79,21
Indometacina	1,51±0,2*	60,26
Dexametasona	1,01±0,3*	73,42
Acheflan	1,76±1,1*	53,68
Veículo	3,80±0,5 #,**	-

Fonte: Do autor.

Nota: Os resultados foram analisados por ANOVA *one-way* seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunett e expressos como média ± EMP. \* indica diferença significativa em comparação com o veículo, onde  $p \leq 0,05$ . # indica diferença significativa em comparação com o fármaco referência, indometacina, onde  $p \leq 0,05$ . \*\* indica diferença significativa em comparação com o fármaco de referência, Acheflan, onde  $p \leq 0,05$ .

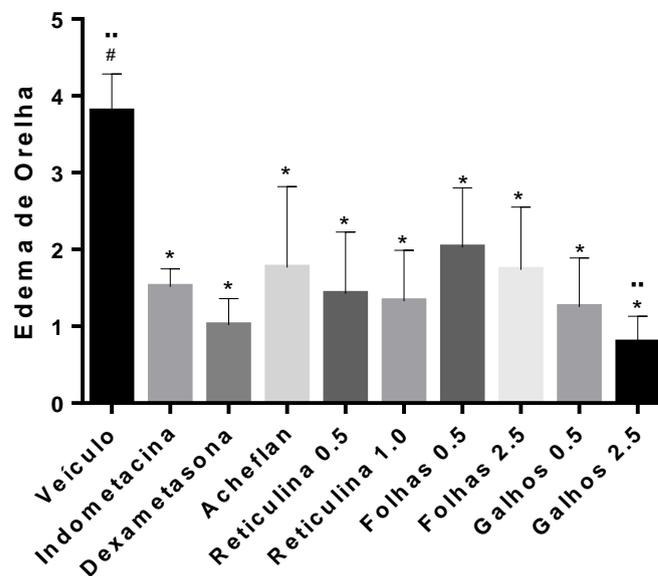


Figura 32 - Avaliação da atividade anti-inflamatória dos óleos essenciais de *O. odorifera* e da reticulina no modelo de edema de orelha em camundongos.

Fonte: Do autor.

Nota: Os resultados foram analisados por ANOVA *one-way* seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunett. \* indica diferença significativa em comparação com o veículo, onde  $p \leq 0,05$ . # indica diferença significativa em comparação com o fármaco referência, indometacina, onde  $p \leq 0,05$ . \*\* indica diferença significativa em comparação com o fármaco de referência, Acheflan, onde  $p \leq 0,05$ .

### 6.8.2 Ensaio de MPO para avaliar recrutamento de neutrófilos

Também foram avaliados frente a inibição da MPO os óleos essenciais das folhas e dos galhos, além da substância isolada, a reticulina. É possível observar que a reticulina e os óleos essenciais apresentaram significativa inibição da MPO (Tabela 11, figura 33), de maneira dose dependente, sendo as maiores doses significativamente iguais ao controle positivo dexametasona.

Tabela 11 – Avaliação do recrutamento de neutrófilos dos óleos essenciais e da reticulina.

<b>Amostra</b>	<b>Absorbância Média±EMP</b>
Reticulina 0,5	0,35±0,07* <sup>#</sup>
Reticulina 1,0	0,27±0,09*
Óleo das folhas 0,5	0,40±0,07 <sup>ns,#</sup>
Óleo das folhas 2,5	0,31±0,10*
Óleo dos galhos 0,5	0,35±0,07* <sup>#</sup>
Óleo dos galhos 2,5	0,32±0,10*
Indometacina	0,30±0,05* <sup>#</sup>
Dexametasona	0,26±0,07*
Veículo	0,50±0,02 <sup>ns</sup>

Fonte: Do autor.

Nota: Os resultados foram analisados por ANOVA *one-way* seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunnett e expressos como média ± EMP. \* indica os níveis de significância em comparação com o veículo, onde  $p \leq 0,05$ ; # indica diferença significativa em comparação com o fármaco referência, dexametasona, onde  $p \leq 0,05$  e <sup>ns</sup> indica que não há significância estatística, ainda em comparação com o veículo. 0.35±0,07

Portanto, tanto a reticulina como os óleos essenciais apresentam inibição dual das vias da COX e LOX nas maiores doses (Figura 33). Enquanto as menores doses foram significativamente parecidas com o controle negativo e indometacina, que não apresentam inibição da via da LOX.

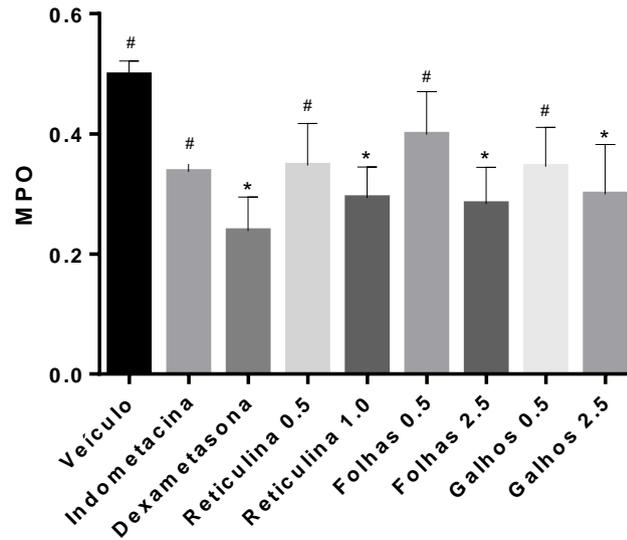


Figura 33 - Efeito dos óleos essenciais de *O. odorifera* e da reticulina no recrutamento de neutrófilos via dosagem de MPO.

Fonte: Do autor.

Nota: Os resultados foram analisados por ANOVA *one-way* seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunnett. \* indica diferença significativa em comparação com o veículo, onde  $p \leq 0,05$ ; # indica diferença significativa em comparação com o fármaco referência, dexametasona, onde  $p \leq 0,05$ .

Contudo, é notável que a espécie *O. odorifera* é muito rica em compostos, tanto nos óleos essenciais quanto nos seus extratos que conferem a atividade relatada pela população, visto que as diferentes frações, a reticulina, bem como os óleos essenciais demonstraram potencial ação dual na cascata da inflamação, com mecanismo nas vias COX e LOX, corroborando com o modelo estatístico obtido, tanto com domínio de aplicabilidade de Asteraceae quanto no modelo de aplicabilidade de Lauraceae. Sendo que nesse segundo modelo, o biomarcador isolado que é correlacionado positivamente com a propriedade de ação dual, comprovou sua atividade nos testes *in vivo*.

## 8 CONCLUSÃO

Através das abordagens metabolômicas, foi possível construir um modelo de predição de novas espécies da família Lauraceae potencialmente associadas a atividade anti-inflamatória, sendo que a espécie *O. odorifera* além de já possuir histórico etnofarmacológico para essa propriedade, foi predita como potencialmente ativa nesse modelo. Nesse sentido, ela foi escolhida para os estudos fitoquímicos e metabolômicos.

O extrato bruto e frações desta espécie foram submetidos aos ensaios biológicos, sendo que as frações hidroetanólica, acetato de etila e clorofórmio demonstraram potencial anti-inflamatório, agindo de forma dual nas vias COX e LOX, enquanto o decocto utilizado pela população demonstrou agir na via da COX. Assim, a partir dos resultados da avaliação do potencial anti-inflamatório dos extratos e a utilização de análises metabolômicas e de correlação *in silico*, foi possível verificar os biomarcadores da atividade biológica através das VIPs. Após a obtenção desses biomarcadores, a desrepliação dos mesmos demonstrou que a maioria se trata de alcaloides, muitos deles sem nenhum *hit*, quando analisados no banco de dados DNP.

Dessa forma, da fração clorofórmio isolou-se um alcaloide benzilisoquinolínico denominado reticulina. Sendo que este composto se trata de um dos biomarcadores correlacionados positivamente com atividade anti-inflamatória. Logo, esse alcaloide juntamente com os óleos essenciais das folhas e dos galhos de *O. odorifera* foram também submetidos aos ensaios anti-inflamatórios, demonstrando ser ativos frente a inibição dual das enzimas pesquisadas, corroborando com os resultados obtidos nas abordagens metabolômicas tanto para predição quanto para *O. odorifera*.

Dessa forma conclui-se que a espécie *O. odorifera* é muito rica em compostos, tanto nos óleos essenciais quanto nos seus extratos, inclusive alcaloides, que lhe conferem a atividade relatada pela população e capacidade de atuar em mais de uma via da cascata da inflamação, agindo de forma dual nas vias COX e LOX. Esta e as demais espécies preditas como ativas merecem maiores estudos que poderão ser úteis para o desenvolvimento de novos medicamentos anti-inflamatórios potencialmente mais eficazes que os disponíveis até o momento.

## REFERÊNCIAS

- ALEXANDER, D.; TROPSHA, A.; WINKLER, D. A. Beware of R<sup>2</sup>: Simple, Unambiguous Assessment of the Prediction Accuracy of QSAR and QSPR Models. **Journal of Chemical Information and Modeling**, Washington, DC p. 1-25, 2015.
- ARETZ, I.; MEIERHOFER, D. Advantages and pitfalls of mass spectrometry based metabolome profiling in systems biology. **International Journal of Molecular Sciences**, Berlin, sl, v. 17, n. 5, p. 1-14, 2016.
- BALDIM, João Luiz et al. The Correlation between Chemical Structures and Antioxidant, Prooxidant, and Antitrypanosomatid Properties of Flavonoids. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, sl, v. 2017, p. 1-12, 2017.
- BARBOSA-FILHO, J. M. et al. Anti-inflammatory activity of alkaloids: a twenty-century review. **Brazilian journal of Pharmacology**, sl, v. 16, n. 1, p. 109–139, 2006.
- BOTSARIS, A. S. Plants used traditionally to treat malaria in Brazil: The archives of Flora Medicinal. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, sl, v. 3, 2007.
- CAMARGO, M. J. et al. Sesquiterpenos de *Ocotea lancifolia* (Lauraceae). **Quim. Nova**, sl, v. 36, n. 7, p. 1008–1013, 2013.
- CARDINAL, S. et al. Anti-inflammatory properties of quebecol and its derivatives. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, sl, v. 26, n. 2, p. 440–444, 2015.
- CHAGAS-PAULA, D. A. et al. A metabolomic approach to target compounds from the asteraceae family for dual COX and LOX inhibition. **Metabolites**, sl, v. 5, n. 3, p. 404–430, 2015a.
- CHAGAS-PAULA, D. A. **Estudos metabolômicos de Asteraceae por UPLC - UV - HRFTMS, avaliação do potencial anti-inflamatório in vitro e suas correlações através de métodos in silico**. 2013. 118f. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2013.
- CHAGAS-PAULA, D. A. et al. Prediction of anti-inflammatory plants and discovery of their biomarkers by machine learning algorithms and metabolomic studies. **Planta Medica**, sl, v. 81, n. 6, p. 450–458, 2015b.
- CONCEIÇÃO, R. S. et al. *In vitro* acaricide activity of *Ocotea aciphylla* (Nees) Mez. (Lauraceae) extracts and identification of the compounds from the active fractions. **Ticks and Tick-borne Diseases**, sl, v. 8, p. 275–282, 2017.
- COSMO, S. A. et al. Gastroprotective effect of hydroalcoholic extract from barks of *Persea major* Kopp (Lauraceae) in rats. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, sl, v. 17, n. 4, p. 533–537, 2007.

- COSTA, I. F. B. et al. Antimycobacterial and nitric oxide production inhibitory activities of *Ocotea notata* from Brazilian restinga. **The Scientific World Journal**, sl, v. 2015, p. 1–9, 2015.
- CROTTI, M. A. E. Espectrometria de massas com ionização por “*electrospray*”: processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. **Quim. Nova**, sl, v. 29, n. 2, p. 287–292, 2006.
- CUSTÓDIO, D. L.; FLORÊNCIO V. J. V. Lauraceae alkaloids. **RSC Adv.**, sl, v. 4, n. 42, p. 21864–21890, 2014.
- DA SILVA, D. T. et al. Physicochemical characterization of leaf extracts from *Ocotea lancifolia* and its effect against wood-rot fungi. **International Biodeterioration and Biodegradation**, sl, v. 117, p. 158–170, 2017.
- DAVID, B.; WOLFENDER, J.-L.; DIAS, D. A. The pharmaceutical industry and natural products: historical status and new trends. **Phytochemistry Reviews**, sl, v. 14, n. 2, p. 299–315, 2015.
- DE BATISTA, A. N. L. et al. Aromatic compounds from three Brazilian Lauraceae species. **Quim. Nova**, sl, v. 33, n. 2, p. 321–323, 2010.
- DE VOS, R. C. H. et al. Untargeted large-scale plant metabolomics using liquid chromatography coupled to mass spectrometry. **Nature Protocols**, sl, v. 2, n. 4, p. 778–791, 2007.
- DESTRYANA, R. A. et al. Antioxidant and anti-inflammation activities of *Ocotea*, *Copaiba* and *Blue cypress* essential oils *in vitro* and *in vivo*. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, sl, v. 91, p. 1531–1542, 2014.
- DUTRA, R. C. et al. Antiulcerogenic and anti-inflammatory activities of the essential oil from *Pterodon emarginatus* seeds. **The Journal of pharmacy and pharmacology**, sl, v. 61, n. 2, p. 243–250, 2008.
- ERNST, M. et al. Mass spectrometry in plant metabolomics strategies: from analytical platforms to data acquisition and processing. **Natural Product Reports**, sl, v. 31, n. 6, p. 784, 2014.
- ESTEVES, I. et al. Gastric antiulcer and anti-inflammatory activities of the essential oil from *Casearia sylvestris* Sw. **Journal of Ethnopharmacology**, sl, v. 101, n. 1–3, p. 191–196, 2005.
- FACHINI-QUEIROZ, F. C. et al. Effects of thymol and carvacrol, constituents of *Thymus vulgaris* L. essential oil, on the inflammatory response. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, sl, v. 2012, 2012.
- FIEHN, O. Metabolomics - The link between genotypes and phenotypes. **Plant Molecular Biology**, sl, v. 48, n. 1–2, p. 155–171, 2002.

- GARRETT, R. et al. Antiherpetic activity of a flavonoid fraction from *Ocotea notata* leaves. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, sl, v. 22, n. 2, p. 306–313, 2012.
- GOLBRAIKH, A.; TROPSHA, A. Beware of q2! **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, sl, v. 20, n. 4, p. 269–276, 2002a.
- GOLBRAIKH, A.; TROPSHA, A. Beware of q2! **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, sl, v. 20, p. 269–276, 2002b.
- GONTIJO, D. C.; BRANDÃO, G. C.; GONTIJO, P. C. Identification of phenolic compounds and biologically related activities from *Ocotea odorifera* aqueous extract leaves, **Food Chemistry**, sl, v. 230, p. 618-626, 2017.
- GORROCHATEGUI, E. et al. Data analysis strategies for targeted and untargeted LC-MS metabolomic studies: Overview and workflow. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, sl, v. 82, p. 425–442, 2016.
- GROMSKI, P. S. et al. A tutorial review: Metabolomics and partial least squares-discriminant analysis - a marriage of convenience or a shotgun wedding. **Analytica Chimica Acta**, sl, v. 879, p. 10–23, 2015.
- HAWKINS, D. M. The problem of overfitting. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences**, sl, v. 44, n. 1, p. 1–12, 2004.
- HUR, M. et al. A global approach to analysis and interpretation of metabolomic data for plant natural product discovery. **Natural Product Reports**, vsl, . 30, p. 565, 2013.
- KATAJAMAA, M.; OREŠIČ, M. Data processing for mass spectrometry-based metabolomics. **Journal of Chromatography A**, sl, v. 1158, n. 1–2, p. 318–328, 2007.
- KAUR, G; SILAKARI, O. Multiple target-centric strategy to tame inflammation. **Future Medicinal Chemistry**, sl, v. 9, n. 12, p. 1361–1376, 2017.
- KELLOGG, J. J. et al. Comparison of metabolomics approaches for evaluating the variability of complex botanical preparations: green tea (*Camellia sinensis*) as a case study. **Natural Product Reports**, sl, v. 80, p. 1457-1466, 2016.
- KURITA, K. L.; GLASSEY, E.; LININGTON, R. G. Integration of high-content screening and untargeted metabolomics for comprehensive functional annotation of natural product libraries. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, sl, v. 112, n. 39, p. 11999–12004, 2015.
- LIU, Y. et al. Antiproliferative compounds from *Ocotea macrocarpa* from the. **Tetrahedron Letters**, sl, v. 56, p. 3630–3632, 2015.
- LUDY CRISTINA, P.; LUIS ENRIQUE, C. Aporphine alkaloids from *Ocotea macrophylla* (Lauraceae). **Quim. Nova**, sl, v. 33, n. 4, p. 875–879, 2010.

- MADSEN, R.; LUNDSTEDT, T.; TRYGG, J. Chemometrics in metabolomics — A review in human disease diagnosis. **Analytica Chimica Acta**, sl, v. 659, p. 23–33, 2010.
- MAHADEVAN, S. et al. Analysis of metabolomic data using support vector machines. **Analytical Chemistry**, sl, v. 80, n. 19, p. 7562–7570, 2008.
- MARTINS, E. M. et al. Development and characterization of microsatellite loci for *Ocotea* species (Lauraceae) threatened with extinction. **Genetics and Molecular Research**, sl, v. 13, n. 3, p. 5138–5142, 2014.
- MEDZHITOV, R. Inflammation 2010: New adventures of an old flame. **Cell**, sl, v. 140, n. 6, p. 771–776, 2010.
- MEIRER, K.; STEINHILBER, D.; PROSCHAK, E. Inhibitors of the arachidonic acid cascade: Interfering with multiple pathways. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, sl, v. 114, n. 1, p. 83–91, 2014.
- MENG, H.; LIU, Y.; LAI, L. Diverse ways of perturbing the human arachidonic acid metabolic network to control inflammation. **Accounts of Chemical Research**, sl, v. 48, n. 8, p. 2242–2250, 2015.
- MINUTOLI, L. et al. A dual inhibitor of cyclooxygenase and 5-lipoxygenase protects against kainic acid-induced brain injury. **Neuro Molecular Medicine**, sl, v. 17, n. 2, p. 192–201, 2015.
- MOSSI, A. J. et al. Essential oil of *Ocotea odorifera*: An alternative against *Sitophilus zeamais*. **Renewable Agriculture and Food Systems**, sl, v. 29, n. 2, 2013.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, sl, v. 79, n. 3, p. 629–661, 2016.
- NEWTON, R. Anti-inflammatory glucocorticoids: Changing concepts. **European Journal of Pharmacology**, sl, v. 724, n. 1, p. 231–236, 2014.
- NIELSEN, K. F. et al. Dereplication of microbial natural products by LC-DAD-TOFMS. **Journal of Natural Products**, sl, v. 74, n. 11, p. 2338–2348, 2011.
- OLTRAMARI, A. C. et al. Safrole analysis by GC-MS of prototrophic (*Ocotea odorifera* Vell. Rohwer) cell cultures. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, sl, v.78, p. 231–235, 2004.
- PARENTE, L. Pros and cons of selective inhibition of cyclooxygenase-2 versus dual lipoxygenase/cyclooxygenase inhibition: Is two better than One? **Journal of Rheumatology**, sl, v. 28, n. 11, p. 2375–2382, 2001.
- RAKOTONDRAIBE, L. H. et al. Neolignans and other metabolites from *Ocotea cymosa* from the Madagascar rain forest and their biological activities. **Journal of Natural Products**, 2014.

RAMALHO, P. E. Canela-Sassafrás. **Embrapa Florestas**, 2005.

RESSLER-EHRNHOFER, M. M. et al. Identification of 1,8-Cineole, borneol, camphor, and thujone as anti-inflammatory compounds in a *Salvia ficinalis* L. infusion using human gingival fibroblasts. **Journal of agricultural and food chemistry**, sl, v. 61, p. 3451-3459, 2013.

RHEN, T.; CIDLOWSKI, J. A. Antiinflammatory Action of Glucocorticoids — New Mechanisms for Old Drugs. **New England Journal of Medicine**, sl, v. 353, n. 16, p. 1711–1723, 2005.

SAIDI, N. et al. Benzylisoquinoline alkaloids from bark of *Cryptocarya rugulosa*. **Indonesian Journal of Chemistry**, sl, v. 11, n. 1, p. 59–66, 2011.

SALLEH, W. M. N. H. W.; AHMAD, F. Phytochemistry and biological activities of the genus *Ocotea* (Lauraceae): A review on recent research results (2000-2016). **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, sl, v. 7, n. 5, p. 204–218, 2017.

SARAIVA, R. A. et al. Topical anti-inflammatory effect of *Caryocar coriaceum* Wittm. (Caryocaraceae) fruit pulp fixed oil on mice ear edema induced by different irritant agents. **Journal of Ethnopharmacology**, sl, v. 136, n. 3, p. 504–510, 2011.

SLAVICH, G. M. Understanding inflammation, its regulation, and relevance for health: A top scientific and public priority. **Brain, Behavior, and Immunity**, sl, v. 45, p. 13–14, 2015.

SOSA, S. et al. Screening of the topical anti-inflammatory activity of some Central American plants. **Journal of Ethnopharmacology**, sl, v. 81, n. 2, p. 211–215, 2002.

SOUSA, F. C. F. et al. Central Nervous System Activity of Yangambin from *Ocotea duckei* Vattimo (Lauraceae) in Mice. **Phytotherapy Research**, v. 19, p. 282–286, 2005.  
SOUZA, M. C. et al. Evaluation of anti-inflammatory activity of essential oils from two Asteraceae species. **Pharmazie**, sl, v. 58, p. 1–5, 2003.

SUMNER, Lloyd W et al. Modern plant metabolomics: advanced natural and prospects. **Natural Product Reports**, sl, v. 32, p. 212-229, 2014.

SUMNER, L. W.; MENDES, P.; DIXON, R. A. Plant metabolomics: Large-scale phytochemistry in the functional genomics era. **Phytochemistry**, sl, v. 62, p. 817–836, 2003.

TAWFIK, N. F. et al. Metabolomics and Dereplication Study of the Endophytic Fungus *Aspergillus chevalieri* in Search of Bioactive Natural Compounds. **Journal of Advanced Pharmacy Research**, sl, v. 547, p. 100–109, 2017.

TRIBESS, B. et al. Ethnobotanical study of plants used for therapeutic purposes in the Atlantic Forest region, Southern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, sl, v. 164, p. 136–146, 2015.

TRYGG, J.; HOLMES, E. Chemometrics in Metabolomics. **Journal of Proteome**

**Research**, sl, v. 6, p. 469–479, 2007.

TUBARO, A.; DRI, P.; MELATO, M.; et al. In the croton oil ear test the effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are dependent on the dose of the irritant. **Agents and Actions**, sl, v. 19, n. 5–6, p. 371–373, 1986a.

TUBARO, A.; DRI, P.; DELBELLO, G.; et al. The croton oil ear test revisited. **Agents and Actions**, sl, v. 17, n. 3–4, p. 347–349, 1986b.

WOLFENDER, J. L. et al. Current approaches and challenges for the metabolite profiling of complex natural extracts. **Journal of Chromatography A**, sl, v. 1382, p. 136–164, 2015.

YAMAGUCHI, U. M. et al. Antifungal effects of ellagitannin isolated from leaves of *Ocotea odorifera* (Lauraceae). **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, sl, v. 99, p. 507–514, 2011.

YANG, X. et al. Anti-inflammatory effects of boldine and reticuline isolated from *Litsea cubeba* through JAK2/STAT3 and NF- $\kappa$ B signalling pathways. **Planta Medica**, 2017.

YI, L. et al. Chemometric methods in data processing of mass spectrometry-based metabolomics: A review. **Analytica Chimica Acta**, sl, v. 914, p. 17–34, 2016.

YULIANA, N. D. et al. Metabolomics for bioactivity assessment of natural products. **Phytotherapy Research**, sl, v. 25, n. 2, p. 157–169, 2011.

ZANINI, J. C. et al. Action of compounds from *Mandevilla velutina* on croton oil-induced ear edema in mice - a comparative-study with steroidal and nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Phytotherapy Research**, sl, v. 6, n. 1, p. 1–5, 1992.

ZHONG, L. et al. Evaluation of the anti-inflammatory effects of volatile oils from processed products of *Angelica sinensis radix* by GC–MS-based metabolomics. **Journal of Ethnopharmacology**, sl, 2016.

## APÊNDICE

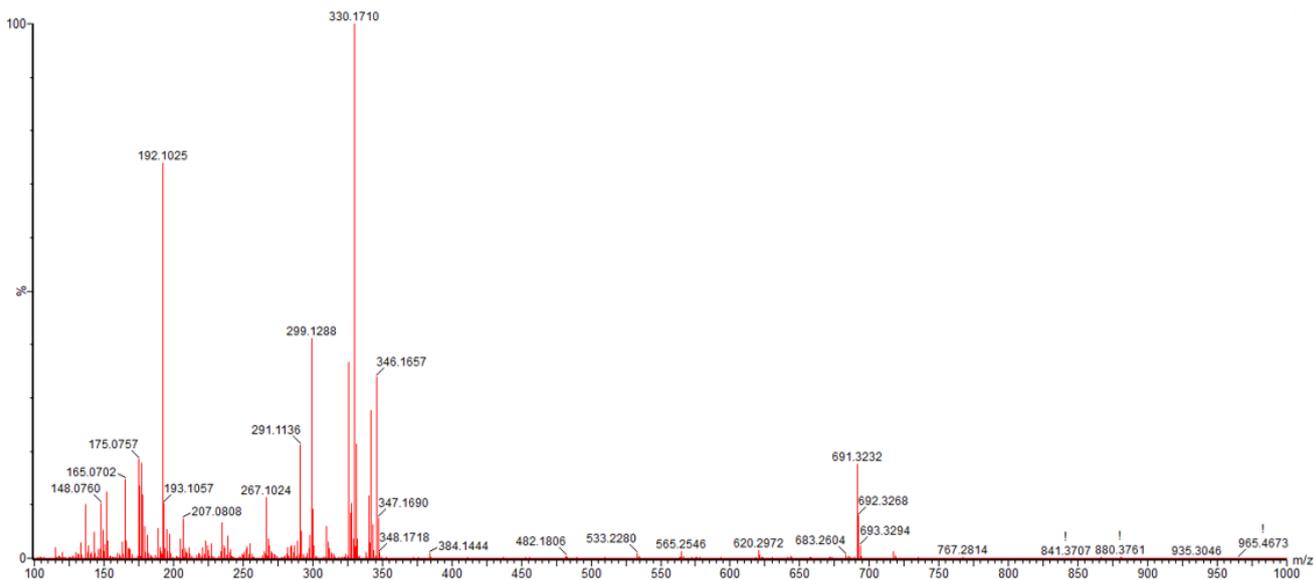


Figura 24 - Espectro de massas da reticulina.

Fonte: Do autor.

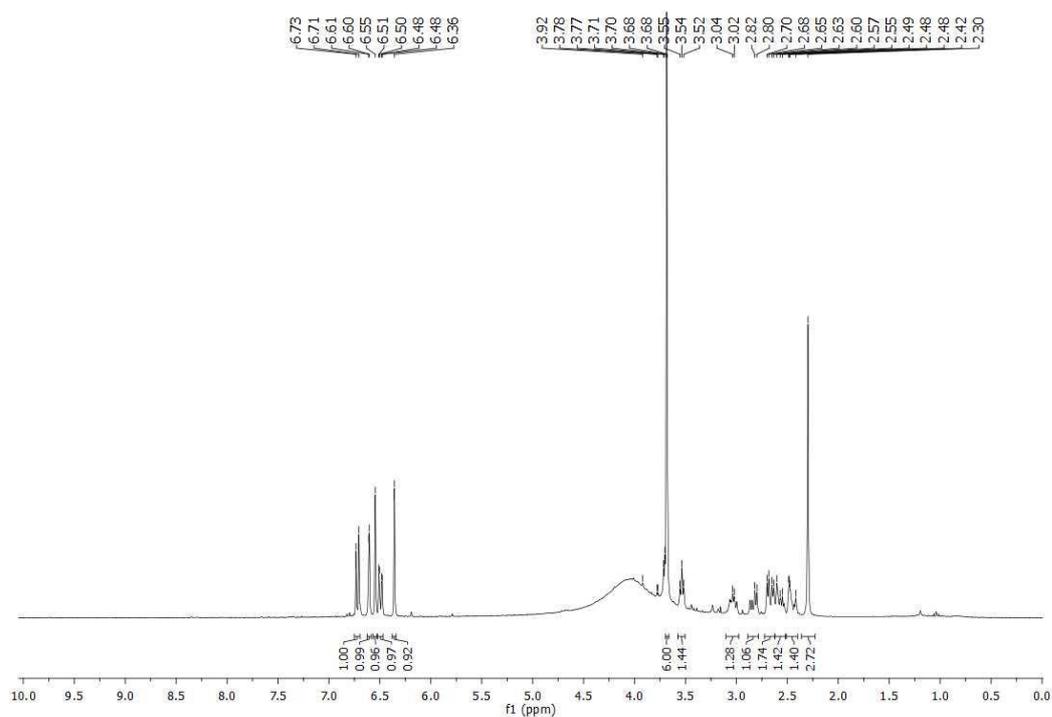


Figura 25 - Espectro de RMN de <sup>1</sup>H da reticulina, 300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>.

Fonte: Do autor.

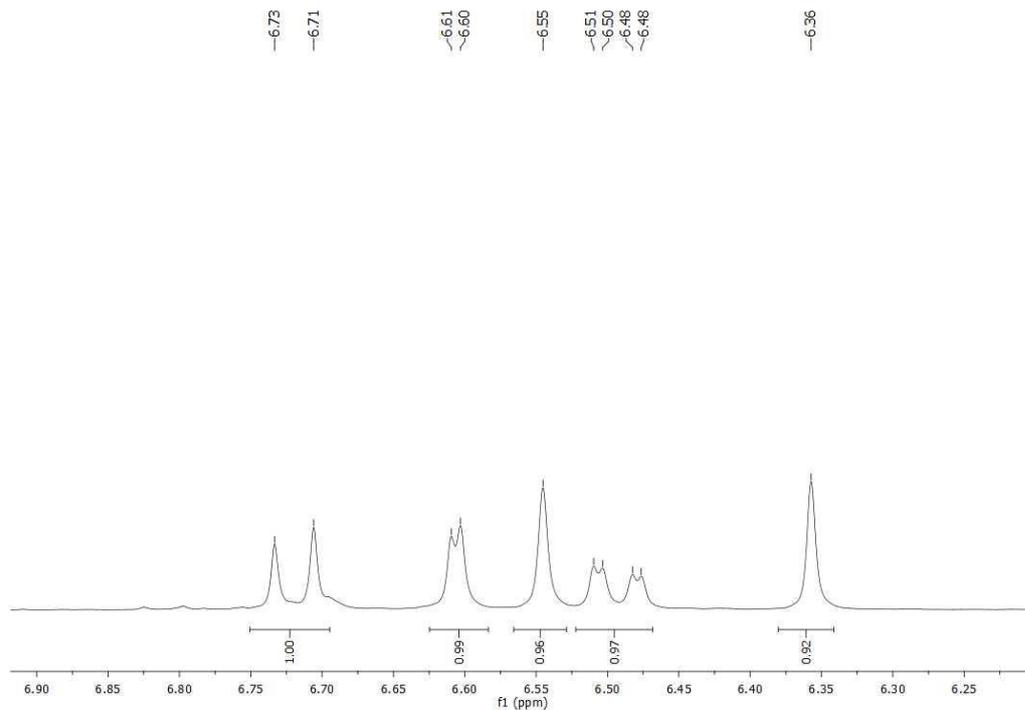


Figura 26 – Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da reticulina, 300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ .

Fonte: Do autor.

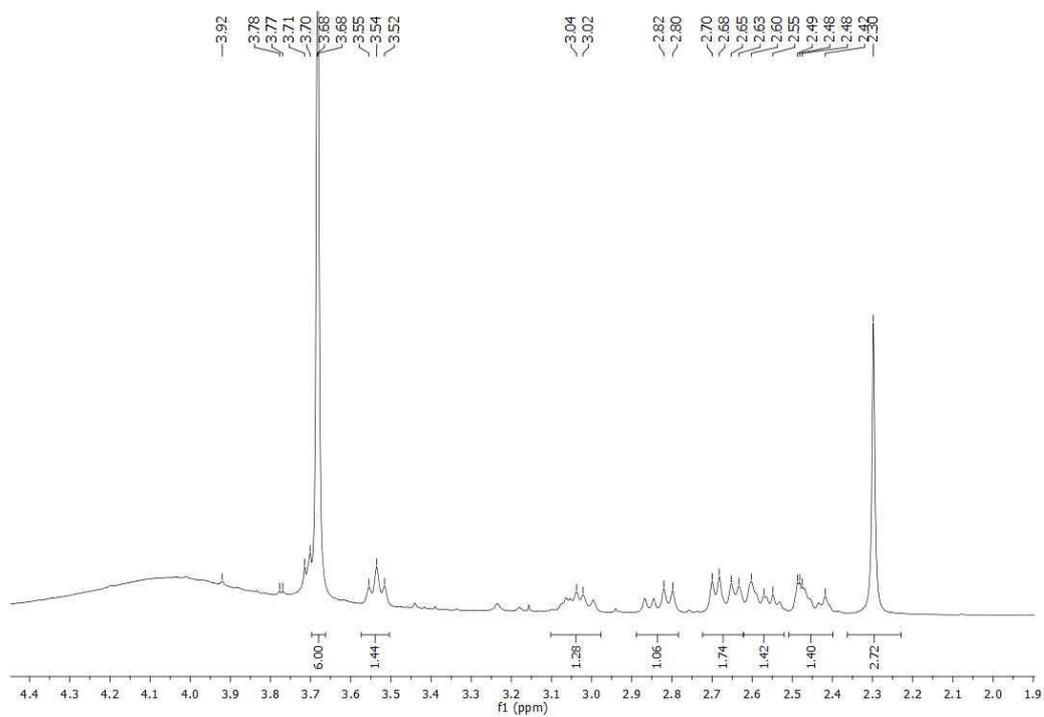


Figura 27 – Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da reticulina, 300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ .

Fonte: Do autor.

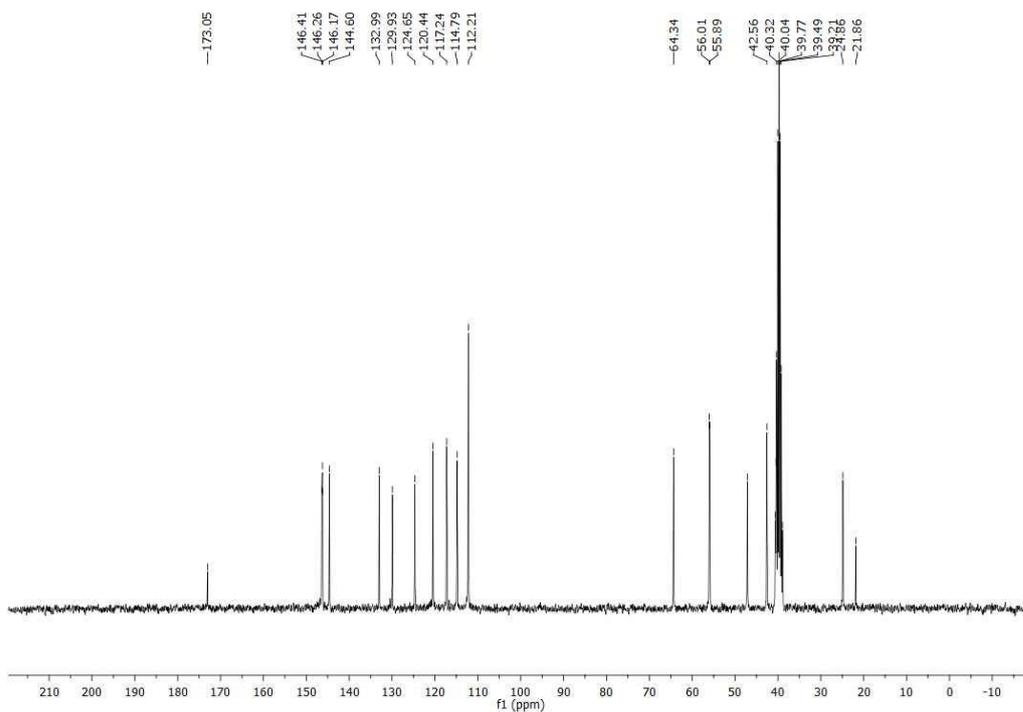


Figura 28 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da reticulina, 75 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ .

Fonte: Do autor.

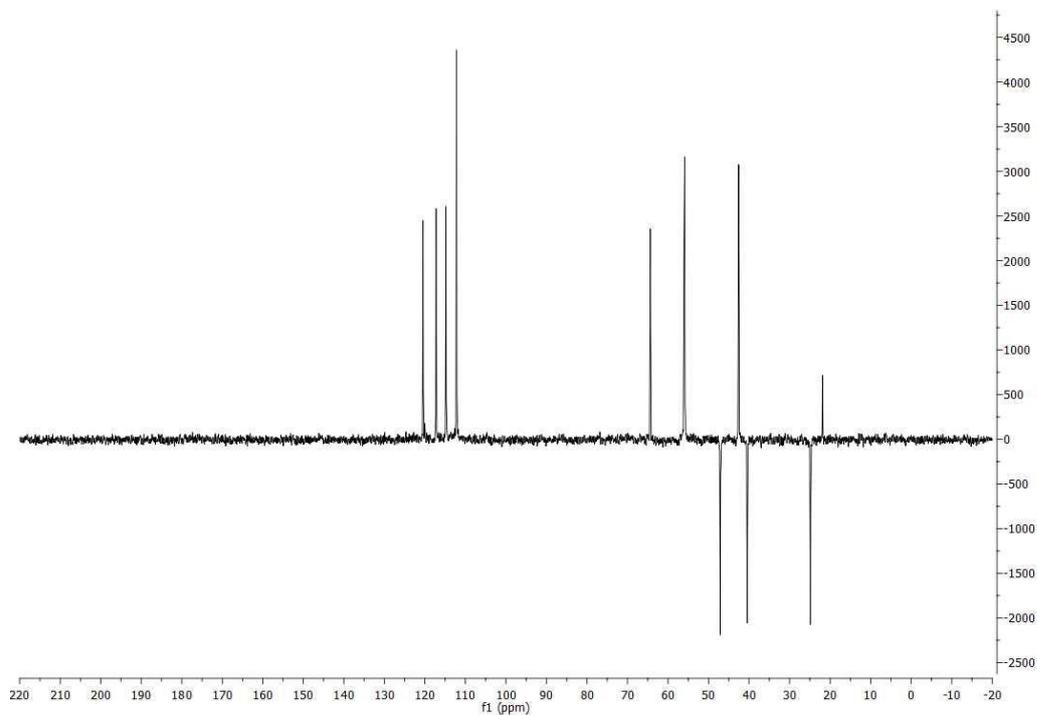


Figura 29 – DEPT 135 da reticulina,  $\text{DMSO-}d_6$ .

Fonte: Do autor.