



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas. Unifal-MG
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 714 – Alfenas/MG – CEP 37130-000
Fone: (35) 3299-1000. Fax: (35) 3299-1063



Aline de Fátima Silva

**Estudo metabolômico e anti-inflamatório de
Ocotea diospyrifolia (Meisn.) Mez para
identificação de suas substâncias ativas e
inéditas**

Alfenas/MG
2019

Aline de Fátima Silva

**Estudo metabolômico e anti-inflamatório de *Ocotea diospyrifolia* (Meisn.) Mez
para identificação de suas substâncias ativas e inéditas**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em química pelo Departamento de Química da Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Química Orgânica. Orientadora: Dra. Daniela Aparecida Chagas de Paula

Alfenas/MG
2019

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas

S586e Silva, Aline de Fátima.
Estudo metabólico e anti-inflamatório de *Ocotea diospyrifolia* (Meisn.) Mez para identificação de suas substâncias ativas e inéditas / Aline de Fátima Silva – Alfenas/MG, 2019.
108 f.: il. --
Orientadora: Daniela Aparecida Chagas de Paula.
Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Alfenas, 2019.
Bibliografia.

1. Lauraceae. 2. Cromatografia Gasosa – Espectometria de Massas. 3. Cromatografia Líquida. 4. Edema. I. Paula, Daniela Aparecida Chagas de. II. Título.

CDD-547

Aline de Fátima Silva

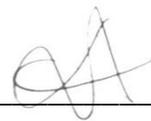
“Estudo metabolômico e anti-inflamatório da *Ocotea diospyrifolia* (Meins.) Mez para identificação de suas substâncias ativas e inéditas”

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.

Aprovado em: 31/01/2019.

Profa. Dra. Daniela Aparecida Chagas de Paula

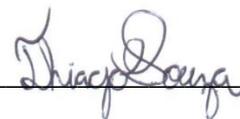
Assinatura: _____



Instituição: Universidade Federal de Alfenas –
UNIFAL-MG

Prof. Dr. Thiago Corrêa de Souza

Assinatura: _____



Instituição: Universidade Federal de Alfenas-
UNIFAL-MG

Profa. Dra. Eliane de Oliveira Silva

Assinatura: _____



Profa. Dra. Eliane de Oliveira Silva
Instituto de Química
Dep. Química Orgânica

Instituição: Universidade Federal da Bahia -
UFBA

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, exemplo profissional, Dra. Daniela Aparecida Chagas de Paula, por toda paciência, ensinamentos, pelo incentivo, por todo tempo dedicado à minha formação e por ter me corrigido quando necessário. Às professoras: Dra. Marisi e Dra. Danielle por toda contribuição para minha formação pessoal e acadêmica.

Aos meus amigos e colegas de laboratório. Em especial ao Mário por todos os ensinamentos e amizade. À minha amiga Tatiane, pela ajuda na realização dos bioensaios. Aos meus amigos Cristiane, Olivia, Andreza, Bianca, Laís, Welton, Albert, Miller, Dani e aos demais, pelos momentos de aprendizado, pelos conselhos e bate-papo.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-graduação em química da UNIFAL, em especial à Marcela, por sempre estar disposta a ajudar.

À CAPES e demais órgãos de fomento pelo auxílio financeiro.

Às minhas amigas e companheiras de república por toda amizade e suporte emocional, Michele, Tainah e Ana.

À minha mãe, meus irmãos (Alando, Gabriel, Neia e Layne) e meu namorado por todo amor, carinho, dedicação, por me apoiar em todas as minhas decisões, todo suporte emocional e por me incentivar sempre.

À Deus, principalmente, por ter me dado força para superar as dificuldades.

RESUMO

A Mata Atlântica possui uma grande diversidade na sua fauna e flora, porém vem sofrendo com o desmatamento, havendo o risco de extinção de espécies que ocorrem exclusivamente nessa região. Visto que muitas plantas da Mata Atlântica ainda não foram estudadas, é fundamental a análise da flora residual deste bioma, a fim de identificar substâncias ativas e inéditas. Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo estudar o potencial farmacológico da espécie *Ocotea diospyrifolia* (Meisn.) Mez, nativa da Mata Atlântica, com a finalidade de identificar substâncias ativas e inéditas. O material vegetal foi coletado em fragmentos de Mata Atlântica, presentes no município de Alfenas-MG e os extratos foram obtidos. Foi realizada a avaliação da atividade anti-inflamatória utilizando o teste de edema de orelha, além da quantificação de mieloperoxidase. Além disso, utilizou a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas para verificar a composição das substâncias voláteis. Os extratos das folhas, fração acetato das folhas e óleos essenciais das folhas e tronco apresentaram atividade anti-inflamatória, enquanto os demais foram inativos. A partir desses resultados farmacológicos e dos metabolômicos, realizou-se o estudo estatístico e foi possível, através da desreplicação, verificar as 39 substâncias que estão significativamente correlacionadas com a atividade anti-inflamatória investigada, ou seja, os biomarcadores. Foram isoladas dez substâncias: Mururina A, ácido 5-cafeiolquínico, ácido neoclorogênico, quercitrina, salsolina, reticulina, coclaurina, isoboldina e uma nova substância **9**.

Palavras chaves: Lauraceae, Cromatografia Gasosa - Espectrometria de Massas, Cromatografia Líquida, Edema, Recrutamento de neutrófilos, Isolamento.

ABSTRACT

The Atlantic Forest has a great diversity in its fauna and flora, but has been suffering from deforestation, with the risk of extinction of species that occur exclusively in this region. Since many Atlantic Forest plants have not yet been studied, it is essential to analyze the residual flora of this biome to identify active and unpublished substances. In view of the above, this work aims to study the pharmacological potential of *Ocotea diospyrifolia* (Meisn.) Mez, native to the Atlantic Forest, in order to identify active and unpublished substances. The plant material was collected in fragments of Atlantic Forest from the city of Alfenas-MG and the extracts were obtained. The evaluation of the anti-inflammatory activity was performed using the ear edema test, besides the quantification of myeloperoxidase. The extracts of the leaves, the acetate fraction from leaves, and essential oils from leaves and bark presented anti-inflammatory activity, while the other types of extract were inactive. From these pharmacological and metabolomic results, the statistical study was carried out and it was possible, through the deregulation, to verify the 39 substances that are significantly correlated with the anti-inflammatory activity investigated, that is, the biomarkers. Ten substances were isolated: mururin A, 5-caffeine ester, neochlorogenic acid methyl ester, quercitrin, salsoline, reticuline, coclaurine, isoboldine, and the compound 9.

Keywords: Lauraceae, Gas Chromatography- Mass Spectrometry, Chromatography liquid, LC-HRMS, oedema, neutrophil recruitment, isolation

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Substâncias isolados a partir de espécies do gênero <i>Ocotea</i>	19
Figura 2 - Substâncias voláteis presentes nos óleos essenciais de espécies do gênero <i>Ocotea</i>	20
Figura 3 - Frutos da <i>Ocotea diospyrifolia</i>	20
Figura 4 - Esquema processo inflamatório pela cascata do ácido araquidônico.	22
Figura 5 - Estrutura molecular de alguns AINEs..	24
Figura 6 - Estrutura molecular da dexametasona.	25
Figura 7 - Estrutura química das fases estacionárias dos grupos ligados quimicamente a sílica.	29
Figura 8 - Fluxograma da obtenção das frações a partir do extrato bruto da folha e casca..	34
Figura 9 - Fluxograma obtenção das substâncias 1 a 4	39
Figura 10 - Fluxograma obtenção das substâncias 6 a 10	41
Figura 11 - Ensaio edema de orelha para: a) <i>E.</i> do caule e da folha, b) para as frações: alcaloídica, hidroalcoólica, acetato e hexânica para as folhas.	44
Figura 12 - Oxidação da 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina a 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina-diimina.	45
Figura 13 - Resultados da quantificação de MPO no sítio da inflamação. a) <i>E.</i> do caule e da folha, b) frações: alcaloídica, hidroalcoólica, acetato de etila e hexânica.....	46
Figura 14 - Score plot das análises de PCA-X	48
Figura 15 - Análise PLS-DA para a distribuição dos extratos e das frações da <i>Ocotea diospyrifolia</i> de acordo com a atividade anti-inflamatória.....	51
Figura 17 - Visão geral dos coeficientes de correlação das substâncias dos extratos e frações da <i>Ocotea diospyrifolia</i> com a atividade anti-inflamatória	52
Figura 18 - Estrutura da apigenina-7-O- β -D-(-6''-p-coumaroil-glucapiranosídeo), exemplo de substância com formula molecular $C_{39}H_{32}O_{14}$	52
Figura 19 - a) Kaempferol 3- (3'', 4'' - di-p-cimilarnósido) e b) Kaempferol 3- (2'', 4'' - di- (E) -p-cumaliltranósido).....	55
Figura 20 - Substância 1 - Mururina A.....	58

Figura 21 - Substância 2 - Ácido 5-O-E-cafeoilquínico.....	60
Figura 22 - Fragmento m/z 191,7	63
Figura 23 - Substância 3 : Ester metílico do ácido neoclorogênico.	63
Figura 24 - Padrão de fragmentação da substância 3	64
Figura 25 - Substância 4 - Quercitrina.....	66
Figura 26 - Correlações obtidas por HMBC e COSY	67
Figura 27 - Substância 5 - Salsolina	69
Figura 28 - Substância 6 - Reticuline.	70
Figura 29 - Substância 7 : Coclorina	73
Figura 30 - Sustância 8 : Isoboldina	75
Figura 31 - Substância 9	77
Figura 32 - Correlações obtidas pelo mapa de contornos HMBC.....	78
Figura 33 - As substâncias isoladas que foram detectadas nos cromatogramas obtidos por HPLC-ESI-TOF.....	81
Figura 34 - Principais substâncias constituintes dos óleos essenciais da folha e casca da <i>O. diospyrifolia</i>	82
Figura 35 - Ensaio edema de orelha para OEF e OEC e seus respectivos controles: veículo (controle negativo) e Acheflan (controle positivo)..	83
Figura 36 - Ensaio MPO para OEF e OEC.....	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultados de predição dos modelos de PLS-DA treinado com dados de UPLC-ESI- TOF, modo positivo e modo negativo.....	50
Tabela 2 - Desreplicação para o modo positivo, os hits foram pesquisados nos bancos de dados: Banco de dados in house de Ocotea/ KNApSAcK DB/DNP.....	53
Tabela 3 - Desreplicação para o modo negativo, os hits foram pesquisados nos bancos de dados: Banco de dados in house de Ocotea/ KNApSAcK DB/DNP.....	54
Tabela 4 - Frações obtidas a partir da fração acetato de etila das folhas, suas respectivas massas e rendimentos.....	55
Tabela 5 - Frações obtidas a partir da FAF-9, suas respectivas massas e rendimentos..	56
Tabela 6 - Frações obtidas a partir da FALC, suas respectivas massas e rendimentos..	57
Tabela 7 - Deslocamentos químicos (δ), multiplicidade dos sinais e a constante de acoplamento (J) em Hz, obtidos a partir de espectros de RMN de ^1H e RMN de ^{13}C experimental (300 MHz ^1H , 75 MHz ^{13}C , DMSO d-6) da Mururina A.....	60
Tabela 8 - Deslocamentos químicos (δ), multiplicidade dos sinais e a constante de acoplamento (J) obtidos a partir de espectros de RMN de ^1H e RMN de ^{13}C experimental (300 MHz ^1H , 75 MHz ^{13}C , DMSO d-6) e encontrado na literatura (300 MHz ^1H , 75 MHz ^{13}C , D ₂ O) do Ácido 5-O-cafeoilquínico.	62
Tabela 9 - Deslocamentos químicos (δ), multiplicidade dos sinais e a constante de acoplamento (J) obtidos a partir de espectros de RMN de ^1H e RMN de ^{13}C experimental (300 MHz ^1H , 75 MHz ^{13}C , DMSO d-6) e encontrado na literatura (300 MHz ^1H , 75 MHz ^{13}C , D ₂ O) do Ester metílico do ácido neoclorogênico.	65
Tabela 10 - Deslocamentos químicos (δ), multiplicidade dos sinais e a constante de acoplamento (J) obtidos a partir de espectros de RMN de ^1H e RMN de ^{13}C experimental (^1H 300 MHz, ^{13}C 75 MHz DMSO d-6) e RMN de e encontrado na literatura (^1H 500 MHz, ^{13}C 125 MHz, CD ₃ OD) da quercitrina.	68
Tabela 11 - Deslocamentos químicos (δ), multiplicidade dos sinais e a constante de acoplamento (J) obtidos a partir de espectros de RMN de ^1H e RMN de ^{13}C experimental (^1H 300 MHz, ^{13}C 75 MHz DMSO d-6) e RMN de e encontrado na literatura (^1H 300 MHz, ^{13}C 75 MHz, CDCl ₃) da salsolina.	70
Tabela 12 - Deslocamentos químicos (δ), multiplicidade dos sinais e a constante de acoplamento (J) obtidos a partir de espectros de RMN de ^1H experimental (^1H 300 MHz, DMSO d-6) e RMN de e encontrado na literatura (^1H 400 MHz, CDCl ₃) da reticulina.....	72
Tabela 13 - Deslocamentos químicos (δ), multiplicidade dos sinais e a constante de acoplamento (J) obtidos a partir de espectros de RMN de ^1H experimental (^1H 300 MHz DMSO d-6) e RMN de e encontrado na literatura (^1H 200 MHz, CCl ₃ OD) da coclaurina.	74
Tabela 14 - Deslocamentos químicos (δ), multiplicidade dos sinais e a constante de acoplamento (J) obtidos a partir de espectros de RMN de ^1H e RMN de	

	¹³ C experimental (¹ H 300 MHz, ¹³ C 75 MHz DMSO d-6) e RMN de e encontrado na literatura (¹ H 300 MHz, ¹³ C 75 MHz, C) da isoboldina.....	76
Tabela 15 -	Deslocamentos químicos (δ), multiplicidade dos sinais e a constante de acoplamento (J) obtidos a partir de espectros de RMN de ¹ H e RMN de ¹³ C experimental (¹ H 300 MHz, ¹³ C 75 MHz DMSO d-6) da substância 9	79
Tabela 16 -	Desreplicação das substâncias dos óleos essenciais da casca e da folha da <i>O. diospyrifolia</i> , o índice de Kovatz teórico (IK), índice de similaridade (IS) e a abundância relativa em %.	85

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

COX	- Ciclo-oxigenase
LOX	- Lipoxigenase
PG	- Prostaglandinas
TB	- Tromboxanos
LT	- Leucotrienos
LX	- Lipoxinas
LTA4	- Leucotrieno A4
LTB4	- Leucotrieno B4
MPO	- Mieloperoxidase
AIEs	- Anti-inflamatorios esteroidais
AINEs	- Anti-inflamatorios não esteroidais
NFkB	- Fator nuclear kappa B
EM	- Espectrometria de massas
RMN	- Ressonância Magnética Nuclear
IV	- Espectroscopia de Infravermelho
CLAE	- Cromatografia líquida de alta eficiência
CG	- Cromatografia gasosa
EI	- Impacto de elétrons
IC	- Ionizao química
MALDI	- Ionizao/dessoro por laser assistido por uma matriz
ESI	- Ionizao por eletrospray
AMNS	- Análises multivariadas não supervisionadas
AMS	- Análises multivariadas supervisionadas
PCA	- Análise dos componentes principais
PLS	- Análise dos quadrados mínimos parciais
OPLS	- Análise ortogonal dos quadrados mínimos parciais
TMB	- Tetrametilbenzidina
UPLC	- Cromatografia líquida de ultra eficiência
TOF	- Analisador EM por tempo de voo
MeCN	- Acetonitrila
CEUA	- Comissão de tica no Uso de Animais
TPA	- Tetradecanoil forbol

- VIP - Variáveis importantes para a predição
- EBC - Extrato bruto da casca
- EBF - Extrato bruto da folha
- FAF - Fração acetato de etila da folha
- FAC - Fração acetato de etila da casca
- FALF - Fração alcaloídica da folha
- FALC - Fração alcaloídica da casca
- FHF - Fração hidroalcoólica da folha
- FHC - Fração hidroalcoólica da casca
- RTFHF - Replicata técnica fração hidroalcoólica da folha
- δ - Deslocamento químico
- J - Constante de acoplamento
- COSY - Correlação espectroscópicas “Correlation spectroscopy”
- HSQC - Correlação heteronuclear simples quantum
- HMBC - Correlação heteronuclear múltiplo quantum

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1	MATA ATLÂNTICA.....	17
2.2	FAMÍLIA LAURACEAE E O GÊNERO <i>OCOTEA</i>	17
2.3	<i>OCOTEA DIOSPYRIFOLIA</i> (MEISN.) MEZ	20
2.4	ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA.....	21
2.5	METABOLÔMICA	25
2.6	FITOQUÍMICA.....	28
3	OBJETIVOS	31
3.1	OBJETIVO GERAL.....	31
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
4	MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1	OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL - <i>OCOTEA DIOSPYRIFOLIA</i> (MEISN.) MEZ	32
4.2	OBTENÇÃO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES	32
4.3	ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA.....	34
4.3.1	Animais	34
4.3.2	Edema de orelha	35
4.3.3	Ensaios de MPO para avaliar recrutamento de neutrófilos	36
4.4	ESTUDO METABOLÔMICO.....	36
4.4.1	Preparo das amostras	36
4.4.2	Método e equipamento	36
4.4.3	Tratamento dos dados, desreplicação e análises estatísticas multivariadas dos dados	37
4.5	FITOQUÍMICA.....	38
4.5.1	Fração acetato de etila das folhas (FAF)	38
4.5.2	Fração alcaloídica do caule (FALC)	40
4.6	DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL	42
4.7	EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS E DA CASCA DA <i>O. DIOSPYRIFOLIA</i>	42
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1	MATERIAL VEGETAL, EXTRATOS E FRAÇÕES.....	43
5.2	ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA	43
5.2.1	Edema de Orelha	43

5.2.2 Ensaio de MPO	45
5.3 METABOLÔMICA	47
5.4 FITOQUÍMICA.....	55
5.4.1 Fração acetato de etila das folhas	55
5.4.2 Fração alcaloídica do caule (FALC)	56
5.5 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL	58
5.6 DESREPLICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS NO EXTRATO BRUTO	79
6.7 ÓLEOS ESSENCIAIS.....	81
6.8 ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA PARA OS ÓLEOS ESSENCIAIS	82
7 CONCLUSÃO	87
REFERÊNCIAS	88
ANEXO	97

1 INTRODUÇÃO

A Mata Atlântica abriga diversas espécies de plantas e animais, sendo fonte de matéria prima que abastece a população desde a época da colonização, tendo sido desmatada para a implementação de cidades, criação de pastos, plantações de cana-de-açúcar, dentre outros fatores. A Mata Atlântica foi e continua sendo desmatada, restando apenas fragmentos da cobertura vegetal que outrora existia. Diversas espécies sofrem risco de extinção, dentre essas a *Ocotea odorifera* (Vellozo) Rohwer e outras espécies, pertencentes a família Lauraceae, uma família que apresenta grande valor comercial (BARRETO, 2017 ; SALLEH, AHMAD, 2017).

A família Lauraceae é composta por inúmeros gêneros e espécies, possui diversas possibilidades de aplicação, como na indústria alimentícia, na construção civil e na medicina popular, para tratar diversas enfermidades. Muitos gêneros e espécies dessa família são alvos de estudos para a descoberta de novos fármacos (SALLEH, AHMAD, 2017).

Um levantamento na literatura demonstra que os produtos naturais ou derivados de substâncias isolados de produtos naturais representam 65% das moléculas aprovadas como fármacos nas últimas três décadas (FRANCHIN et al., 2018). Além disso, 2% dessas moléculas são utilizadas como anti-inflamatórios. O Brasil representa uma fonte de produtos naturais com grande potencial para a indústria farmacêutica (FRANCHIN et al., 2018).

No isolamento de substâncias inéditas e biomarcadores a partir desses produtos naturais, pode-se recorrer a técnicas que reduzam o tempo para a obtenção das moléculas alvos, como a metabolômica, que permite traçar um perfil dos metabólitos presentes no material em análise (KAMAL et al, 2017). A metabolômica faz uso de diversas técnicas analíticas, que geram muitos dados, sendo necessários softwares para o tratamento desses dados (LIGGI et al., 2018). Uma das ferramentas utilizadas em estudos metabolômicos é a desreplicação, que permite uma verificação dos analitos presentes em determinada amostra, podendo prever as possíveis fórmulas moleculares e, através dessas, verificar o quanto a fórmula prevista foi citada na literatura e em banco de dados de metabólitos (KAMAL et al, 2017).

Neste contexto, o objetivo do trabalho foi estudar a espécie *Ocotea diospyrifolia* (Meisn.) Mez, uma planta encontrada na Mata Atlântica, com a finalidade de verificar suas propriedades anti-inflamatórias, bem como realizar pela primeira vez o estudo fitoquímico desta espécie.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 MATA ATLÂNTICA

A Mata Atlântica possui uma biodiversidade imensurável, sendo composta de uma fauna e uma flora que abrigam milhares de espécies. Por esse motivo, foi utilizada como fonte de subsistência para os brasileiros nativos. O território da Mata Atlântica nativa foi sendo convertido em matrizes para o desenvolvimento da agricultura e centros urbanos. Estima-se que hoje existam cerca de 11,6 % da cobertura vegetal original da Mata Atlântica. Essa cobertura está dividida em áreas, em torno de 245.000 fragmentos, sendo que, cerca de 83,4% desses fragmentos possuem menos de 50 hectares (SCARANO; CEOTTO, 2015; SLOBODA et al., 2017).

Nestes fragmentos, encontram-se cerca de 2.300 espécies de vertebrados e 20.000 espécies de plantas vasculares, sendo que 740 espécies de vertebrados e 8.000 espécies de plantas vasculares são endêmicas, isto é, encontrados apenas neste bioma (PINTO et al., 2006). Uma vez que muitas dessas espécies são exclusivas dessa região, os riscos de extinção dessas plantas são maiores. Acredita-se que cerca de 1544 espécies estão ameaçadas de extinção (SCARANO; CEOTTO, 2015).

Dentre essas espécies que sofrem risco de extinção, pode-se citar *Ocotea catharinensis* Mez, *Ocotea odorifera* (Vellozo) Rohwer e *Ocotea porosa* (Nees & Mart.), todas pertencentes à família das Lauraceae, uma família arbórea muito explorada devido ao alto valor comercial de sua madeira e/ou dos seus óleos essenciais (MARTINS et al., 2015).

2.2 FAMÍLIA LAURACEAE E O GÊNERO *OCOTEA*

A família Lauraceae é encontrada nas Américas, Ásia tropical, Madagascar e Austrália. Há cerca de 50 gêneros e entre 2500 a 3000 espécies pertencentes a essa família. No Brasil, são encontrados cerca de 23 gêneros e 434 espécies (BROTTO; CERVI; DOS SANTOS; 2013; KAMIMURA et al., 2017).

É uma família que apresenta uma grande importância comercial. Algumas espécies como *Persea americana* Mill. (abacate), *Laurus nobilis* L (louro), *Cinnamomum zeylanicum* Breyne e *Cinnamomum cassia* (Nees) (canelas), *Ocotea organensis* (Meiss.) Mez, etc. são utilizadas na alimentação, carpintaria e indústria de cosméticos (MARQUES, 2001).

Um dos gêneros mais abundantes da família Lauraceae é a *Ocotea*. Este gênero possui diversas espécies com morfologia variável. Do sul da Florida até a Argentina estão distribuídas cerca de 300 espécies, sendo que no Brasil encontram-se 170 das espécies descritas (BROTTO; CERVI; DOS SANTOS, 2013).

Dentre as plantas da família Lauraceae encontradas na literatura com atividade medicinal, um grande número pertence ao gênero *Ocotea*. Como exemplo, pode-se citar *Ocotea puchury* Major. Suas folhas e cascas são utilizadas na medicina tradicional para tratar doenças gastrointestinais e antirreumáticas, além de, possuir propriedades sedativas. Outra espécie utilizada pela população é o *Ocotea quixos*, que é empregada com anestésico local (LEPORATTI et al., 2014; NORIEGA, 2016).

A partir do gênero *Ocotea* obteve-se diversas substâncias, dentre elas diversas classes como alcaloides, neolignanas, flavonoides, sesquiterpenos, esteroides, lignanas, ésteres, saponinas, e etc. Podendo isolar uma quantidade enorme de substâncias a partir desse gênero, muitas apresentam atividades biológicas como a meso-3,4,5,3',4',5'-hexametoxi-8,8'-lignana, treo-3,4,5,3',4',5'-hexametoxi-8,8'-lignana, sibileone e 2'-epiguianina, por exemplo, demonstraram resultados significativos de atividade anti-inflamatória. Alguns substâncias podem ainda apresentar atividade leishmanicida, como o yangambin, ocofílico e o eritrodaributano, atividade anti-protozoário ((-)-Caaverine) ou atividade antibacteriana e antifúngica (5,3 metoxi-nordomestina) (Figura 1) (SALLEH; AHMAD, 2017).

Além disso, a partir de análises químicas de galhos, frutos e flores de diversas espécies do gênero *Ocotea* é possível verificar uma diversidade na composição química dos seus óleos essenciais, sendo alguns exemplos de substâncias encontrados o safrol, α - e β -pineno, cinamato de metila, eucaliptol, pentan-2-ol, dentre outros, que também estão relacionados a diversas atividades biológicas (Figura 2) (SALLEH; AHMAD, 2017; TAKAKU; HABER; SETZER, 2007).

Abordagens metabolômicas analisaram extratos de 20 espécies de Lauraceae, por metodologia padronizada. Foi utilizado um método de predição *in silico* capaz de predizer extratos anti-inflamatórios que inibem *in vitro* a via da ciclo-oxigenase (COX) e da lipooxigenase (LOX), enzimas chaves no processo inflamatório. Este método foi validado e indicou diversas espécies ativas, dentre elas a *Ocotea diospyrifolia* (ALCÂNTARA, 2018).

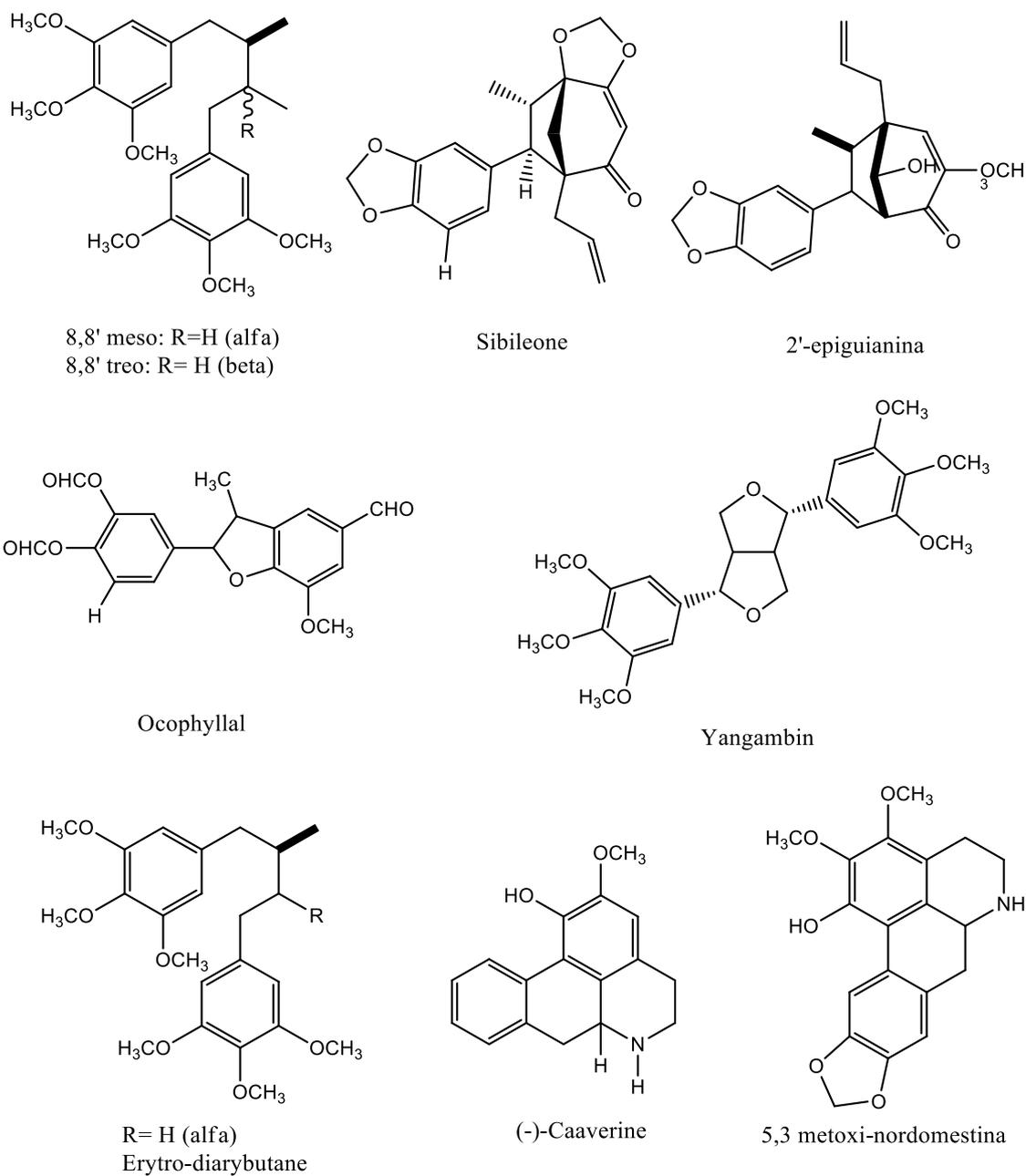


Figura 1 - Substâncias isolados a partir de espécies do gênero *Ocotea*
 Fonte: Do autor

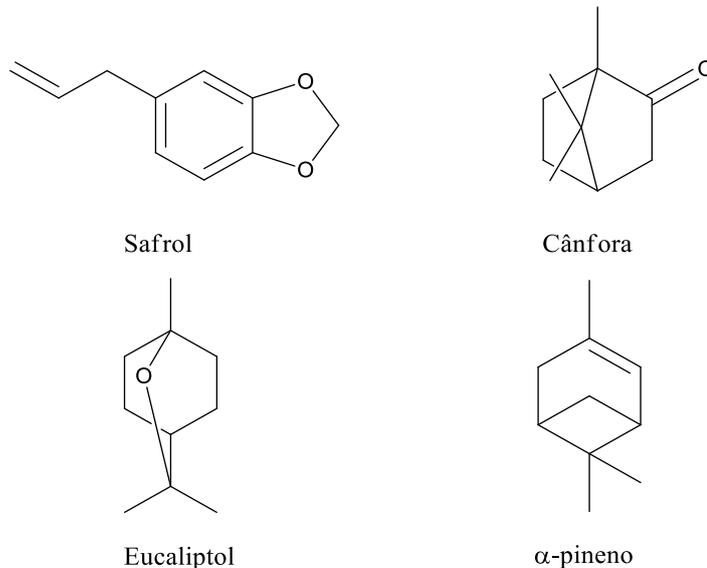


Figura 2 - Substâncias voláteis presentes nos óleos essenciais de espécies do gênero *Ocotea*.

Fonte: Do autor.

2.3 OCOTEA DIOSPYRIFOLIA (MEISN.) MEZ

A espécie *Ocotea diospyrifolia* (Meisn.) Mez, nome científico, possui como sinonímia *Oreodaphne diospyrifolia* Meisn, *Ocotea pseudocorymbosa* Hassl., *Ocotea suaveolens* (Meisn.) Benth. & Hook.f. ex Hieron, *Ocotea suaveolens* var. *robusta* Hassl., *Oreodaphne suaveolens* Meisn., *Strychnodaphne suaveolens* (Meisn.) Griseb., *Ocotea suaveolens* (Meisn.) Hassl.; sendo conhecida popularmente como canela-amarela ou canela-loura (Figura 3) (GIANNERINI; QUINET; ANDREATA, 2007; THE PLANT LIST, 2010).



Figura 3 - Frutos da *Ocotea diospyrifolia*.
Fonte: Flora Digital do Rio Grande do Sul.

É uma árvore que pode medir, aproximadamente, 20 metros e 60 centímetros de diâmetro; suas folhas são elípticas, possuem flores masculinas e femininas que ocorrem nos meses de novembro e dezembro. Seus frutos são tipo baga globosa, podendo ser coletados de abril a maio (LORENZI, 1998). Essa espécie pode ser encontrada de Minas Gerais ao Rio Grande do Sul, sendo utilizada, na construção civil para a produção de assoalhos e tabuados (LORENZI, 1998).

O estudo dessa espécie pode ser de grande importância para a descoberta de novas substâncias bioativas, já que não se encontram na literatura estudos fitoquímicos dessa planta. Além disso, por se tratar de um produto natural, presente no Brasil, seu estudo pode propiciar um avanço na nossa produção científica, agregando valor, tanto na nossa biodiversidade, quanto nas nossas pesquisas (FUNARI et al., 2013).

Os estudos biológicos desses produtos naturais contribuem para a descoberta e geração de novos fármacos. Dentre os fármacos utilizados na atualidade, a grande maioria foi obtida a partir de produtos naturais. No entanto, estima-se que somente cerca de 15% das espécies de plantas conhecidas no mundo foram estudadas com a finalidade de obtenção de princípios ativos (NOGUEIRA; DE CERQUEIRA; SOARES, 2010).

2.4 ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

A inflamação pode ser definida como uma resposta imune do sistema imunológico a uma lesão causada por agentes químicos, físicos ou microbiológicos, ou seja, age como um mecanismo de defesa, auxiliando na cicatrização, além de limitar a propagação de infecções transmissíveis (SOSA et al, 2002; SLAVICH, 2015).

Entretanto, a inflamação patológica está relacionada também com doenças como a artrite reumatoide, doença de *Crohn*, psoríase, assim como alguns tipos de câncer, doença de *Alzheimer*, obesidade, diabetes, dentre outras. Sendo assim, é altamente recomendável reduzir o nível da inflamação para evitar o desenvolvimento ou agravamento dessas doenças (KOROTKOVA; LUNDBERG, 2014; SLAVICH, 2015).

No processo inflamatório ocorre uma série de processos biológicos, cujos sintomas característicos são calor, edema, dor, vermelhidão, dentre outros. Estes são causados pelo aumento na vasodilatação (aumento no diâmetro dos vasos sanguíneos), aumento da permeabilidade vascular, estimulação física e química de nociceptores, dentre outras causas (MEDZHITOV, 2010).

O processo inflamatório está relacionado à cascata do ácido araquidônico, um ácido graxo poli-insaturado, principal precursor dos eicosanoides, um constituinte básico presente em todas as células. O ácido araquidônico é uma molécula natural, armazenada na superfície de membranas, podendo ser metabolizado por duas vias principais. Diferentes tipos de eicosanoides, como as prostaglandinas (PG) e os tromboxanos (TB), são formados através da ação das enzimas ciclo-oxigenase (COX) e os leucotrienos (LT); e lipoxinas (LX), são formados através das enzimas lipoxigenase (LOX) (

Figura 4) (MEIRER; STEINHILBER; PROSCHAK, 2014).

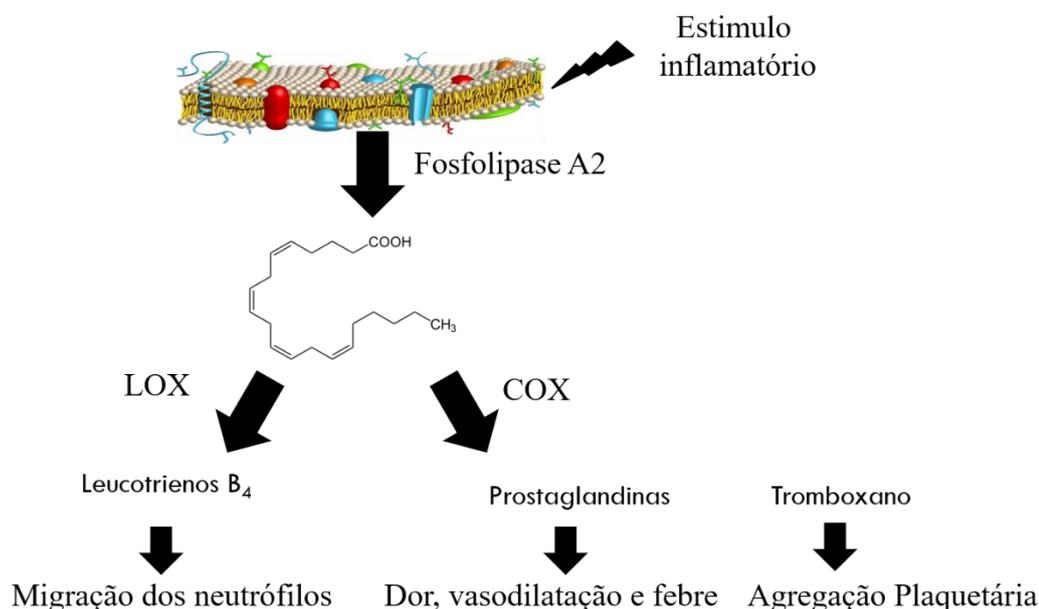


Figura 4 - Esquema processo inflamatório pela cascata do ácido araquidônico.
Fonte: Membrana plasmática- Mundo educação. Esquema: Do autor.

As COX podem ser encontradas principalmente sob duas isoformas, já descritas, COX-1 e COX-2. A COX-1 está presente em diversos tecidos, como plaquetas, rins, intestinos, dentre outros, sendo denominadas enzimas constitutivas; já as COX-2 estão expressas nos locais de inflamação além de serem constitutiva em alguns tecidos (GADDIPATI; RAIKUNDALIA; MATHAI, 2014; GÀO, SCHÖTTKER, 2017).

As enzimas COX-1 e COX-2 possuem poucas diferenças entre si. Elas apresentam em suas estruturas, respectivamente, 8 aminoácidos no grupo amino terminal e 18 aminoácidos no grupo carbóxila terminal (GADDIPATI; RAIKUNDALIA; MATHAI, 2014). As enzimas COX são responsáveis pela geração de mediadores, como as prostaglandinas, que são

responsáveis pela vermelhidão, inchaço e dor, dentre outros efeitos no local inflamado (MEIRER; STEINHILBER; PROSCHAK, 2014).

As enzimas LOX adicionam uma molécula de oxigênio a um carbono específico no ácido araquidônico; utiliza-se do Fe^{2+} , formando um hidróxido ferroso, que é responsável pela extração de um hidrogênio e adição de oxigênio, formando um radical peróxido, que é rapidamente reduzido, gerando os mediadores (GÀO; SCHÖTTKER, 2017; SORDILLO, 2018).

As enzimas LOX possuem diversas isoenzimas, como 5, 8, 12 e 15 - LOX. A mais estudada é a 5-LOX, responsável por gerar diversos eicosanoides, como o leucotrieno A4 (LTA4), responsável pela proliferação celular e angiogênese (GÀO; SCHÖTTKER, 2017; SORDILLO, 2018). Outro leucotrieno gerado pela enzima 5-LOX é o B4 (LTB4), que é um dos principais mediadores responsáveis pelo recrutamento de neutrófilos (GELFAND, 2017).

Os neutrófilos são células abundantes no sistema imune e estão presentes nos processos inflamatórios. São migrados para o tecido lesionado devido ao estímulo de mediadores, como o LTB4, podendo alcançar o tecido em até uma hora após a lesão. Além disso, eles são os principais componentes do pus. Os neutrófilos contêm grânulos repleto de enzimas, tais como as mieloperoxidase (MPO), defensinas, elastase neutrofílica, dentre outras (DAI; HARADA; TAKAMATSU, 2015; SILVA, 2015).

As MPO são enzimas encontradas em neutrófilos e em menor quantidade em monócitos e macrófagos. Então, através da quantificação desta enzima é possível avaliar o recrutamento de neutrófilos no tecido inflamado. A MPO reage com o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), gerando radicais livres e substâncias oxidantes, que atacam os agentes infecciosos. Porém, esses mesmos radicais livres e substâncias oxidantes podem causar dano oxidativo no tecido, podendo promover úlcera, aterosclerose, disfunção endotelial, dentre outras consequências (KRAWISZ; SHARON; STENSON, 1984; DAI; HARADA; TAKAMATSU, 2015).

O tratamento da inflamação é usualmente realizado através de anti-inflamatórios, esteroidais (AIEs) ou não esteroidais (AINEs). Os AINEs agem inibindo as enzimas COX. A maioria dos AINEs age de forma reversível e não seletiva sobre as enzimas (PÉREZ et al., 2014). Como exemplo de medicamentos AINES têm-se a indometacina, ibuprofeno, naproxeno, dentre outros (

Figura 5) (HILÁRIO; TERRERI; LEN, 2006).

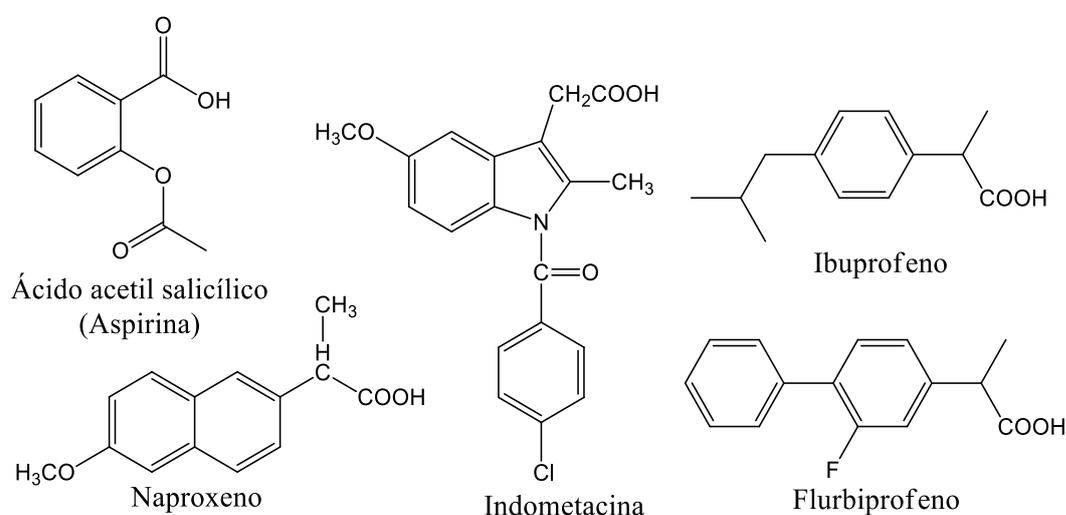


Figura 5 - Estrutura molecular de alguns AINEs.

Fonte: Do autor.

Um dos AINEs mais conhecidos e utilizados é a aspirina, que possui a capacidade de inibir as enzimas COX-1 e COX-2, porém não causa efeito sobre as enzimas LOX. Isto faz com que o ácido araquidônico produzido no processo inflamatório passe a ser metabolizado pela via das enzimas LOX. Conseqüentemente haverá formação de LTB₄ aumentada, o que pode causar, por exemplo, úlceras gástricas, decorrentes de uma maior migração de leucócitos para o estômago, e os danos oxidativos ocasionados pelos mesmos (HABIB et al., 2008; PÉREZ et al., 2014).

Os anti-inflamatórios esteroidais (AIEs), ou glicocorticoides, agem na inibição da fosfolipase A₂. A fosfolipase A₂ é a enzima responsável pela formação do ácido araquidônico, que é o substrato tanto para COX quanto para LOX. Portanto, os AIEs inibindo a fosfolipase A₂ acabam culminando na inibição das vias COX e LOX, sendo anti-inflamatórios potentes e eficientes. Porém, seu uso prolongado pode causar diversos efeitos colaterais, como osteoporose, afinamento da pele, contusões, etc. Como exemplo de AIEs, tem-se a dexametasona (

Figura 6) (STANBURY; GRAHAM, 1998).

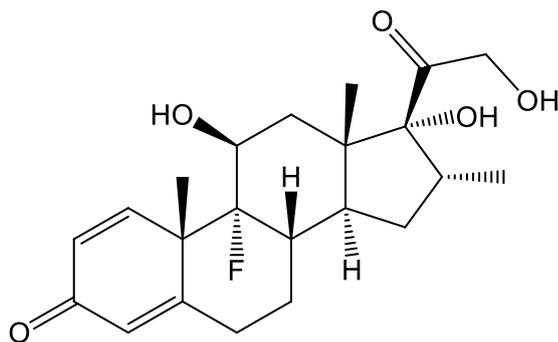


Figura 6 - Estrutura molecular da dexametasona.
Fonte: Do autor

É desejável o uso de medicamentos que agem em mais de uma via da cascata do ácido araquidônico, COX e LOX, visto que a especificidade em uma destas vias pode causar efeitos colaterais, decorrente da metabolização do ácido araquidônico pela outra via, como é o caso dos AINEs (MEIRER; STEINHILBER; PROSCHAK, 2014).

2.5 METABOLÔMICA

Ao ocorrer o ciclo celular, ocorre a formação de produtos, chamados de metabólitos. A formação dos diversos metabólitos ocorre devido aos genes envolvidos e à influência do meio em que estão inseridos. Os metabólitos são classificados em: metabólitos primários, aqueles que constituem moléculas essenciais aos processos da vida, como os aminoácidos e intermediários da glicólise; e metabólitos secundários, aqueles sintetizados para determinada função biológica, como exemplo, proteção da espécie contra microrganismos, seca ou herbivoria, dentre outras funções. Estima-se que no reino vegetal possuam mais de 200 mil metabólitos entre primários e secundários (WANG et al., 2017).

Uma forma de analisar esse grande número de metabólitos é por meio da metabolômica, que consiste em uma análise qualitativa e/ou quantitativa de metabólitos de baixo peso molecular (50 a 2000 Daltons), podendo analisar metabólitos presentes em sistemas complexos, como plantas, amostras biológicas (como tecidos, células, órgãos), amostras ambientais, etc. (MISRA et al., 2018).

Devido à capacidade de investigações abrangentes dos metabólitos, a metabolômica pode ser utilizada em diversas áreas de pesquisas, como na biologia, química, medicina, agricultura, meio ambiente, na área de toxicologia, dentre outras (WEBER et al., 2017). Na química dos produtos naturais, a metabolômica permite identificar biomarcadores ou substâncias possivelmente inéditas, auxiliando na redução do tempo necessário para o

isolamento dessas substâncias. Isso é decorrente do fato das estratégias metabolômicas permitirem guiar o isolamento de moléculas de interesse, prevenindo o investimento de tempo e reagentes para isolar substâncias já conhecidas ou inativas (CHAGAS-PAULA et al., 2015).

Em análise metabolômica é necessário definir o tipo de moléculas a ser analisado. Quando esta análise é direcionada para determinada classe ou grupo de moléculas, utiliza-se da metabolômica alvo ou “*target*”, quando se objetiva analisar uma via específica ou uma questão bioquímica (DE VOS et al., 2007; PATTI; YANES; SIUZDAK, 2013). Outra categoria da metabolômica é a “*untarget*”, na qual é avaliado o perfil de metabólitos presentes no material em análise, sem ter conhecimento e direcionamento para nenhuma molécula ou classe de moléculas específica (DUDLEY et al., 2010).

Outro fator importante a ser considerado em uma análise metabolômica é o tipo de experimento a ser realizado. Em amostras complexas, como a de extratos de plantas, é necessária a utilização de métodos como a cromatografia líquida e gasosa acoplados a métodos espectroscópicos e espectrométricos, tais como espectrometria de massas (EM), espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) ou espectroscopia de infravermelho (IV). Além disso, é necessário e adequado o tratamento de dados, seguido de estudos de quimiometria (FUKUSAKI; KOBAYASHI, 2005).

A cromatografia é um método físico-químico de análise, onde os componentes de uma mistura são separados através da distribuição das substâncias entre duas fases, fase móvel e estacionária. Em análises metabolômicas, geralmente utiliza-se a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (HPLC, do inglês *high performance liquid chromatography*) ou a cromatografia gasosa (CG), sendo que essas técnicas permitem uma redução no tempo de análise e uma alta eficiência de separação (LAKSHMI, 2015). Ao acoplar a cromatografia líquida ou gasosa com a EM, detecta-se maior número de substâncias do que outros tipos de acoplamentos (MYERS et al., 2017).

A EM consiste em uma técnica analítica que permite a verificação da razão massa/carga (m/z) (PAVIA et al., 2010). O equipamento utilizado pode ser resumido em basicamente uma entrada para amostra, uma fonte de íons responsável por transformar as substâncias da amostra em íons no estado gasoso, um analisador, um detector e um processador. Como exemplos de fontes ionizadoras têm-se o impacto de elétrons (EI), ionização química (IC), ionização/dessorção por laser assistido por uma matriz (MALDI) e a ionização por *eletrospray* (ESI, do inglês *electrospray ionisation*). O analisador, por sua vez,

possui a finalidade de separar os íons de acordo com sua m/z . O detector, conta o número de íons e o processador de sinal armazena os dados gerados (PAVIA et al., 2010).

A fonte de ionização mais utilizada em estudos metabolômicos é a ESI. Ela promove a formação de gotículas através de um spray, geralmente na presença de diferença de potencial. Devido à presença de um gás nebulizador, ocorre a evaporação do solvente, fazendo com que as gotículas reduzam de tamanho. Isto promove aumento das repulsões eletrostáticas, fazendo com que ocorra a explosão de Coulomb e as gotícula se rompem, formando os íons (ERNST et al., 2014)

Outra técnica analítica também utilizada em metabolômica é a IV. Esta técnica fornece informações acerca da estrutura da molécula, os grupos funcionais presentes. A técnica baseia-se na absorção de radiação na região do infravermelho (4000 a 400 cm^{-1}). A radiação absorvida deve ter a mesma frequência do movimento vibracional da molécula natural, sendo necessário um momento de dipolo (PAVIA et al., 2010; AGUIAR et al, 2014).

Em metabolômica, a RMN também é um método de grande importância. Através desta técnica, é possível detectar simultaneamente diversos grupos de metabólitos. Ela determina os níveis reais de metabólitos presentes em uma planta, sendo de grande importância para a elucidação da estrutura dos mesmos (YULIANA et al., 2013).

Qualquer uma dessas técnicas analíticas geram uma grande quantidade de dados, sendo necessário o uso de softwares para realizar os tratamentos dos dados, como o *MetAlign*, *MZmine*, *MassLynx* e *MestReNova* (KATAJAMAA; OREŠIČ, 2007). No *MassLynx* é possível realizar as etapas de processamento de análise de dados obtidos por CLAE-EM e tratamento dos dados obtidos. Além disso, esse software permite que as análises estatísticas multivariadas sejam realizadas em uma ferramenta adicional chamada *EZinfo*.

Na etapa de processamento de dados, o objetivo é transformar os dados brutos em informações que facilitam o acesso às características dos íons analisados, como a razão m/z , o tempo de retenção, a intensidade dos íons e a suas respectivas distribuições isotópicas. As etapas principais para o processamento de dados envolvem a filtragem, deconvolução, alinhamento e a normalização dos picos (KATAJAMAA; OREŠIČ, 2007).

Após a etapa de processamento, os dados gerados podem ser analisados através de análises estatísticas. As análises multivariadas são utilizadas, devido à capacidade de organizar os metabólitos em grupos distintos. Estas podem ainda ser divididas em análises

multivariadas não supervisionadas (AMNS), análises que não necessitam de informações inseridas pelo analista para a organização dos dados; neste caso, o próprio experimento organiza as variáveis de acordo com as similaridades entre as classes ou grupo de amostras analisados; e análises multivariadas supervisionadas (AMS), em que é necessário adicionar a classificação das amostras para organização das variáveis conforme as classes informadas (LILAND, 2011).

Como exemplo de AMNS têm-se a análise dos componentes principais (PCA, do inglês *principal component analysis*). A PCA realiza ortogonalizações vetoriais por uma série de processos matemáticos, recriando os dados. A maior variância está no primeiro componente e, a medida que o número de componentes aumenta, ocorre perda de variância, ou seja, uma diminuição na variabilidade dos dados. Na metabolômica, a PCA fornece informações dos *outliers* e das tendências dos metabólitos analisados (LILAND, 2011).

Já para as AMS pode-se citar como exemplo o modelo dos quadrados mínimos parciais (PLS, do inglês *partial least squares*). Este modelo realiza regressão, fazendo com que ocorra uma maior covariância entre as variáveis e as respostas (LILAND, 2011). Outro modelo é análise ortogonal por mínimos quadrados (OPLS, do inglês *orthogonal partial least squares*), uma extensão da PLS, que possui um filtro de correção do sinal ortogonal (BYLESJO et al., 2007).

2.6. FITOQUÍMICA

A fitoquímica é uma das subáreas mais antigas da química orgânica, sendo importante para revelar a composição química de plantas, inclusive aquelas de interesse na medicina popular. Uma das finalidades da química dos produtos naturais é o isolamento e elucidação estrutural de novas substâncias ou substâncias de interesse farmacológico ou toxicológico. Para esta finalidade, são utilizadas diversas técnicas analíticas para a obtenção do produto (DE BESSA et al., 2014).

Como exemplo de métodos de separação comumente utilizados para a purificação de substâncias orgânicos, podem-se citar a extração em fase sólida e a cromatografia. A cromatografia é, sem dúvida, extremamente importante; sem ela seria impossível o desenvolvimento da química dos produtos naturais (PACHECO et al., 2015).

A extração em fase sólida é uma técnica usada na preparação de amostras, sendo objetivos dessa técnica a remoção de interferentes, o isolamento e a concentração de analitos.

Nessa técnica, utiliza-se para a separação das substâncias um cartucho ou disco com empacotamento; os adsorventes usados como fase sólida normalmente são grupos orgânicos ligados quimicamente à sílica, como o octadecil (C18), octila (C8), butila (C4), fenil, cianopropil, aminopropil, dentre outros (Figura 7) (JARDIM, 2010).

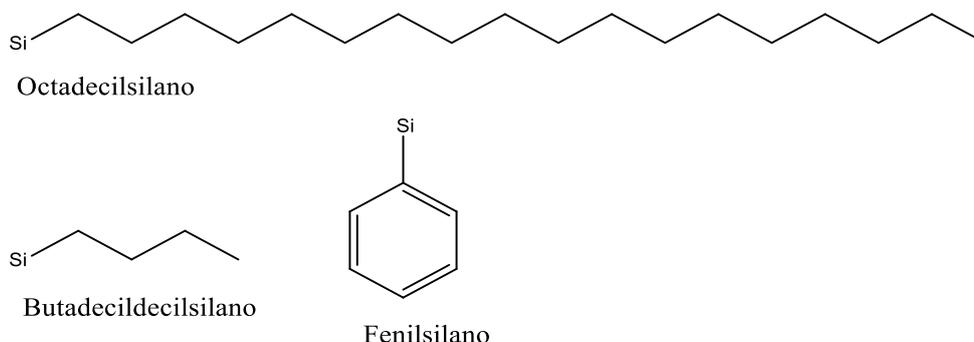


Figura 7 - Estrutura química das fases estacionárias dos grupos ligados quimicamente sílica.

Fonte: Do autor.

A cromatografia pode ser classificada de acordo com o tipo de fase móvel utilizada (cromatografia líquida ou gasosa), de acordo com a fase estacionária (sólida, líquida ou quimicamente ligada), pela forma física do sistema cromatográfico (coluna ou planar) ou pelo mecanismo de separação (troca iônica, exclusão, etc) (VIEIRA, 1998).

A cromatografia líquida clássica, ou cromatografia em coluna, é uma técnica muito utilizada na química de produtos naturais para o isolamento e purificação. A sílica é muito utilizada como adsorvente, podendo possuir partículas entre 60 a 230 *Mesh*; quando se utiliza partículas menores com 230 a 400 *Mesh*, é denominada cromatografia *flash* (VIEIRA, 1998).

Outro tipo de cromatografia muito utilizada na química dos produtos naturais é uma forma moderna de cromatografia em coluna, o HPLC, denominada de alta performance, que possui alta resolução, alta pressão e alta velocidade. A fase móvel é forçada através da coluna com adsorvente de menores tamanhos de partícula, aumentando assim a resolução cromatográfica e reduzindo o tempo de análise. Possibilita análises nas fases reversa, em que se utiliza uma fase estacionária mais apolar que a fase móvel, como C18, C8, C4, ou na fase normal, em que se utiliza uma fase estacionária mais polar, como o aminopropil, cianopropil, diol. As análises utilizando o HPLC podem ser realizadas nos modos analítico (quantificações) e preparativo (isolamento) (LAKSHMI, 2015)

Os mecanismos de separação que atuam na extração em fase sólida e nos métodos cromatográficos são a adsorção, partição, troca iônica e exclusão. Esses mecanismos estão relacionados aos processos físicos, químicos e mecânicos que ocorrem no processo de separação (JARDIM, 2010).

Após a purificação, é necessário utilizar técnicas para a elucidação estrutural. A EM é uma técnica que auxilia na elucidação, podendo obter informações como a massa dos substâncias, além dos seus padrões de fragmentação (RIBEIRO; DE SOUZA, 2007)

Uma técnica essencial para a elucidação de substâncias orgânicos é a RMN, que fornece informações importantes sobre a estrutura da molécula. Nesta técnica, é possível identificar o número de átomos que se diferenciam magneticamente (PAVIA, 2010). Os núcleos, quando colocados em um campo magnético, podem absorver energia eletromagnética; isto faz com que ocorra inversão do spin (ressonância), sendo que a frequência em que ele irá absorver depende da posição dos núcleos na molécula. Posteriormente, a energia é liberada (relaxação) e detectada na forma de espectros (JACOBSEN, 2007).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho é estudar a composição química da *Ocotea diospyrifolia* e o seu potencial anti-inflamatório.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos para este trabalho foram:

- obter os extratos das folhas e cascas da espécie *O. diospyrifolia*;
- caracterizar a composição química das substâncias presentes na planta;
- isolar substâncias;
- analisar se a espécie *O. diospyrifolia* possui atividade anti-inflamatória.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL - *OCOTEA DIOSPYRIFOLIA*

(MEISN.) MEZ

As plantas da espécie *O. diospyrifolia*, foram coletadas no dia 20 de junho de 2017, em um fragmento da Mata Atlântica, situado no sul de Minas Gerais, no município de Alfenas-MG, na localização geográfica W 046°07'29.2" S 21°25'23.1". Coletaram-se as folhas e cascas, de forma que a quantidade e método de coleta não prejudicasse a sobrevivência da espécie. Foram escolhidas para a colheita árvores que apresentavam uma maior quantidade de material vegetal e aparentemente uma melhor saúde (material vegetal com ausência de manchas e fungos). O cadastro de acesso no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado - SisGen tem o seguinte número: A913C3F.

4.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES

As plantas foram secas em estufa com ar circulante e temperatura de 40 °C, até obter peso constante, por cerca de 72 horas. Posteriormente, as folhas e as cascas foram trituradas em um moinho de facas. O restante do pó das folhas coletado foi utilizado para o preparo do extrato bruto, o qual foi utilizado no ensaio de atividade anti-inflamatória e para o preparo das frações. O mesmo foi realizado com o restante do pó das cascas de *O. diospyrifolia*.

Para o preparo do extrato bruto das folhas, foram utilizados 800 g do pó, que foi separado em duas partes para facilitar o processo de extração. Adicionou-se 1 L de etanol em cada parte e essa solução foi mantida em banho de ultrassom por 60 minutos. Posteriormente, filtraram-se os extratos, sendo estes concentrados em um rotaevaporador, obtendo-se o extrato bruto. Repetiu-se a adição de etanol, filtragem e a rotoevaporação por mais duas vezes. Juntou-se o extrato bruto obtido e reservou-se para o preparo das frações. Para o preparo do extrato bruto da casca, foram utilizados 405 g do pó obtido após a trituração. A extração procedeu-se da mesma forma que para a obtenção do extrato bruto da folha. Para a extração do caule, utilizou-se 1 L de etanol para cada processo (extração 3 vezes).

Uma alíquota de cerca de 1 g dos extratos foi armazenada para os ensaios da atividade anti-inflamatória e o restante, cerca de 81,1 g do extrato da folha e 34,59 g do extrato do caule, foi utilizado para o preparo das frações (Figura 8). Para a obtenção das frações, os extratos foram solubilizados em etanol e água (1:2,

v:v) acidificado a pH 2 com ácido acético glacial, com a finalidade de deixar os alcaloides protonados mais solúveis em água e insolúveis em solventes orgânicos. Em seguida, esses extratos foram subsequentemente particionados em hexano e acetato de etila. Utilizou-se 400 mL desses solventes para a partição. O processo foi realizado três vezes, renovando os 400 mL de solvente orgânico a cada etapa de renovação do solvente.

A fração aquosa obtida foi neutralizada com NaOH 10% (v:v) para que os alcaloides ficassem na sua forma livre e, portanto, mais solúveis na fase orgânica que na fase aquosa. Uma vez neutralizada, esta fração foi particionada em clorofórmio para separação dos alcaloides das substâncias polares. A fração em clorofórmio, provavelmente rica em alcaloides, por isso denominada alcaloídica, foi concentrada em rotaevaporador. A fração aquosa foi congelada e liofilizada. Todas as frações foram mantidas sob armazenamento a -20°C até o momento dos ensaios biológicos e procedimento de caracterização química e isolamento de substâncias.

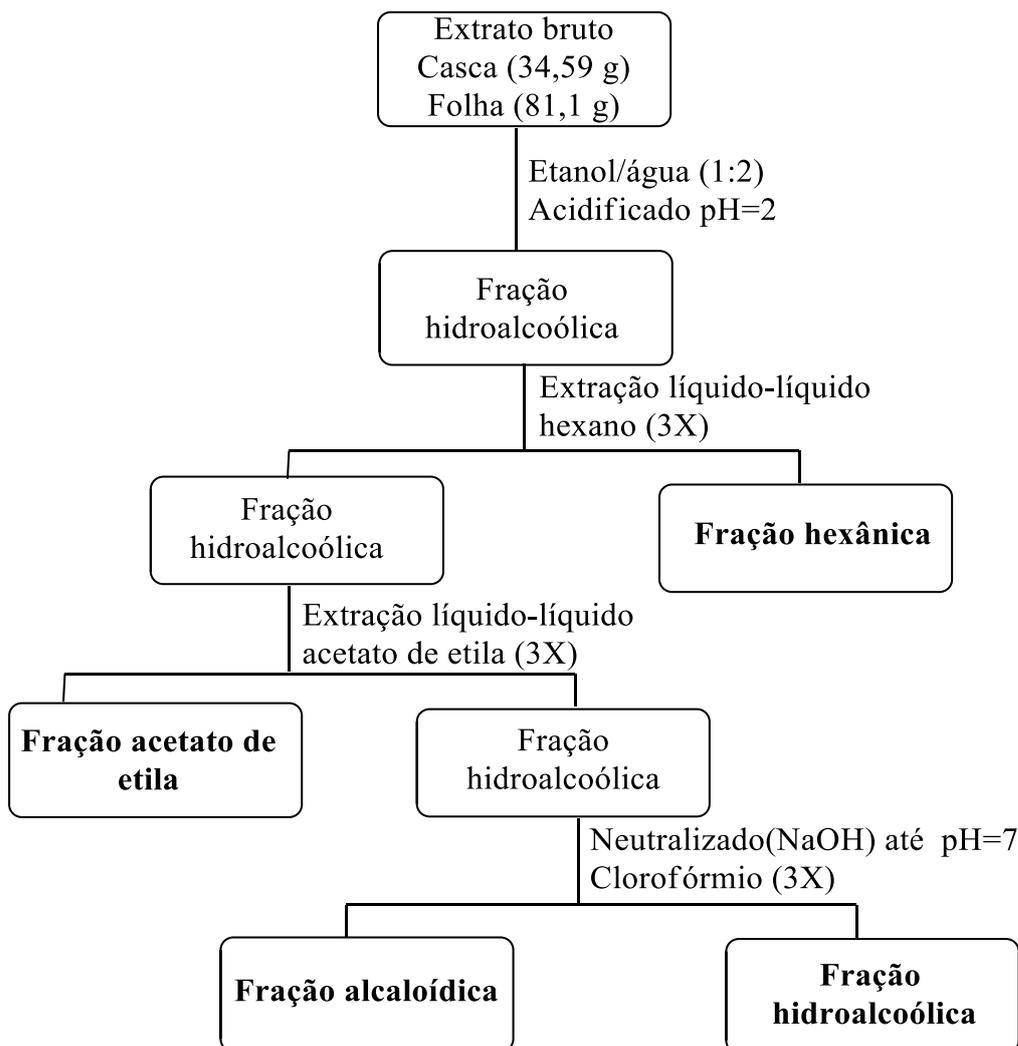


Figura 8 - Fluxograma da obtenção das frações a partir do extrato bruto da folha e casca.

Fonte: Do autor.

4.3 ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

4.3.1 Animais

Para a análise da atividade anti-inflamatória, obteve-se a aprovação do CEUA n° 46/2017. Utilizaram-se camundongos albinos da linhagem Swiss, fornecidos pelo Centro de Bioterismo da UNIFAL-MG. Os camundongos foram ambientados sob uma temperatura de 20 ± 2 °C em ciclos claro/escuro de 12 horas, sendo sua dieta composta por ração *ad libitum*. Os animais utilizados eram machos, adultos, com um peso médio entre 25-35 g e em grupos de até 8 animais.

4.3.2 Edema de orelha

Utilizou-se o óleo de cróton a 5% por volume, dissolvido em acetona, para induzir a inflamação cutânea na orelha esquerda dos camundongos, sendo que na orelha direita foi aplicada acetona, para o controle. Após trinta minutos da aplicação da solução do óleo de cróton na orelha esquerda, foram aplicados os extratos da folha e da casca, os óleos essenciais de folha e casca, assim como os controles (0,5 mg/orelha). O grupo do controle negativo recebeu a aplicação do veículo (acetona); o controle positivo foi a dexametasona (0,5/orelha). Após 6 horas da indução da inflamação, os animais foram sacrificados, por inalação de isoflurano. Para tal, um algodão embebido em isoflurano foi colocado em ambiente hermeticamente fechado com os animais, porém sem contato direto com os mesmos. Utilizou-se um *punch* para a retirada de um fragmento (6 mm) de ambas as orelhas. A avaliação do edema foi verificada pela diferença de peso entre os fragmentos da orelha esquerda e direita. A análise estatística foi realizada por ANOVA one-way, seguido de teste de comparação múltipla de Dunnett, sendo os resultados expressos como média \pm erro médio padrão (EMP) da atividade de MPO, com 95% de confiança (ou $p \leq 0,05$). Para o cálculo da porcentagem de inibição, utilizou-se a Equação 1.

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

Equação 1: Porcentagem de inibição de edema

Após a verificação dos resultados do edema de orelha para os extratos, o ensaio de atividade anti-inflamatória foi realizado para as frações do extrato bruto que apresentaram melhor atividade anti-inflamatória, sendo a metodologia utilizada a mesma descrita anteriormente.

Os fragmentos da orelha esquerda foram mantidos em 200 μL de uma solução tampão de fosfato de sódio 0,02 M, Na_2EDTA 0,015 M, NaCl 0,1 M, pH 4,7 (Tampão 1), sob temperatura de $-20\text{ }^\circ\text{C}$, até a realização da análise. Os fragmentos foram manuseados sob o gelo. Adicionou-se mais 400 μL do Tampão 1 e utilizou-se o macerador de tecidos (13000 rpm; 3 vezes) para homogeneização. Posteriormente, a amostra foi centrifugada a 3000 rpm por 15 min. O sobrenadante foi retirado e armazenado para futuras análises de quantificação de mediadores inflamatórios.

Os precipitados foram suspensos em 600 μL de tampão fosfato de sódio 0,05 M, 0,5% de brometo de hexadeciltrimetil amônio e pH 5,4 (Tampão 2). Novamente os fragmentos

foram homogeneizados, posteriormente centrifugados e os sobrenadantes armazenados a -20°C.

4.3.3 Ensaio de MPO para avaliar recrutamento de neutrófilos

Para as quantificações do MPO foi utilizado o sobrenadante do tampão 2, seguindo as recomendações contidas no kit BDOptEIATM (MPO no de catálogo 600620, Cayman Chemical), para esta análise. Desta forma, foram utilizados 50 µL do sobrenadante, NaPO₄ 0,08 M, o substrato tetrametilbenzidina (TMB) e H₂O₂ em placas de 96 poços. Para parar a reação, utilizou-se uma solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄). Posteriormente, foram realizadas leituras de absorvância, com comprimento de onda de 450 nm. Os resultados foram expressos como média ± EMP da atividade de MPO, com 95% de confiança (ou $p \leq 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas pelo programa ANOVA one-way seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunnett.

4.4 ESTUDO METABOLÔMICO

4.4.1 Preparo das amostras

Para o preparo das amostras dos extratos da casca e da folha e suas frações foram pesados e diluídos na concentração de 1 mg/mL em acetonitrila (MeCN). Em seguida, foi feito o *clean up* da amostra, com 300 µL de hexano, por duas vezes. A amostra foi filtrada com filtro de seringa de PTFE e 0,45 µm de diâmetro de poro. O branco foi preparado com MeCN e submetido ao mesmo processo utilizado para o preparo das amostras. Uma das amostras foi injetada no início e final da análise, sendo a replicata técnica, importante para verificar a reprodutibilidade, a variação no tempo de retenção e o erro de massa entre as análises.

4.4.2 Método e equipamento

Para o estudo metabolômico foi realizada uma análise em espectrômetro de massas acoplado a um cromatógrafo líquido de ultra eficiência (UPLC) com sistema ESI-TOF (Waters-XEVO-G2XSQTOF). Para a análise, utilizou-se uma coluna de fase reversa C18 ultra analítica ACQUITY UPLC® HSS T3 (2.1x 100 mm) 1.8 µm de diâmetro de partícula, forno de coluna a 45 °C e método gradiente de 2% de MeCN a 95% de MeCN em água (0.1% ácido fórmico) por 8 min; 95% de MeCN a 2% até 8.7 min; 2% de MeCN isocrático até 10 min; fluxo de 0,5 mL por min; e volume de injeção: 10 µL da amostra. Os parâmetros

utilizados na calibração do espectrômetro de massas foram: modo positivo e negativo; faixa de varredura: 50 a 1200 Da; voltagem do cone: 30,000 V; energia de colisão: 4,000 no modo negativo e 6,000 no modo positivo; frequência da varredura: 20,000 seg; referência DRE: 99,990. E os parâmetros experimentais do instrumento foram temperatura do capilar: 130°C; polaridade do capilar: 2,000 KV (modo negativo) e 3,000 KV (modo positivo); energia de colisão: 6,0 (modo negativo) e 15,0 (modo positivo) ; fluxo do gás no cone: 50 L/Hr; fluxo de gás de dessolvatação: 900 L/Hr, taxa de fluxo da infusão da amostra: 5 µL/min.

4.4.3. Tratamento dos dados, desreplicação e análises estatísticas multivariadas dos dados

Os dados cromatográficos e espectrométricos obtidos foram analisados no software *MassLynx* TM V4.1 (*Waters MS*) e *MarkerLynx* XS 3.0.1. Foram ajustados alguns parâmetros do software para o processamento dos dados das amostras. Para o modo positivo e negativo foram utilizados os mesmos parâmetros: intensidade mínima= 20000, tolerância do tempo de retenção = 0,1 min (6 s), janela de massa = 0,05 ppm, tolerância de m/z (Da) = 0,02.

As análises estatísticas foram realizadas num software extensão do *MassLynx*, o *EZinfo*. Foi realizada a Análise de Componentes Principais (PCA). Neste mesmo software, foi realizada a pesquisa de possíveis biomarcadores, utilizando-se o método estatístico multivariado supervisionado do tipo PLS-DA. Foi utilizada a normalização dos dados de ambos os modos de detenção (positiva e negativa): Pareto. As amostras que apresentaram atividade anti-inflamatória, tanto pelo ensaio do edema de orelha quanto pelo ensaio do MPO, foram informadas como da classe I e as amostras que não inibiram como NI. Por meio deste supervisionamento foi possível determinar as variáveis importantes para a projeção (VIP) e seus respectivos coeficientes de correlação, portanto, as mais correlacionadas com as propriedades do grupo I.

A etapa de desreplicação foi realizada para as massas que possuíam VIP maior que 2 e correlacionavam positivamente para a inibição dual das duas vias, COX e LOX. As massas foram pesquisadas nos espectros de massa e suas respectivas fórmulas moleculares foram sugeridas através da ferramenta *Elemental Composition* no software *MassLynx* TM V4.1. Para a confirmação da fórmula gerada, foi calculada a porcentagem de carbono provável conforme o padrão isotópico. Posteriormente, a fórmula obtida foi pesquisada no *Dictionary of Natural Products* (DNP), Banco de dados *in house* de *Ocotea* e *Knapsack DB*. para a verificação dos prováveis candidatos (hits).

4.5 FITOQUÍMICA

4.5.1 Fração acetato de etila das folhas (FAF)

Coluna 1: Cromatografia flash, utilizou-se coluna de vidro com 4,5 cm de diâmetro, 100 g de sílica e 11,4 g da fração acetato de etila. Utilizou-se como fase móvel a mistura das seguintes soluções: (A) hexano: acetato de etila (95:5, v/v); (B) acetato de etila: metanol (90:10, v/v); (C) acetona e (D) metanol. Foram realizados gradientes nas proporções 100% (600 mL), 95% (300 mL), 90% (600 mL), 85% (300 mL) e 80% de A em B (300 mL). Posteriormente, utilizou-se 100% de B (300 mL), seguido de 95% de B com 5% C (600 mL). O último eluente foi 100% D (600 mL). Foram coletadas 12 frações, com um volume de 300 mL cada. As frações obtidas neste processo cromatográfico foram analisadas por CCD e agrupadas, a primeira e segunda fração fora agrupada em FAF-1 e a terceira e quarta foram agrupadas na FAF-3, obtendo-se 10 subfrações com perfis de CCD similares (FAF 1 ao 10).

Coluna 2: A subfração FAF 7 foi purificada utilizando o método de extração em fase sólida. Foram utilizados 1.020 g de amostra, cartucho de fase estacionária octadecilsilano (C18) e como fase móvel, utilizou-se gradiente de MeOH / H₂O (50%, 70%, 90% e 100% MeOH), com volume de 100 mL para cada tipo de gradiente. Utilizou-se um coletor com vácuo de 14,5 Hg neste procedimento, frações coletadas dos 50 mL. Oito novas frações (FAF 7-1 a 7-8) foram obtidas.

Coluna 3: A FAF 7-4 foi isolada utilizando HPLC-UV-DAD nas seguintes condições: 35% de MeCN durante 30 min; coluna C18 (Inertsil ODS- 4, 5 µm, 7,6 mm x 250 mm) vazão: 1,5 mL / min, volume de injeção: 20 µL, obtendo a substância **1** (Figura 9).

Coluna 4: A FAF-8 foi purificada utilizando o método de extração em fase sólida. Utilizou-se 2,2282 g de amostra, um cartucho com fase estacionária de octadecilsilano (C18) e como fase móvel utilizou-se um gradiente de metanol/água (30%, 50%, 70%, 90% e 100 % metanol) com um volume de 200 mL para cada tipo de gradiente. Um manifold com vácuo 14.5 Hg foi utilizado neste procedimento. Foram obtidas cinco novas frações (FAF 8-1 A 8-5)

Coluna 5: A fração FAF 8-2 foi purificada utilizando o HPLC-UV-DAD nas seguintes condições: 35% MeCN, por 30 min.; coluna semi-preparativa de fase reversa (C18) Inertsil ODS-, 5 µm, 7,6 mm x 250 mm, fluxo: 1,5 mL/min, volume de injeção: 20 µL. As frações obtidas foram concentradas e analisadas, para verificar a pureza das substâncias, obtendo-se as substâncias **2**, **3** e **4** (Figura 9).

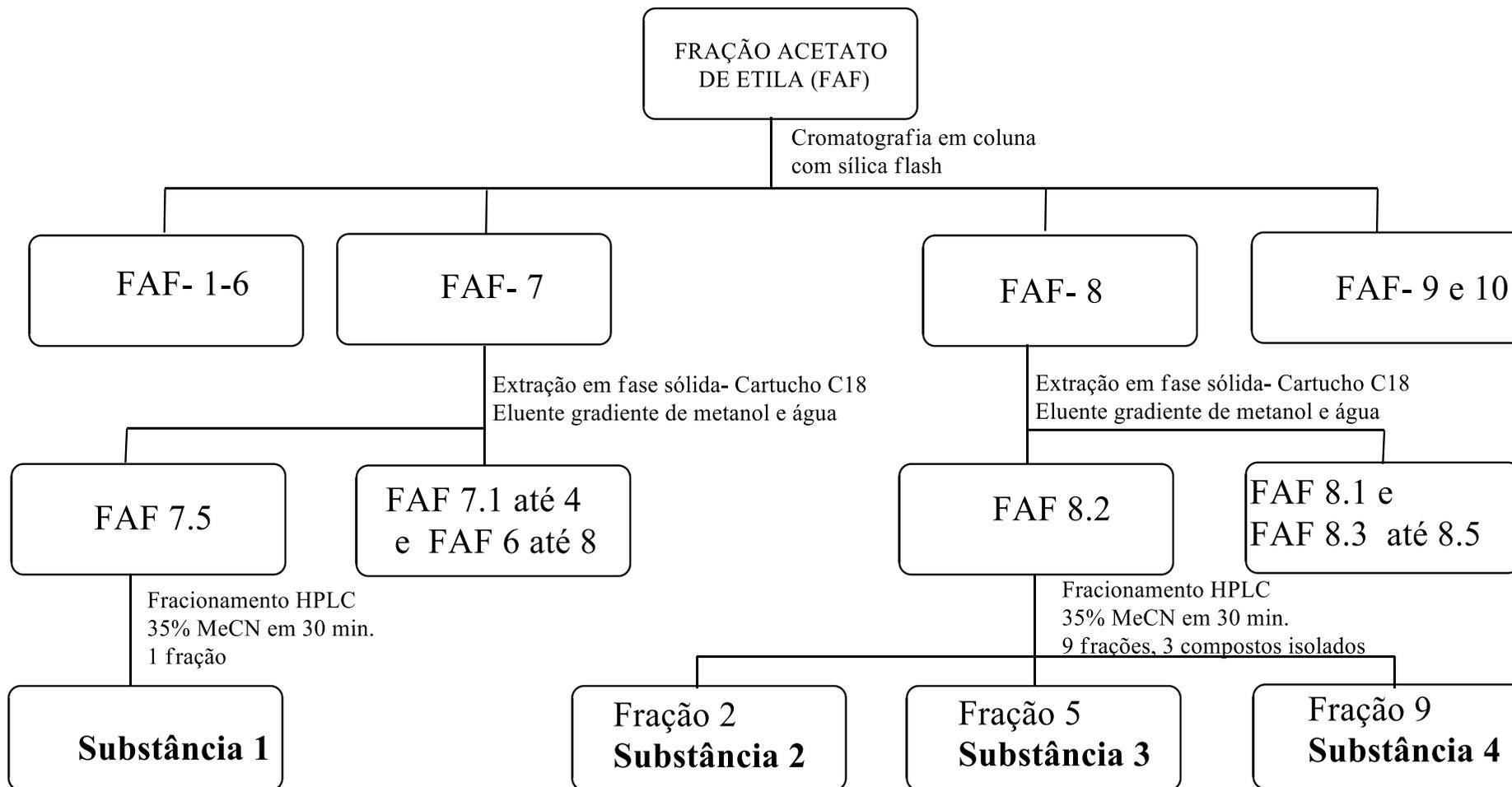


Figura 9 - Fluxograma obtenção das substâncias 1 a 4.
Fonte: Do autor.

4.5.2 Fração alcaloídica do caule (FALC)

Coluna 6: A fração FALC (0,244 g) foi purificada por separação cromatográfica em coluna Sephadex LH-20, utilizando como fase móvel MeOH, foram obtidas 39 subfrações de 6 mL cada, as subfrações 1-7, 9-10, 18-19, 20-21, 24-28, 29-35, 36-38 foram agrupadas de acordo com o perfil TLC, obtendo 18 subfrações (FALC 1 ao 18).

Coluna 7: A fração FALC 3 foi separada utilizando o HPLC-UV-DAD nas seguintes condições: 35-100 % MeOH, por 30 min.; coluna semi- preparativa de fase reversa (C18) Inertsil ODS-, 5 µm, 7,6 mm x 250 mm, fluxo: 1,5 mL/min, volume de injeção: 20 µL. Obteve-se, nesta etapa, a substância **5** (Figura 10).

Coluna 8: A fração FALC 6 foi separada utilizando o HPLC-UV-DAD (mesmas condições mencionadas coluna 7), obtendo-se a substância **6** (Figura 10).

Coluna 9: A fração FALC 11 foi separada utilizando o HPLC-UV-DAD (mesmas condições mencionadas coluna 7), obtendo-se as substâncias **7, 8 e 9** (Figura 10).

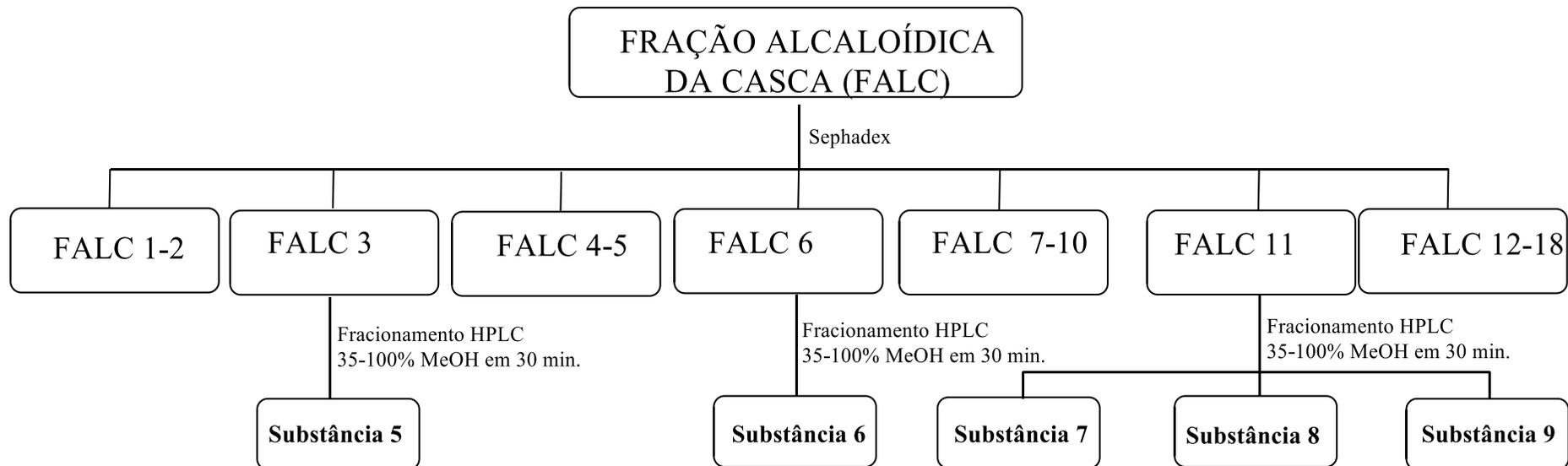


Figura 10 - Fluxograma obtenção das substâncias 5 a 9.
Fonte: Do autor

4.6 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL

Para a determinação estrutural, foram utilizadas as técnicas de RMN uni-dimensional de ^1H e ^{13}C e bidimensionais de correlação (COSY, HSQC e HMBC). As amostras foram preparadas solubilizando-se a massa da substância obtida em 600 μL de DMSO deuterado (DMSO- d_6). Os espectros de RMN a 300 MHz foram obtidos em espectrômetro *Bruker*. Também foi utilizado ESI-MS/MS no modo positivo e negativo, para a confirmação da estrutura, através da massa e padrão de fragmentação substâncias isoladas.

4.7 EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS E DA CASCA DA *O.*

DIOPYRIOFOLIA

O óleo essencial da *O. diopyrifolia* foi obtido por arraste a vapor, durante 3 horas. Foram utilizados 270 g das folhas frescas e 214 g da casca fresca. Posteriormente, os dois óleos obtidos foram armazenados a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ até o momento das análises. Para a análise em CG-EM dos óleos essenciais utilizou-se 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% phenyl, 95% polydimethylsiloxane, 30 m X 0,32 mm X 0,25 μm ; Restek, Bellefonte, PA, USA) e o tratamento de dados foi através do software GC-MS Solution. Essa análise foi realizada injetando 1,0 μL da amostra, a uma temperatura de $225\text{ }^\circ\text{C}$, modo Split, split ratio, 50:1; a temperatura da interface foi de $250\text{ }^\circ\text{C}$, sendo Hélio o gás carregador utilizado com uma velocidade de 46,1 cm/s linear e pressão de 99.3 KPa; temperatura do detector foi de $240\text{ }^\circ\text{C}$, operando com o seguinte programa de temperatura do forno: $60\text{ }^\circ\text{C}$ mantida durante 2 minutos, elevando-se a $3\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ até $240\text{ }^\circ\text{C}$, mantida durante 5 min. A temperatura da fonte foi de $200\text{ }^\circ\text{C}$ e a temperatura da interface de $250\text{ }^\circ\text{C}$. As análises em EI-MS foram conduzidas sob uma voltagem de 70 eV e a temperatura da fonte ionizadora foi de $200\text{ }^\circ\text{C}$. Os índices de retenção de todas as substâncias foram determinados pelo índice de Kovats. A identificação das substâncias do óleo essencial foi feita individualmente, comparando-se os índices de Kovats e espectros de massas juntamente com os padrões de fragmentação daqueles substâncias já descritos na literatura (ADAMS, 2017) . Comparou-se também o índice de similaridade.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 MATERIAL VEGETAL, EXTRATOS E FRAÇÕES.

Após a coleta do material vegetal, folhas e cascas de tronco de *O. diospyrifolia* (Meins) Mez, uma exsicata com número de tombo de 2965, foi depositada no herbário da Universidade Federal de Alfenas.

O material vegetal foi seco e triturado em um moinho de facas, obtendo-se 800 g do pó do material vegetal. Posteriormente, foi preparado o extrato com etanol, utilizando como método de extração o ultrassom. Ao utilizar o ultrassom é possível melhorar a capacidade de extrair compostos bioativos (como flavonoides e alcaloides), já que o ultrassom causa modificações nas estruturas celulares, possibilitando que o solvente permeie mais facilmente na matriz vegetal aumentando a extração (SOUZA; MELLO; LOPES, 2011; TOMA *et al.*, 2001).

O extrato bruto obtido foi de 82,1 g, ou seja, um rendimento de 10,16% quando comparado ao material vegetal. Esse extrato bruto foi particionado, obtendo-se as frações hexânica (16,4 g), alcaloídica (0,199 g) e de acetato de etila (16 g)., com rendimentos de, respectivamente 19,97%, 0,24%, 19,75%, sendo o cálculo realizado a partir do extrato bruto. Além disso, obteve-se também, a fração aquosa.

Para o material vegetal da casca, foram obtidos 405 g do pó do material vegetal e 34,59 g do extrato bruto, obtendo-se as frações: hexânica (0,1400 g), alcaloídica (0,244 g) e de acetato de etila (4,31 g), com rendimentos de, respectivamente, 0,41%, 0,71% e 12,45% do extrato bruto. Também, obteve-se, a fração aquosa.

As frações e os extratos brutos foram utilizados para o ensaio da atividade anti-inflamatória.

5.2 ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

5.2.1 Edema de Orelha

O óleo de cróton possui em sua composição o acetato de tetradecanoil-forbol (TPA), sua principal substância irritante, capaz de induzir a inflamação. É comumente utilizado para ensaios de edema de orelha, pois permite avaliar a capacidade de anti-inflamatórios esteroidais e não esteroidais (MOTTA *et al.*, 2013).

Para o teste do edema de orelha, observou-se que o extrato do caule não inibiu a formação do edema, enquanto o extrato da folha apresentou uma inibição de 61% não diferenciando estatisticamente do fármaco de referência a dexametasona (57%), Figura 11a.

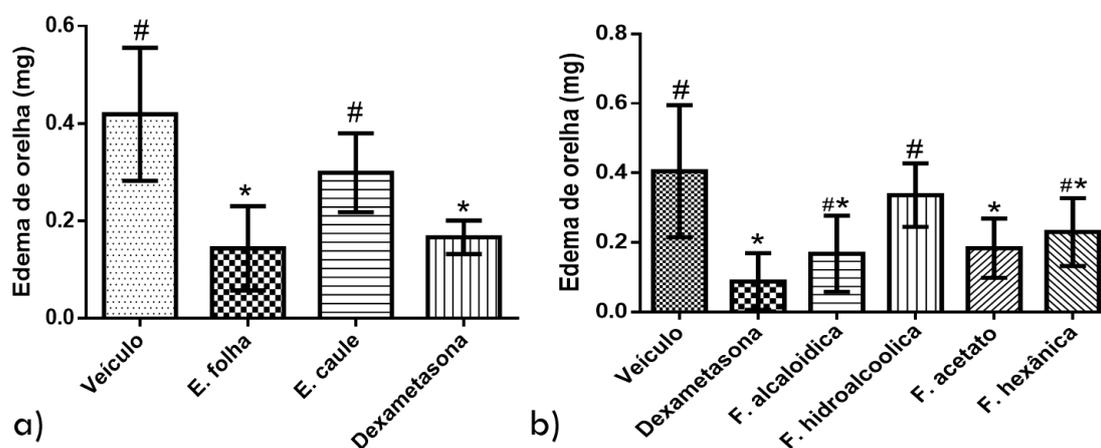


Figura 11 - Ensaio edema de orelha para: a) E. do caule e da folha, b) para as frações: alcaloídica, hidroalcoólica, acetato e hexânica para as folhas. E seus respectivos controles: veículo (controle negativo) e dexametasona (controle positivo). As amostras foram testadas com uma concentração de 0.5 mg por orelha. Os resultados foram analisados por ANOVA one-way seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunnett e expressos como média \pm EMP, os símbolos diferentes sugerem diferenças estatísticas com $p \leq 0,05$.

Fonte: Do autor

As frações obtidas a partir do extrato bruto das folhas também foram avaliadas, já que este extrato apresentou uma significativa atividade anti-inflamatória, pelo ensaio do edema de orelha.

Observou-se que a dexametasona inibiu 78% do edema de orelha, enquanto a fração acetato inibiu 55%. Além disso, foi possível constatar que para a fração hidroalcoólica não houve diferença estatística, em relação ao controle negativo, enquanto a fração acetato não diferenciou estatisticamente do controle positivo, a dexametasona, Figura 11b. As frações alcaloídica e hexânica não diferenciaram estatisticamente do controle positivo nem do controle negativo, não sendo possível classificá-las como sendo inibidoras do edema de orelha. Desta forma, elas não foram consideradas como anti-inflamatórias nas análises estatísticas multivariadas supervisionadas dos dados metabolômicos. Assim sendo, ficou evidente que o extrato da folha e a fração acetato de etila inibiram significativamente a

formação do edema de orelha, ao passo que a fração hidroalcoólica e o extrato do caule não inibiram a inflamação induzida pelo óleo de cróton.

5.2.2 Ensaio de MPO

O ensaio de MPO é verificado através da reação entre a 3,3',5,5' tetrametilbenzina (TMB) com o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A MPO é responsável por catalisar a reação. O TMB é incolor e, ao reagir, é percebida a formação de uma mudança na coloração, que se torna azul, devido a formação do produto 3,3',5,5'-tetrametilbenzina-diimina,

Figura 12 (KETTLE; WINTERBOURN, 1994). Ao se adicionar ácido para paralisar a reação, a coloração torna-se amarela. A concentração da enzima é proporcional à absorbância, em 450 nm.

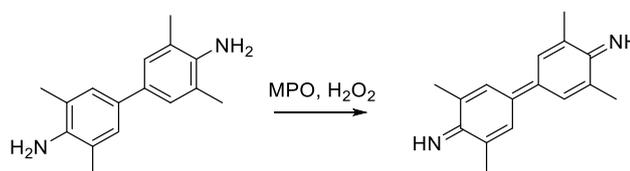


Figura 12 - Oxidação da 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina a 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina-diimina.

Fonte: Do autor

O extrato do caule não demonstrou diferença estatística do controle negativo, ou seja, a quantidade de mieloperoxidase estava alta e similar nessas duas amostras. A absorbância foi de 19,3% no caule e de 20,4% no controle negativo. Já o extrato da folha (15,2%) e o controle positivo (dexametasona; 14,13%) apresentaram quantidade de mieloperoxidase diferente, estatisticamente, do controle negativo, Figura 13a. A fração acetato de etila obteve um valor de 24,08 % de absorbância da enzima MPO, bem próximo do fármaco de referência, dexametasona (23,5%). Portanto, o valor de absorbância da enzima nestas amostras estava menor quando comparado ao do controle negativo (53,4%). As frações alcaloídica, hexânica e hidroalcoólica demonstraram altas concentrações da enzima (todos com absorbância média > 0,3) nos fragmentos de tecido analisados Figura 13b.

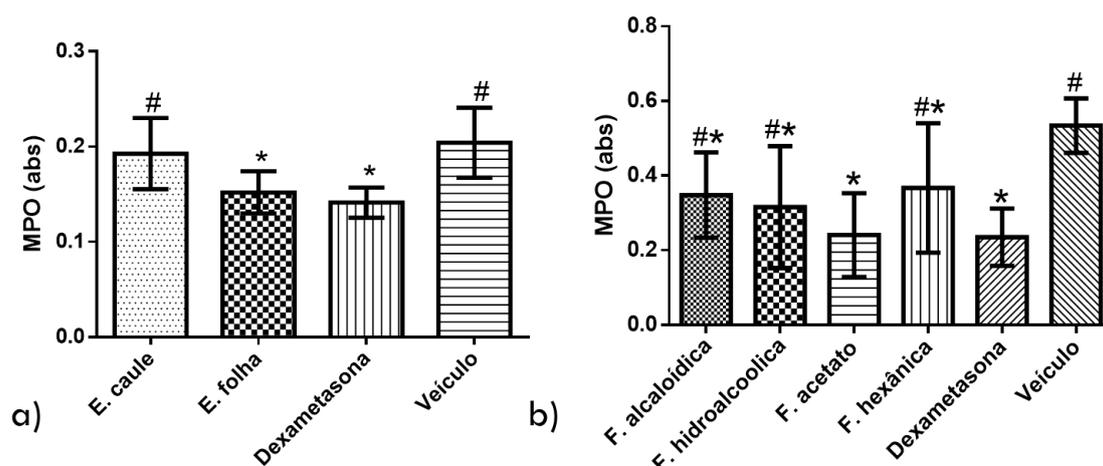


Figura 13 - Resultados da quantificação de MPO no sítio da inflamação. a) E. do caule e da folha, b) frações: alcaloídica, hidroalcoólica, acetato de etila e hexânica. E seus respectivos, controle negativo (veículo) e controle positivo (dexametasona). As amostras foram testadas com uma concentração de 0.5 mg por orelha. Os resultados foram analisados por ANOVA *one-way* seguido pelo teste de comparação múltipla de *Dunnett* e expressos como média \pm EMP, os símbolos diferentes sugerem diferenças estatísticas com $p \leq 0,05$.

Fonte: Do autor

Além disso, não foi possível diferenciar estatisticamente, as frações alcaloídica, hidroalcoólica e hexânica obtidas a partir do extrato bruto da folha do controle negativo (veículo) nem do controle positivo (dexametasona). Desta forma, pode-se afirmar que não foi possível definir o potencial destas amostras quanto à capacidade de inibir a migração de neutrófilos.

Já para a fração acetato, o teste foi conclusivo, mostrando a inibição da atividade da enzima MPO, já que o seu resultado foi estatisticamente igual ao do fármaco de referência, dexametasona, e diferente do controle negativo. Essa diminuição da MPO indica que poucos neutrófilos foram recrutados, demonstrando uma possível inibição da via LOX (CHAGAS-PAULA et al., 2011; SARAIVA et al., 2011).

Através desses ensaios, pode-se afirmar que o extrato bruto da folha e a fração acetato são potencialmente inibidores das duas vias, COX e LOX, já que ambos apresentaram inibição do edema de orelha, indicado pela redução do edema, fator este relacionado com a via da COX. Também inibiram o recrutamento de neutrófilos, uma vez que foi quantificada menor quantidade da enzima MPO no sítio da inflamação que, por sua vez, está diretamente relacionado com a via da LOX (CHAGAS-PAULA et al., 2011; SARAIVA et al., 2011).

5.3 METABOLÔMICA

Foram analisadas 11 amostras, extrato bruto da casca (EBC), extrato bruto da folha (EBF), replicata biológica do extrato bruto da casca (REBC), a partir do material vegetal de outro indivíduo da mesma espécie), replicata biológica extrato bruto da folha (REBF), fração acetato de etila da folha (FAF), fração acetato de etila da casca (FAC), fração alcaloídica da folha (FALF), fração alcaloídica da casca (FALC), fração hidroalcoólica da folha (FHF), fração hidroalcoólica da casca (FHC) e uma replicata técnica (RTHF, mesma amostra injetada mais de uma vez).

Dessas amostras, foram detectadas 788 substâncias no modo positivo e 1269 substâncias no modo negativo. A quantidade de substâncias detectadas está relacionada com o limiar de intensidade considerado; quanto maior o valor desse limiar da intensidade utilizado, menor o número de substâncias detectadas. Esse parâmetro está relacionado ao corte em relação à linha de base, com a função de retirar ruídos. Além disso, a janela de massa e a janela de tempo de retenção também influenciam no número de substâncias detectadas. Isso permite que substâncias com erro de massa de até 0,05 ppm e com tempo de retenção que diferencie em até 6 segundos sejam consideradas as mesmas substâncias, conforme parâmetros informados durante o processamento de dados.

Posteriormente, os dados tratados e alinhados foram analisados por meio da análise estatística multivariada: PCA. Para os dados do modo positivo e negativo, o modelo que melhor se ajustou foi aquele que não utilizou nenhuma escala e nenhuma transformação. O modelo de PCA dos dados do modo negativo forneceu $R^2X=0,77$ com dois componentes, $R^2X=0,85$ utilizando três componentes para explicar os dados e $R^2X=0,89$ considerando quatro componentes. Para os dados modo positivo obteve-se $R^2X=0,76$ considerando dois componentes, $R^2X=0,84$ ao adicionar mais um componente (total: três componentes) e $R^2X=0,89$ utilizando quatro componentes para explicar a variação dos dados. Considerando que valores de $R^2X>0,5$ indicam que o modelo explica satisfatoriamente os dados de amostras complexas, como a estudos metabolômicos (YULIANA et al., 2013), pode-se afirmar que a qualidade do ajuste dos modelos de PCA foi significativa. Isso pôde ser observado até nos modelos de PCA mais simples, utilizando apenas dois componentes, tanto para os dados do modo negativo quanto positivo de detecção.

A partir do score plot obtido na análise de PCA para os dados do modo negativo, Figura 14b, foi possível observar a formação de dois grupos bem característicos. O primeiro

foi formado por EBF, REBF e FAF (grupo 1 - circulado de vermelho, Figura 14b). Neste grupo, foram agrupadas todas as amostras que apresentaram atividade anti-inflamatória. O outro grupo é substância pelas amostras FHC, EBC, RTFHF, FHF, REBC (grupo 2 - circulado de verde, Figura 14b) que não apresentaram significativa atividade anti-inflamatória. Estes resultados demonstram uma clara diferenciação da propriedade anti-inflamatória das amostras em relação às substâncias presentes nelas, o que pode ser evidenciado mesmo em uma análise estatística não supervisionada. As frações FALF, FALC demonstram ter substâncias diferentes das outras amostras, portanto estas amostras ficaram distantes das demais, fora dos dois grupos principais de amostras. A FAC também não se encaixou em nenhum grupo, porém é notável que ela possui composição química mais próxima das amostras do grupo 2.

A análise de PCA dos dados de UPLC-MS modo positivo, Figura 14, demonstrou que as amostras EBF, REBF, FAF e FALF formam um grupo, circulado em vermelho na Figura 10 a, ou seja, possuem composição química similar. O segundo grupo foi formado pelas seguintes amostras: FHC, EBC, FALF e REBC (circulado em verde na Figura 14a). As amostras FHF, RTFHF e FHC demonstraram composição química distintas das demais e não ficaram próximas de nenhum dos grupos de amostras (Figura 14a). Foi possível observar que, para a análise de PCA dos dados de UPLC-MS modo positivo as amostras se agruparam sem nenhuma relação às propriedades anti-inflamatórias evidenciadas, o que sugere que as substâncias ativas podem ser melhor detectadas no modo negativo.

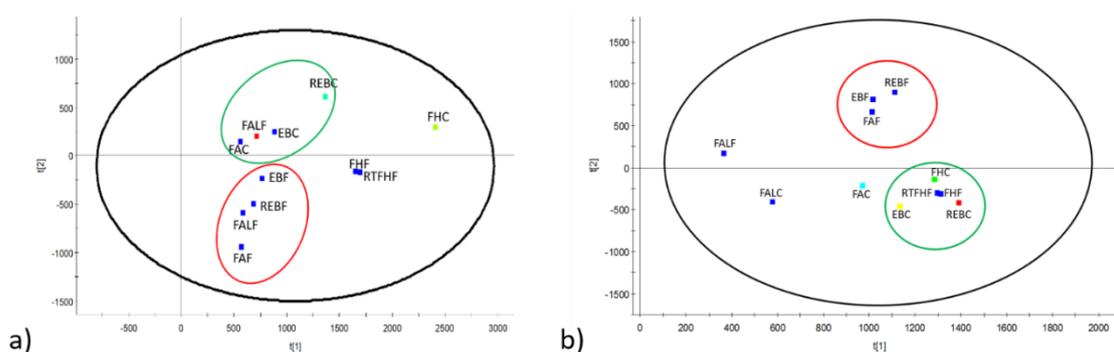


Figura 14 - Score plot das análises de PCA-X dos dados de UPLC-ESI-TOF das amostras dos extratos brutos e das frações de *O. diospyrifolia*. a) no modo positivo usando PC1 x PC2 obtida pelo software Markerlynx 3.0.1. $R^2X=0,76$ e b) no modo negativo usando PC1 x PC2 obtida pelo software Markerlynx 3.0.1. $R^2X=0,77$.

Fonte: Do autor

Ainda com relação à Figura 14, é possível observar que as replicatas técnicas estão muito próximas entre si (RTFHF e FHF), o que significa que as análises de UPLC-ESI-TOF foram reprodutíveis e o tratamento dos dados foi adequado.

Após a análise de PCA, foi realizada análise estatística dos dados da composição química suportada pelos resultados dos ensaios anti-inflamatórios. Neste estudo, as amostras FAF e EBF foram ditas como inibidoras do processo inflamatório (I) das vias COX e LOX, enquanto as amostras EBC, FALF, FHF foram ditas como não inibidoras (NI). O modelo estatístico treinado com os dados de algumas das amostras (EBF, EBC, FAF, FALF e FHF, amostras treino) pode ser validado para prever a capacidade de outras amostras se comportarem de maneira semelhante a elas, de acordo com as substâncias de sua composição.

Como controle para validação do modelo, utilizaram-se as replicatas biológicas e técnicas, amostras teste. No modo positivo, Tabela 1, a predição foi feita conforme esperado, as replicatas foram classificadas corretamente, além disso, de acordo com as semelhanças das substâncias em suas composições, o software classificou todas as frações da casca (FAC, FALC e FHC) como NI.

No modo negativo, Tabela 1, a amostra REBF foi classificada como não se encaixando em nenhuma das classes treinadas. De fato, ao analisar os resultados da PCA para o modo negativo, observa-se que, mesmo estando perto das amostras com atividade, existe uma diferença, portanto pode apresentar uma atividade anti-inflamatória intermediária. Sabe-se que o local em que uma planta é coletada pode influenciar nos metabólitos presentes na mesma e na sua concentração, já que as condições às quais as plantas são submetidas, como uma maior ou menor incidência de luz, radiação ultravioleta e temperatura de crescimento, influenciam na composição metabólica (RAMAKRISHNA; RAVISHANKAR, 2011). Então, isso parece explicar o resultado obtido pelo modelo de predição.

Tabela 1 - Resultados de predição dos modelos de PLS-DA treinado com dados de UPLC-ESI-TOF, modo positivo e modo negativo.

Identificação	Atividade Biológica	Classificação Modo positivo	Classificação Modo negativo	Classificação indefinida Modo negativo
EBF	I	I	I	
EBC	NI	NI	NI	
FAF	I	I	I	
FALF	NI	NI	NI	
FHF	NI	NI	NI	
RTFHF		NI	NI	
REBF		I		NI, I
REBC		NI	NI	
FAC		NI	NI	
FALC		NI	NI	
FHC		NI	NI	

I: Inibição do processo inflamatório; NI: Não inibição do processo inflamatório.
Fonte: Do autor

Ao observar os resultados de PLS-DA, é possível extrair informações, como a qualidade do ajuste do modelo (R²X) e a qualidade da predição do modelo (Q²X). Os resultados na PLS-DA expõem nos gráficos apenas as amostras em que são informadas as atividades biológicas. Dessa forma, os cálculos da qualidade do modelo e predição foram realizados com base apenas em cinco amostras. Para o modelo construído com os dados de UPLC-ESI-TOF modo positivo, com dois componentes, obteve-se R²X=0,99 e Q²X=0,91. No modelo treinado com dados de UPLC-ESI-TOF modo negativo, também com dois componentes apenas, obteve-se R²X=0,99 e Q²X=0,82. Estes resultados de R² e Q² indicam que os modelos estão bem ajustados e possuem bom poder e robustez para predição, visto que apresentam valores de R²X e Q²X > 0,5, respectivamente (YULIANA et al., 2013). Não foi necessário utilizar outro modelo estatístico de predição mais complexo, como o OPLS, pois o PLS-DA foi suficiente, estando de acordo com o princípio da parcimônia e menos propenso a um super ajuste e predições errôneas (HAWKINS, 2004).

No modo positivo é possível observar a formação de dois grupos, um formado pelas amostras: EBF e FAF, inibidoras da inflamação; e o outro grupo formado por EBC e FHF, as amostras que não inibiram a inflamação. Observa-se que a amostra FALF ficou afastada

desses dois clusters, demonstrando possuir diferenças entre esses dois grupos de amostras (Figura 15). Para o modo negativo observam-se dois grupos, um formado pelas amostras EBF e FAF e o outro formado por EBC, FALF e FHF (Figura 15).

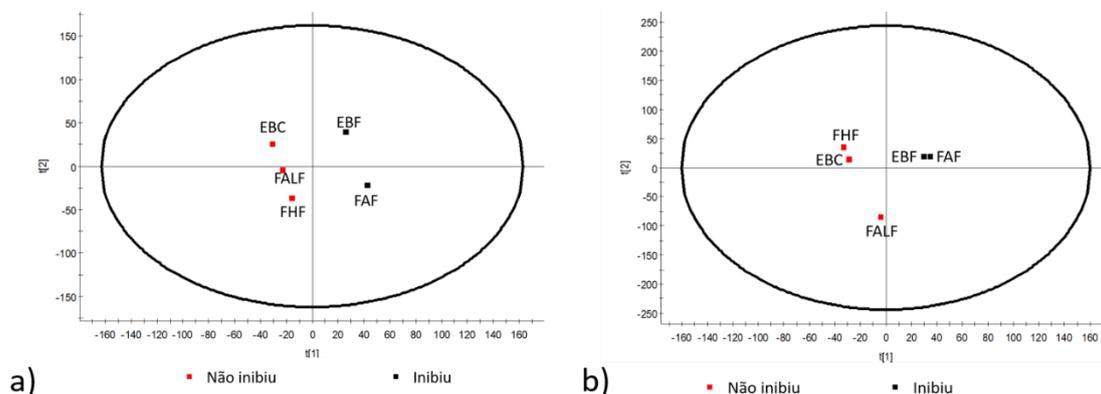


Figura 15 - Análise PLS-DA para a distribuição dos extratos e das frações da *Ocotea diospyrifolia* de acordo com a atividade anti-inflamatória. Para a) Modo negativo $R^2X=0,99$ e $Q^2X=0,82$ b) Modo positivo $R^2X=0,99$ e $Q^2X=0,91$.

Fonte: Do autor

Outra informação que é possível obter dos modelos de PLS-DA construídos são as VIP. Foi sugerido para o modo positivo 152 substâncias com VIP maior que 1, Figura 16, e para o modo negativo, 119 substâncias (Figura 16). A partir desses VIPs >1 , foi possível observar as substâncias que contribuem positivamente e quais contribuem negativamente para a inibição, Figura 17, através do coeficiente de correlação das variáveis X (substâncias) com as variáveis Y (classes, no caso I e NI). Desta forma, foram selecionadas as substâncias com valores de VIP maiores que 1.5 e que se correlacionavam positivamente com a inibição da inflamação. No modo positivo, foram selecionadas 18 substâncias e no modo negativo, 21 (Figura 17).

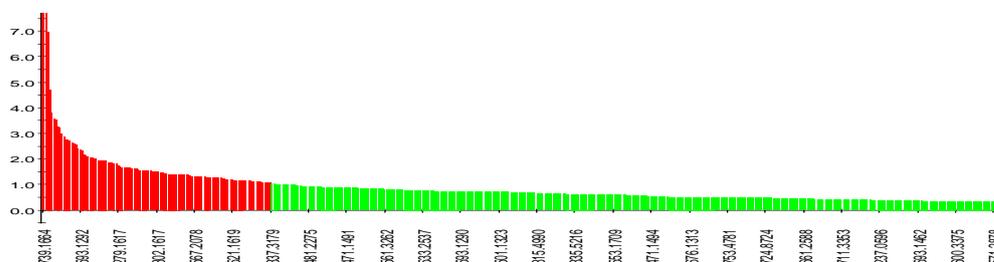


Figura 16 - VIPs para o modo negativo que correlacionam com a atividade anti-inflamatória dos extratos e frações *Ocotea diospyrifolia*. Em vermelho $VIP > 1,0$.

Fonte: Do autor.

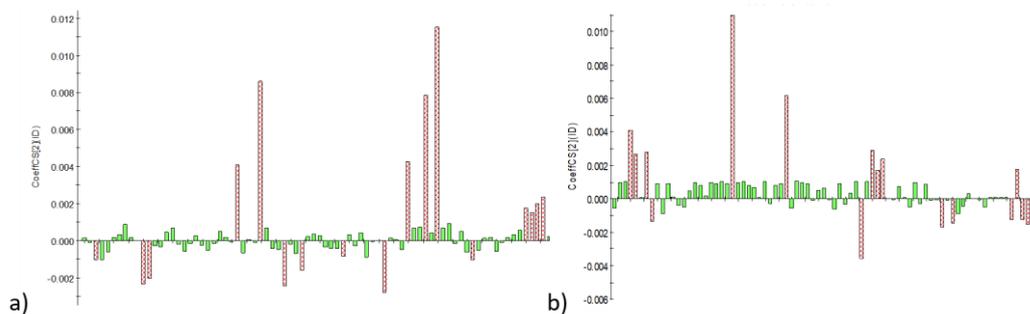


Figura 17 - Visão geral dos coeficientes de correlação das substâncias dos extratos e frações da *Ocotea diospyrifolia* com a atividade anti-inflamatória – ID (apenas parte do gráfico). As barras para cima indicam as substâncias que se correlacionam positivamente com as atividade anti-inflamatória ID e para baixo as que se correlacionam negativamente com esta propriedade. Em vermelho estão marcadas as VIP > 1,0. Para a) dados obtidos no modo positivo e b) no modo negativo.

Fonte: Do autor.

Foram desreplicadas no modo positivo 18 substâncias (Tabela 2). Dessas, 12 não apresentaram hits, sendo provavelmente inéditas. As outras seis substâncias apresentaram hit nos bancos de dados pesquisados. No modo negativo, Tabela 3, foram desreplicadas 21 substâncias; 15 não apresentaram hit nos bancos de dados, sendo potencialmente inéditas. As outras seis apresentaram hit, como exemplo, a substância com VIP igual a 9,4 e fórmula molecular $C_{39}H_{32}O_{14}$. Essa substância apresentou 24 hits, ou seja, foram descritas 24 substâncias com essa fórmula molecular. Um dos hits é referente à apigenina-7-O- β -D-(-6''-p-coumaroil-glucapiranosídeo), Figura 18, um substância encontrado em plantas medicinais como a "*Clematis tangutica*", descrita na literatura como um substância com propriedade antioxidante (CAI et al., 2016), além de ter apresentado atividade em ensaios de atividade anti-inflamatória (WANG et al., 2015).

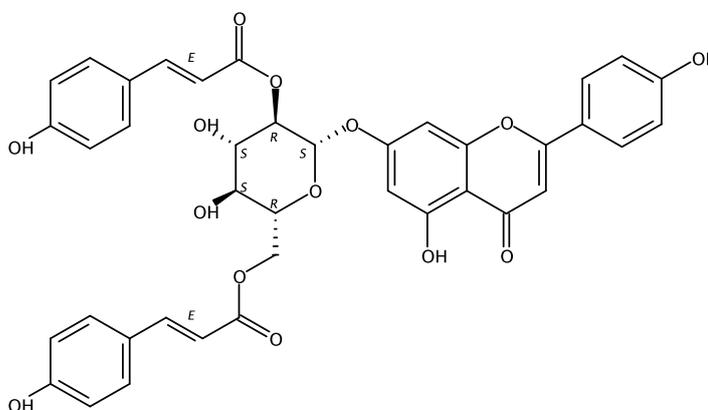


Figura 18 - Estrutura da apigenina-7-O- β -D-(-6''-p-coumaroil-glucapiranosídeo), exemplo de substância com formula molecular $C_{39}H_{32}O_{14}$.

Fonte: SciFinder/CAS

Tabela 2 - Desrepliação para o modo positivo, os hits foram pesquisados nos bancos de dados: Banco de dados *in house* de *Ocotea*/ KNApSAcK DB/DNP.

(Continua)

Identificação	<i>m/z</i>	RT	Erro (ppm)	Aduto	VIP	[M+H] ⁺	Hits
719	653,2697	8,7	0,3	Na	4,5	C ₃₉ H ₃₀ N ₆ O ₃	0
349	309,1122	3,71	4,8	CH ₃ OH	3,39	C ₁₇ H ₁₁ N ₂ O ₂	0
352	310,1606	3,56	-8,4		2,25	C ₂₂ H ₁₆ NO	1
769	813,5154	9,21	2,5		2,14	C ₄₇ H ₇₃ O ₁₁	3
739	699,3561	6,17	-3		2,12	C ₃₇ H ₄₇ N ₈ O ₆	0
705	629,2388	8,3	0,3		2,11	C ₃₈ H ₂₉ N ₈ O ₂	0
646	551,2665	8,54	-6,4	K	2	C ₃₆ H ₃₆ N ₂ O	0
666	591,2617	8,82	-2,1	NH ₄	2	C ₃₈ H ₂₉ N ₄ O ₂	0
548	439,1348	5,67	-6,4		1,94	C ₂₄ H ₂₃ O ₈	12
563	455,1348	4,71	-1,5		1,9	C ₂₄ H ₂₃ O ₉	6
564	455,1331	5,02	1,8	NH ₄	1,9	C ₂₂ H ₁₇ N ₂ O ₈	0
772	829,5092	8,84	7,1	CH ₃ CN+Na	1,79	C ₄₅ H ₆₇ NO ₉	0
714	639,2468	7,99	1,4		1,78	C ₃₆ H ₃₁ N ₈ O ₄	0
338	305,1573	8,3	-8,8		1,76	C ₁₄ H ₂₅ O ₇	2
778	845,4985	7,67	-1,7		1,7	C ₅₁ H ₆₁ N ₁₀ O ₂	0
487	362,3268	5,41	5,8		1,63	C ₂₁ H ₄₀ N ₅	0
407	328,1902	3,64	-5,5		1,53	C ₂₀ H ₂₆ NO ₃	26
534	425,1596	5,24	0,5		1,53	C ₂₄ H ₂₅ O ₆	0

Fonte: Do autor.

Tabela 3 - Desrepliação para o modo negativo, os hits foram pesquisados nos bancos de dados: Banco de dados *in house* de *Ocotea*/ KNApSAcK DB/DNP.

Identificação	<i>m/z</i>	RT	Erro	Aduto	VIP	[M-H] ⁻	Hits
988	723,1713	5,63	1,2		9,4	C ₃₉ H ₃₁ O ₁₄	24
1020	739,1662	4,4	1,4		6,97	C ₃₉ H ₃₁ O ₁₅	17
770	593,1294	3,95	-6,1		3,8	C ₃₃ H ₁₃ N ₁₂ O	0
810	605,2403	8,26	-4,1		3,57	C ₄₀ H ₃₃ N ₂ O ₄	0
138	309,2046	6,04	-3,9		3,51	C ₁₈ H ₂₉ O ₄	30
1210	901,2201	4,07	-4,9		3,29	C ₄₉ H ₂₅ N ₁₆ O ₄	0
914	659,1767	3,9	-4,7		3,23	C ₃₈ H ₁₉ N ₁₂ O	0
984	721,4666	7,66	-0,6		2,97	C ₄₄ H ₆₅ O ₈	2
1209	901,2197	4,38	-2,6		2,75	C ₄₈ H ₂₉ N ₁₂ O ₈	0
1215	903,2147	3,35	0,1		2,54	C ₅₀ H ₃₁ N ₈ O ₁₀	0
769	593,1292	4,08	4		2,37	C ₃₂ H ₁₇ N ₈ O ₅	0
1223	917,2357	2,95	-3,7		2,34	C ₄₆ H ₂₉ N ₁₆ O ₇	0
585	529,2237	8,27	-7		2,12	C ₃₈ H ₂₉ N ₂ O ₁	0
1078	769,1775	5,74	2		2,11	C ₃₈ H ₂₁ N ₁₄ O ₆	0
1053	757,1776	3,98	1,7		2,06	C ₃₉ H ₃₃ O ₁₆	2
1046	755,1824	3,65	-3,6		1,96	C ₃₉ H ₂₃ N ₁₂ O ₆	0
1211	901,2286	3,05	4,9		1,94	C ₄₉ H ₂₉ N ₁₀ O ₉	0
1043	755,1612	4,49	-3,3		1,66	C ₄₁ H ₂₃ N ₈ O ₈	0
1045	755,1822	3,45	4,4		1,63	C ₄₅ H ₂₃ N ₈ O ₅	0
513	497,108	3,73	-1,2		1,58	C ₂₅ H ₂₁ O ₁₁	13
1111	799,4152	7,84	6,4		1,51	C ₃₈ H ₅₁ N ₁₄ O ₆	0

Fonte: Do autor.

A partir das substâncias verificadas nos bancos de dados, foi possível observar quais substâncias já foram descritos isolados em algum gênero ou na família da *O. diospyrifolia*, sendo que a substância com identificação 988 e fórmula molecular C₃₉H₃₂O₁₄, foi descrito na literatura para o isolamento do Kaempferol 3- (3", 4" - di-*p*-cimilariilmarnósido) e Kaempferol 3- (2", 4" - di- (E) -*p*-cumaliltranósido (Figura 19) a partir da *Ocotea vellosiana* e do *Laurus nobilis*, pertencentes à família da *O. diospyrifolia*.

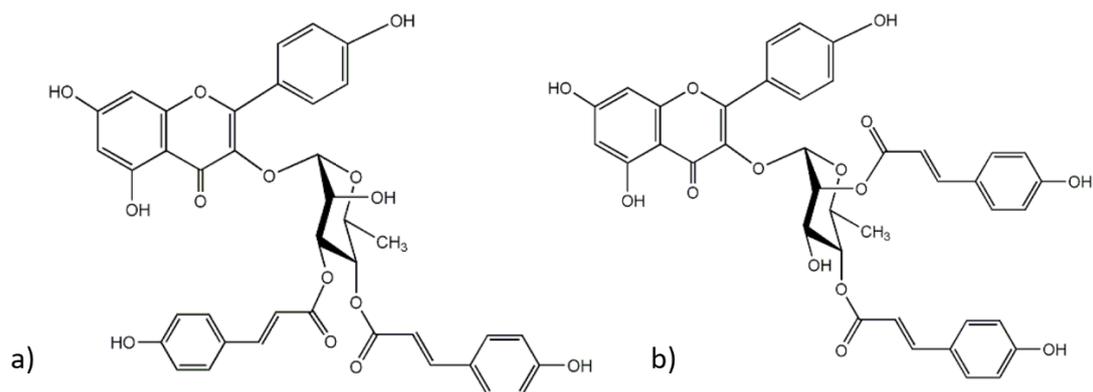


Figura 19 - a) Kaempferol 3- (3'', 4'' - di-p-cimilarnósido) e b) Kaempferol 3- (2'', 4'' - di- (E) - p-cumaliltranósido).

Fonte: Scifinder

5.4 FITOQUÍMICA

5.4.1 Fração acetato de etila das folhas

A fração acetato de etila foi a escolhida para o processo de isolamento, devido aos resultados obtidos na atividade anti-inflamatória. Na primeira separação obteve-se 10 subfrações (Tabela 4).

Tabela 4 - Frações obtidas a partir da fração acetato de etila das folhas, suas respectivas massas e rendimentos.

Fração	Massa (g)	Rendimento (%)
FAF-1	0,9160	8,00
FAF-2	0,1796	1,57
FAF-3	0,3081	2,69
FAF-4	0,3121	2,73
FAF-5	0,2440	1,96
FAF-6	1,7538	15,32
FAF-7	1,0298	9,00
FAF-8	0,1350	1,18
FAF-9	2,2288	19,47
FAF-10	1,0298	16,69

Fonte: Do autor.

A fração FAF-7 foi escolhida para o isolamento devido a seu a seu rendimento e o seu perfil cromatográfico. A partir do processo de separação utilizado (separação por extração em fase sólida) foram obtidas 8 subfrações (FAF-7.1 a FAF 7.8). A fração FAF-5 possuía apenas

um pico majoritário, sendo purificado no HPLC, obtendo-se a substância **1** com uma massa de 7,2 e rendimento de 28,35%.

A fração FAF-8 foi separada, obtendo-se 5 subfrações. A subfração FAF 8.2, que apresentou uma massa de 181 mg, foi submetida ao processo de separação no HPLC-UV-DAD, obtendo-se 9 subfrações (Tabela 5). Dessa fração, isolaram-se três substâncias: substância **2**, com massa de 7,2 mg e rendimento de 3,98%; substância **3**, com massa de 5,9 mg e rendimento de 3,26%; e substância **4**, que apresentou massa de 0,8 mg e rendimento de 0,44%. Essas substâncias foram analisadas no RMN e no EM, para a sua elucidação estrutural.

Tabela 5 - Frações obtidas a partir da FAF-9, suas respectivas massas e rendimentos.

Fração	Massa (mg)	Rendimento (%)
FAF-8.2.1	5,40	2,98
FAF-8.2.2	12,0	6,63
FAF-8.2.3	5,90	3,26
FAF-8.2.4	9,10	5,03
FAF-8.2.5	5,90	3,26
FAF-8.2.6	7,60	4,20
FAF-8.2.7	7,20	3,98
FAF-8.2.8	8,70	4,81
FAF-8.2.9	0,80	0,44

Fonte: Do autor.

5.4.2 Fração alcaloídica do caule (FALC)

A fração FALC foi separada utilizando Sephadex L20. A partir dessa separação, foram obtidas 18 frações (Tabela 6). A fração FALC-3 (42,1 mg) com rendimento de 17,23% foi separada, obtendo-se 4 subfrações. A subfração 1 estava pura, sendo referente a substância **5** (4,2 mg), com um rendimento de 9,98%. Posteriormente utilizando a fração FALC-6 (21,3 mg) com um rendimento de 8,72%, por meio do HPLC, obteve-se 7 subfrações, sendo que a subfração 2 estava-pura, referente a substância **6** (8,0 mg), com um rendimento de 37,56%.

Os substâncias **7** (2 mg), **8** (2,6 mg) e **9** (1,8 mg), que apresentaram rendimentos de 10,58%; 13,76%; 9,52% e 28,57 %, respectivamente (cálculo a partir da fração FALC-11),

foram isolados a partir da fração FALC-11 (18,9 mg), que apresentou um rendimento de 7,73% em relação ao extrato bruto.

Tabela 6 - Frações obtidas a partir da FALC, suas respectivas massas e rendimentos.

Fração	Massa (mg)	Rendimento (%)
FALC-1	16,50	6,70
FALC-2	14,30	5,85
FALC-3	42,10	17,23
FALC-4	15,70	6,42
FALC-5	12,50	5,11
FALC-6	21,30	8,72
FALC-7	17,40	7,12
FALC-8	2,60	1,06
FALC-9	8,70	3,56
FALC-10	4,00	1,64
FALC-11	18,90	7,73
FALC-12	13,20	5,40
FALC-13	6,30	2,58
FALC-14	4,70	1,92
FALC-15	6,30	2,58
FALC-16	4,70	1,92
FALC-17	6,30	2,58
FALC-18	4,70	1,92

Fonte: Do autor.

As substâncias isoladas foram então identificadas, utilizando RMN unidimensional (^1H e ^{13}C) e bidimensional e EM.

5.5 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL

5.5.1 Substância 1- Mururina A

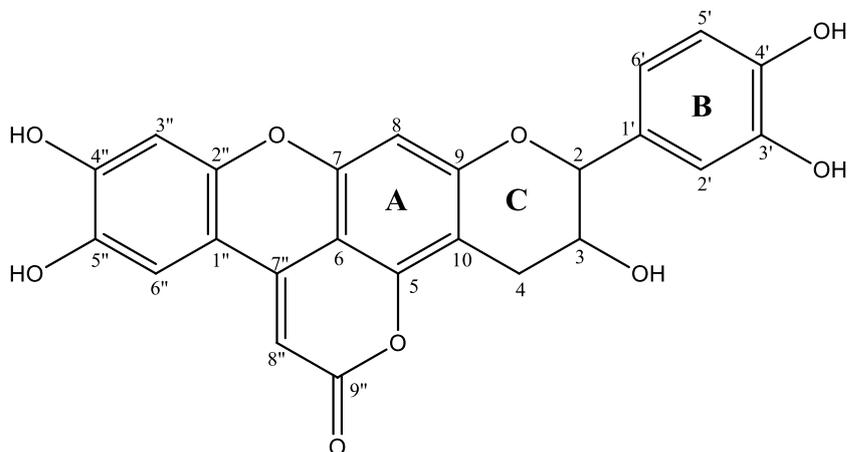


Figura 20 - Substância 1- Mururina A
Fonte: Do autor.

Para a substância **1**, Figura 20, observou-se 11 hidrogênios no espectro de RMN de ^1H . Observa-se o anel aromático B, trissubstituído, sendo referente a esse anel 3H com os δ entre 6,6 e 6,7. Um sinal multipletto com $\delta_{\text{H-4}}$ 2,7- 2,8, esse sinal integra para 2, sendo referente a dois hidrogênios metilênico. Dois sinais que integram para 1, sendo referente a dois hidrogênios metínicos, um sinal dubleto com $\delta_{\text{H-2}}$ 4,9, sendo a constante de acoplamento entre os H-2 e H-3 de 6,5 Hz, e outro sinal multipletto com $\delta_{\text{H-3}}$ 4,1 (ANEXO 1 ANEXO 1).

Para o RMN de ^{13}C , observam-se 24 carbonos, $\delta_{\text{C-4}}$ 26,2; referente a um carbono metilênico. Os $\delta_{\text{C-3}}$ 65,2 e $\delta_{\text{C-2}}$ 82,2 são os deslocamentos referentes aos dois carbonos metínicos. Os demais sinais podem ser verificados na Tabela 7, onde os carbonos e seus respectivos hidrogênios foram agrupados com as correlações observadas no HSQC (ANEXO 2 E ANEXO 3).

Através do HMBC, observou-se correlação entre o hidrogênio metilênico com $\delta_{\text{H-4}}$ 2,7 com o carbono com $\delta_{\text{C-10}}$ 103,8; do hidrogênio metínico com $\delta_{\text{H-2}}$ 4,9 acoplado com os carbonos com $\delta_{\text{C-4}}$ 26,2; $\delta_{\text{C-3}}$ 65,2; $\delta_{\text{C-2}}$ 114,5, $\delta_{\text{C-6}}$ 118,4 e $\delta_{\text{C-1'}}$ 129,9, indicando a formação do fragmento formado pelos anéis A, B e C (ANEXO 4) Ao ser comparado com dados na literatura, esse fragmento assemelha-se à catequina.

Na região dos hidrogênios de anel aromático observou-se dois sinais simpletos com $\delta_{\text{H-3''}}$ 6,7 e $\delta_{\text{H-6''}}$ 7,3, ambos integram para 1, esses hidrogênios apresentam um único pico

(simpleto), sugerindo que esses hidrogênios 3'' e 6'' não acoplam entre si, nem com outros hidrogênios. Utilizando o HMBC, pode-se verificar que esses hidrogênios estão presentes em um mesmo anel aromático devido a correlação entre, $\delta_{H-6''}$ 7,3 com os carbonos que apresentam $\delta_{C-1''}$ 106,3; $\delta_{C-2''}$ 152,2; $\delta_{C-4''}$ 147,2 e $\delta_{C-5''}$ 144,3. E $\delta_{H-3''}$ 6,7 com $\delta_{C-2''}$ 152,2 e $\delta_{C-4''}$ 147,2.

Além disso, observa-se dois sinais de hidrogênio, referentes a anéis aromáticos com δ_{H-8} 6,6 e $\delta_{H-8''}$ 6,1, ambos simpletos e presentes em anéis diferentes, já que não se observa correlações no HMBC desses dois hidrogênios. O sinal δ_{H-8} 6,6 apresenta correlação com δ_{C-7} 149,1 e δ_{C-9} 158,3 referente ao hidrogênio do anel A. No HMBC o sinal $\delta_{H-8''}$ 6,1 correlaciona com os $\delta_{C-1''}$ 106,3 e $\delta_{C-9''}$ 161,2 formando outro anel da estrutura, a correlação entre $\delta_{H-8''}$ 6,1 com δ_{C-6} 100,1 indica que este anel está ligado ao anel ABC.

Os fragmentos obtidos foram então agrupados de acordo com as correlações obtidas no HMBC. Com base nos fragmentos, foi possível elucidar a estrutura da substância **1**, sendo ela a mururina A, que possui fórmula molecular $C_{24}H_{16}O_9$. Esta substância é uma flavonolignana com anéis aromáticos altamente condensados, sendo que na sua constituição contém parte da molécula formada pela catequina (ou epicatequina) e a outra parte pelo ácido caféico, através de acoplamento oxidativo (TAKASHIMA; ASANO; OHSAKI, 2002).

Essa substância foi isolada pela primeira vez a partir da espécie *Brosimum acutifolium* Huber (Moraceae), conhecida popularmente como mururé, utilizada na medicina popular como anti-inflamatório e antirreumático. Foram isoladas mururina A e B, substâncias que possuem diferenças na estequiometria do C-2 e C-3. Foi possível identificar a substância **1** como mururina A, isso pode ser observado através do valor da constante de acoplamento, para a Mururina A o valor de J é 6,8 Hz demonstrando que os hidrogênio dos C-2 e C-3 estão na posição *trans* (derivado da catequina), ao contrário, a mururina B, apresenta as constantes de acoplamento para C-2 e C-3 com valores de $J < 1$ Hz, demonstrando que o H está na posição *cis* (derivado da epi-catequina), (TAKASHIMA; ASANO; OHSAKI, 2002).

Estudos *in vitro* sobre a mururina A e B indicam que elas apresentam atividade inibitória para as proteínas quinase A (PKA) e proteína quinase C (PKC) (Proteínas relacionadas a atividade anti-inflamatória), sendo que a estequiometria dos substâncias interferem na atividade, sendo o mururina B, parece ter apresentando melhor inibição desta enzimas em específico (TAKASHIMA; ASANO; OHSAKI, 2002).

Tabela 7 - Deslocamentos químicos (δ), multiplicidade dos sinais e a constante de acoplamento (J) em Hz, obtidos a partir de espectros de RMN de ^1H e RMN de ^{13}C experimental (300 MHz ^1H , 75 MHz ^{13}C , DMSO d_6) da Mururina A.

Posição	Experimental		(TAKASHIMA, ASANO, OHSAKI, 2002)	
	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$
2	4,9 (d, $J_{2-3}:6,5$)	82,1	4,9 (d, $J: 6,8$)	83,3
3	4,1 (m)	65,2	4,2 (m)	66,9
4	2,7-2,8 (m)	26,2	2,8 (dd, $J: 16.5; 7.7$ e 3,0 (dd, $J: 16.5; 7.7$)	28,7
5	-	153,4	-	153,3
6	-	100,1	-	100,9
7	-	149,1	-	150,1
8	6,6 (s)	97,6	6,6 (s)	98,0
9	-	158,3	-	159,3
10	-	103,9	-	104,6
1'	-	129,9	-	131,2
2'	6,7 (sl)	114,5	7,1 (d, $J:1.8$)	116,0
3'	-	145,6	-	146,0
4'	-	145,5	-	145,8
5'	6,7 (d, $J_{5'-6'}:$ 8,1)	115,8	6,8 (d, $J: 8.1$)	116,0
6'	6,6 (dl, $J_{5'-6'}:$ 8,1)	118,4	6,9 (dd, $J:8.1; J:1.8$)	119,7
1''	-	106,3	-	108,1
2''	-	152,2	-	152,3
3''	6,7 (s)	103,6	6,8 (s)	104,4
4''	-	147, 2	-	148,1
5''	-	144,3	-	144,2
6''	7,3 (s)	109,3	7,4 (s)	109,6
7''	-	142,0	-	142,5
8''	6,1 (s)	92,2	6,1 (s)	93,4
9''	-	161,6	-	161,9

Fonte: Do autor.

5.5.2 Substância 2: Ácido 5-O-caffeoilquínico

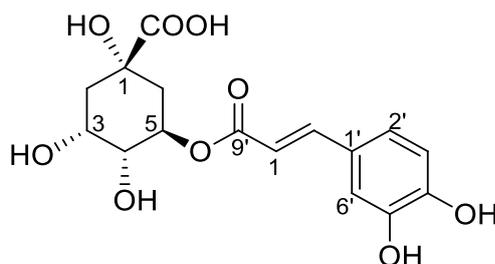


Figura 21 - Substância 2- Ácido 5-O-E-caffeoilquínico

Fonte: Do autor.

Para a substância **2**, Figura 21, no espectro de RMN de ^1H , observou-se os sinais com $\delta_{\text{H-6}}$ 7,0 (d; J: 2,0 Hz); $\delta_{\text{H-3}}$ 6,8 (d; J: 8,0 Hz) e $\delta_{\text{H-2}}$ 7,0 (dd; J: 8,0 e 2,0 Hz), são referentes a hidrogênios com deslocamento típico de anel aromático, suas multiplicidades e constante de acoplamento sugerem que o anel aromático é trissubstituído com o padrão indicado na Figura 21 (ANEXO 5). Além disso, os sinais em $\delta_{\text{H-8}}$ 6,2 e $\delta_{\text{H-7}}$ 7,4 são referentes a hidrogênios de uma dupla ligação. Esses dois hidrogênios possuem um J_{7-8} : 15,90 Hz. Este valor de constante indica que os hidrogênios estão com uma configuração trans.

O sinal $\delta_{\text{H-5}}$ 5,1 é referente a um hidrogênio metínico, o sinal é um quarteto, com constante de acoplamento J_{5-4} : 6,9 Hz. Essa constante indica que os hidrogênios de 4 e 5 estão um na axial e outro na equatorial. Pode-se observar também dois hidrogênios metínicos com $\delta_{\text{H-6}}$ 1,9 (multipletto) e outro com $\delta_{\text{H-3}}$ 3,9, sendo um tripleto largo; dois hidrogênios metilênicos, um com $\delta_{\text{H-2}}$ 2,0 dubleto, com constante de acoplamento J_{2a-2b} : 13,2 indicando o acoplamento geminal entre esses hidrogênios e outro hidrogênio com $\delta_{\text{H-2}}$ 1,8 duplo dubleto, com constantes de acoplamento de J_{2a-2b} : 13,2 Hz e J_{2-3} : 8,0 Hz, este valor também indica que os hidrogênios estão na axial-axial. Outro sinal de hidrogênio metilênicos com $\delta_{\text{H-4}}$ 3,6; duplo dubleto, com J_{5-4} : 6,9 Hz e J_{4-3} : 3,3 Hz. Essa constante de acoplamento indica que os hidrogênios 4 e 3 estão na posição equatorial-equatorial.

No espectro de RMN de ^{13}C , foi possível observar os sinais de RMN ^{13}C em $\delta_{\text{C-7}}$ 175,5 referentes ao carbono de carbonila do ácido e $\delta_{\text{C-9}}$ 166,3 referente a uma carbonila de éster, sendo possível propor parte da estrutura (ANEXO 6). Desta forma, percebe-se que se tratava de um ácido clorogênico. O restante da elucidação estrutural foi realizado através de comparação com dados de espectro de RMN de ^1H e RMN de ^{13}C encontrado na literatura (Tabela 8).

Tabela 8 - Deslocamentos químicos (δ), multiplicidade dos sinais e a constante de acoplamento (J) obtidos a partir de espectros de RMN de ^1H e RMN de ^{13}C experimental (300 MHz ^1H , 75 MHz ^{13}C , DMSO d_6) e encontrado na literatura (300 MHz ^1H , 75 MHz ^{13}C , D_2O) do Ácido 5-*O*-cafeoilquínico.

Posição	Experimental		(DOS SANTOS et al., 2004)	
	δ ^1H	δ ^{13}C	δ ^1H	δ ^{13}C
1	-	74,1	-	79,9
2	1,8 (dd, J_{2a-2b} 13,2, J_{2a-3} 8,0); 2,0 (d, J_{2a-2b} 13,2)	37,6	2,0 e 2,1 (d; J : 12,0)	40,2
3	3,9 (tl, J_{3-4} 3,3)	68,7	4,3 (d; J : 3,0)	73,8
4	3,6 (dd, J_{4-5} 6,9, J_{4-3} 3,3)	71,0	3,9 (dd; J : 3 e J : 10,5)	75,9
5	5,1 (q; J_{5-4} 6,9)	71,4	5,3 (t, J : 10,5; J : 10,5 e 4,6)	74,2
6	1,9 (m)	36,9	2,2	41,4
7	-	175,5	-	184,0
1'	-	126,0	-	130,1
2'	7,0 (dd, $J_{2'-3'}$ 8,0, $J_{2'-6'}$ 2,0)	121,9	7,1 (dd; J : 8,2 e J : 1,8)	125,7
3'	6,8 (d, $J_{3'-2'}$ 8,0)	116,2	6,9 (d; J : 8,4)	119,3
4'	-	148,8	-	150,2
5'	-	146,0	-	147,4
6'	7,0 (d, $J_{6'-2'}$ 2,0)	114,8	7,2 (d; J : 1,8)	118,2
7'	7,4 (d, $J_{7'-8'}$ 15,9)	145,4	7,6 (d; J : 15,6)	149,2
8'	6,2 (d, $J_{8'-7'}$ 15,9)	115,2	6,3 (d; J : 15,9)	117,8
9'	-	166,3	-	172,3

Fonte: Do autor.

A confirmação da estrutura também foi realizada através de análises feitas no EM-ESI-QTOF (ANEXO 7). A razão m/z obtida foi de 353,0883 no modo negativo, erro: 0,0014 ppm, sugerindo a fórmula $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_9$ para substância de massa teórica 354,3087. Apresentou um fragmento de m/z 191,0564 (pico base, Figura 22). A partir do íon de m/z 353,0853, e não apresentou como fragmento o íon de m/z 179,5 com intensidade intermediária, o que o diferencia do ácido 3-*O-E*-cafeoilquínico. O outro possível isômero seria o ácido 4-*O-E*-cafeoilquínico, mas este apresentaria como pico base a m/z 173,5 proveniente a fragmentação

do íon 353. Os estudos realizados indicaram que o padrão de fragmentação observado é referente ao ácido 5-*O-E*-cafeoilquínico, conforme é bem descrito na literatura (CLIFFORD et al., 2003).

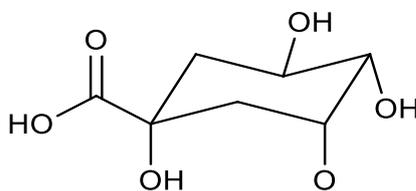


Figura 22 - Fragmento m/z 191,7
Fonte: Do autor.

Estudos *in vitro* demonstram que o ácido 5-*O-E*-cafeoilquínico é eficiente para a inibição das enzimas da via da COX. Além disso, pesquisas apontam que essa substância também inibe a liberação de citocinas e quimiocinas, que estão relacionados ao processo pró-inflamatório (KRAKAUER, 2002; PARK, 2009). Estudos *in vivo* também evidenciaram seus efeitos anti-inflamatórios (CHAGAS-PAULA et al., 2011).

5.5.3 Substância 3: Ester metílico do ácido neoclorogênico

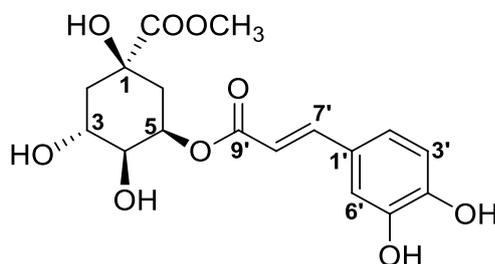


Figura 23 - Substância 3: Ester metílico do ácido neoclorogênico.
Fonte: Do autor

A substância **3**, possui fórmula molecular $C_{17}H_{20}O_9$, é o éster metílico do ácido neoclorogênico, Figura 23, um derivado muito parecido com o ácido clorogênico, mas além da função éster, essa substância possui uma configuração diferente para o açúcar (ZHU et al., 2005). A elucidação estrutural foi realizada utilizando o espectro de RMN de 1H , Tabela 9, onde foi possível observar a presença da metoxila com δ_H 3,5 (ANEXO 8). O sinal apresenta apenas um único pico, simpleto, que integra para 3. Também foi analisado o RMN de ^{13}C , para verificar se os sinais eram compatíveis, notando-se o δ_C em 52,3, referente ao carbono da metoxila (ANEXO 9). Os outros sinais de H e C podem ser verificados na Tabela 9. Através do HMBC, foi possível observar a correlação entre o δ_{H-8} 3,53e e δ_{C-7} em 174,74 carbono referente a carbonila do ácido (ANEXO 10). Os valores de deslocamento obtidos são próximos

aos valores encontrados na literatura, onde o carbono referente à carbonila do ácido possui δ 176,4 e a metoxila possui δ_C 52,8 e δ_H 3,73, em experimentos de RMN de 1H e de ^{13}C (ZHU et al., 2005).

Além disso, observou-se correlação no HMBC entre o δ_C -9' 166,25 e o δ_H -5 5,01, demonstra que essa substância, refere-se ao éster metílico do ácido neoclorogênico, e não a outros possíveis derivados como o éster metílico do ácido criptoclorogênico ou éster metílico do ácido clorogênico (ZHU et al., 2005).

A estrutura também pode ser confirmada por meio da razão m/z , obtida através de análises realizadas no EM. A razão m/z obtida foi de 367,1033 no modo negativo, confirmando a massa teórica esperada para esse substância que seria de 368,3353 g/mol (ANEXO 11). A substância apresentou como padrão de fragmentação as seguintes m/z : 179,0350, e 135,0452, Figura 24.

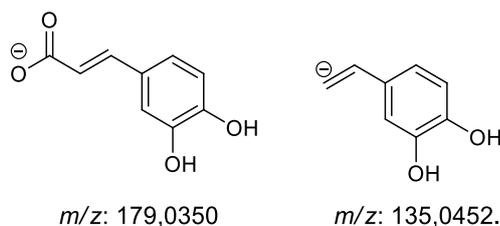


Figura 24 - Padrão de fragmentação da substância **3**.
Fonte: Do autor.

A mesma substância poderia ser obtida através da esterificação do ácido neoclorogênico com um álcool, nesse caso, o metanol. Sendo este tipo de reação considerada possível, porém reação lenta, e que para aumentar a velocidade da reação, seria necessário a utilização de um catalisador, pode ser que **3**, não seja um artefato (GUYOT et al., 1997).

Uma forma de confirmar que essa substância estava presente na amostra inicial e que não é artefato, derivado de uma esterificação, foi verificar se a substância estava presente no extrato bruto, através da busca da sua massa, nos espectros de massas, Figura 29. Como o extrato bruto foi obtido em etanol e não metanol, então pode se descartar a hipótese de ser um artefato e pode se dizer que *O. diospyrifolia* certamente é capaz de biossintetizá-lo. Além disso, ésteres metílico do ácido neoclorogênico, éster metílico do ácido criptoclorogênico e éster metílico do ácido clorogênico já foram isolados de plantas como da *Viburnum cylindricum* (ZHU et al., 2005). Também foi isolado o éster metílico do ácido 4-*O-E*-cafeoilquínico (ou éster metílico do ácido criptoclorogênico) a partir da *Ocotea corymbosa*

(BATISTA et al., 2010). O éster metílico do ácido neoclorogênico foi isolado pela primeira vez em uma *Ocotea*.

Tabela 9 - Deslocamentos químicos (δ), multiplicidade dos sinais e a constante de acoplamento (J) obtidos a partir de espectros de RMN de ^1H e RMN de ^{13}C experimental (300 MHz ^1H , 75 MHz ^{13}C , DMSO *d*-6) e encontrado na literatura (300 MHz ^1H , 75 MHz ^{13}C , D_2O) do Ester metílico do ácido neoclorogênico.

Posição	Experimental		Zhu <i>et al.</i> , 2005	
	δ ^1H	δ ^{13}C	δ ^1H	δ ^{13}C
1	-	73,5	-	75,3
2	1,7 (dd, J_{2a-2b} 9,7; J_{2-3} 9,7) e 2,1 (m)	37,7	2,0 e 2,1 (m)	40,8
3	3,8 (dt, J_{2-3} 9,7, J_{2-3} 3,2)	67,3	4,1 (ddd, J : 3,5)	68,6
4	3,6 (m)	71,5	3,7 (dd, J : 3,5; 7,6)	73,8
5	5,0 (td, J_{5-4} 3,3 and J_{5-6} 5,35)	69,7	5,3 (ddd, J : 3,5)	72,6
6	1,9 (dd, J_{6b-6a} 14,0, J_{6b-5} 3,2) e 2,1 (m)	35,5	2,0 e 2,2 (m)	36,3
7	-	174,1	-	176,4
1'	-	125,8	-	127,9
2'	7,0 (dd, $J_{2'-3'}$ 8,7, $J_{2'-6'}$ 1,8)	121,8	6,9 (dd, J : 2,0, 8,2)	122,9
3'	6,8 (d, $J_{3'-2'}$ 8,7)	116,3	6,8 (d, J : 8,2)	116,4
4'	-	149,0	-	149,4
5'	-	146,1	-	146,7
6'	7,0 (d, $J_{6'-2'}$ 1,8)	114,3	7,0 (d, J : 2,0)	115,1
7'	7,4 (d, $J_{7'-8'}$ 16,0)	145,6	7,4 (d, J : 15,9)	146,8
8'	6,1 (d, $J_{8'-7'}$ 16,0)	115,1	6,3 (d, J : 15,9)	115,7
9'	-	165,8	-	168,9
MeO	3,5 (s)	52,3	3,7 (s)	52,8

Fonte: Do autor.

5.5.4 Substância 4: Quercitrina

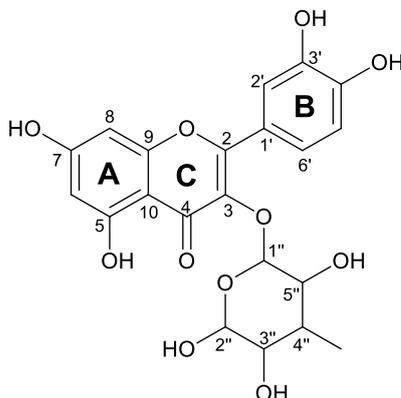


Figura 25 - Substância 4- Quercitrina
Fonte: Do autor.

Ao analisar os espectros unidimensionais, foi possível observar alguns sinais importantes para a determinação estrutural da substância 4 (Figura 25, Tabela 10). No espectro de RMN de ^1H , foi possível observar a presença de hidrogênios com $\delta_{\text{H-2'}}$ 7,3; $\delta_{\text{H-6'}}$ 7,2 e $\delta_{\text{H-5'}}$ 6,8, referente ao anel B (ANEXO 12).. Esses sinais são referentes a um anel aromático com três substituições o padrão de substituição pode ser confirmado através do desdobramento de sinais; respectivamente, apresenta-se um dubleto com uma constante de acoplamento J : 2,3 Hz, um duplo dubleto com J : 2,3 Hz e J : 8,8 Hz e um dubleto com uma constante de acoplamento J : 8,8 Hz. Além disso, apresentou sinais $\delta_{\text{H-8}}$ 6,4 e $\delta_{\text{H-6}}$ 6,2; referente ao anel A. Estes sinais apresentam-se na forma de dois dubletos com constante de acoplamento J : 1,9 Hz, indicando a presença de outro anel aromático, tendo quatro substituições. Observa-se também a presença de uma metila $\delta_{\text{H-6''}}$ 0,8.

Observa-se também, no espectro de RMN de ^1H , a presença de um hidrogênio da hidroxila na posição 5, com um $\delta_{\text{OH-5}}$ 12,6; esse sinal deslocado é referente a uma OH quelatogênica, comum em flavonas, apresentando valores de deslocamentos descritos na literatura entre δ_{OH} 11,9 e δ_{OH} 16,0 (CARVALHO, 1994; BRANCO et al., 2008).

No espectro de RMN de ^{13}C , foi possível verificar o sinal de $\delta_{\text{C-4}}$ em 178,2 sugerindo a presença de uma carbonila (ANEXO 13). Os outros sinais podem ser verificados na (Tabela 10). Os espectros bidimensionais foram essenciais para a determinação estrutural. A partir das correlações por HSQC, foi possível verificar quais carbonos estão diretamente ligados aos hidrogênios (ANEXO 14).

Utilizando-se outra técnica bidimensional, o HMBC, foi possível identificar as correlações entre hidrogênios e carbonos, possibilitando a elucidação da molécula (ANEXO 15). Observaram-se as correlações entre o hidrogênio com δ_{H-2} 7,3 e os carbonos com δ_{C-6} 121,6; $\delta_{C-1'}$ 121,2; $\delta_{C-4'}$ 148,9; δ_{C-2} 157,8; o hidrogênio metínico que apresenta $\delta_{H-1''}$ 5,2 com os carbonos δ_{C-3} 134,7; δ_{OH-5} 12,6 e δ_{C-6} 99,4.

Através do COSY, espectro de RMN bidimensional homonuclear ($^1H-^1H$), foi possível verificar as correlações entre os hidrogênios com $\delta_{H-3''}$ 3,5 e $\delta_{H-2''}$ 3,2, $\delta_{H-4''}$ 4,0 e $\delta_{H-1''}$ 5,2, $\delta_{H-2''}$ 3,2 e $\delta_{H-6''}$ 0,8, $\delta_{H-4''}$ 4,0 e $\delta_{H-3''}$ 3,5 (ANEXO 16). A partir da estrutura proposta, realizou-se uma busca pela estrutura no *SciFinder*, verificando-se que a estrutura é referente ao flavonoide quercitrina. Posteriormente, comparou-se os deslocamentos químicos de 1H e de ^{13}C , as multiplicidades e as constantes de acoplamento com os dados da literatura (Tabela 10).

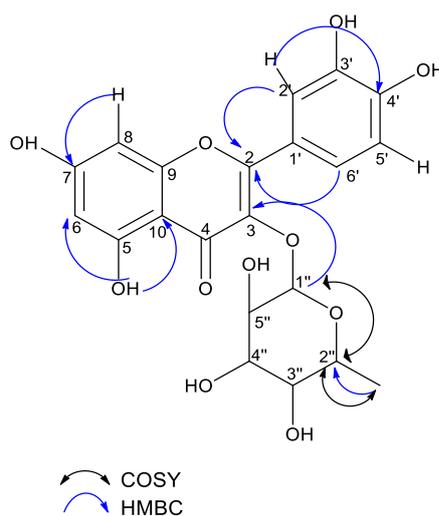


Figura 26 - Correlações obtidas por HMBC e COSY.
Fonte: Do autor.

A substância **4**, identificado como quercitrina, possui fórmula molecular $C_{21}H_{20}O_{11}$ e massa teórica de 448,1078 g/mol. Análise no EM foi realizada para a confirmação da estrutura proposta, observando-se a m/z 447,0938 no modo negativo, o que corrobora com a estrutura proposta (ANEXO 17).

Estudos têm demonstrado que a quercitrina apresenta potencial anti-inflamatório em modelos experimentais *in vivo* para inflamação intestinal. Sugere-se que o meio intestinal faz com que a quercitrina sofra clivagem, liberando a quercetina, que é a responsável pelo seu

efeito anti-inflamatório. A inibição ocorre via inibição do regulador central da inflamação, o NF- κ B (COMALADA et al., 2005).

Tabela 10 - Deslocamentos químicos (δ), multiplicidade dos sinais e a constante de acoplamento (J) obtidos a partir de espectros de RMN de ^1H e RMN de ^{13}C experimental (^1H 300 MHz, ^{13}C 75 MHz DMSO d_6) e RMN de e encontrado na literatura (^1H 500 MHz, ^{13}C 125 MHz, CD3OD) da quercitrina.

Posição	Experimental		(YANG; TAO; DUAN, 2010)	
	δ ^1H (ppm)	δ ^{13}C (ppm)	δ ^1H (ppm)	δ ^{13}C (ppm)
2	-	157,8	-	159,2
3	-	134,7	-	136,1
4	-	178,2	-	179,4
5	12,6 (s)	156,9	-	158,4
6	6,2 (d, J_{7-9} 1,9)	99,2	6,2 (d, J :1,6)	99,7
7	-	164,8	-	165,7
8	6,4 (d, J_{9-7} 1,9)	94,10	6,3 (d, J :2,0)	94,7
9	-	104,5	-	105,8
10	-	161,8	-	162,9
1'	-	121,2	-	122,9
2'	7,3 (d, $J_{2'-6'}$ 2,3)	116,1	7,3 (d, J :2,1)	116,9
3'	-	145,7	-	146,3
4'	-	148,9	-	149,6
5'	6,8 (d, $J_{5'-6'}$:8,8)	116,1	6,8 (d, J :8,4)	116,3
6'	7,2 (dd, $J_{6'-2'}$:2,4 e $J_{6'-5'}$:8,8)	121,6	7,3 (dd, J :2,1 e 8,0 Hz)	122,7
1''	5,2 (s)	102,3	5,3 (s)	103,4
2''	3,2 (m)	70,5	3,1 (m)	73,2
3''	3,5 (m)	70,8	3,3 (m)	72,0
4''	4,0 (s)	71,6	4,0 (s)	71,9
5''	3,2 (m)	71,0	3,1 (m)	71,8
6''	0,8 (d, $J_{6''-2''}$:5,9)	18,0	0,8 (d, J :5,6)	17,7

Fonte: Do autor.

5.5.5 Substância 5-Salsolina

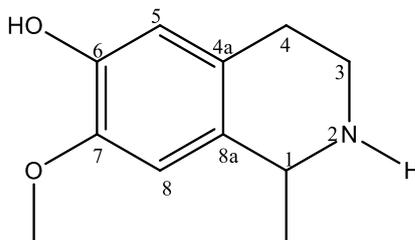


Figura 27 - Substância 5- Salsolina
Fonte: Do autor.

No espectro de RMN de ^1H observou-se um hidrogênio metílico com $\delta_{\text{H-1,5}}$ duplete, integra para 3 (ANEXO 18). Dois sinais de hidrogênio metilênicos com $\delta_{\text{H-3}}$ 2,7, multiplete e $\delta_{\text{H-4}}$ 2,5. Uma metoxila com δ_{OCH_3} 3,7. Um sinal de hidrogênio metínico com $\delta_{\text{H-1}}$ 4,2. $\delta_{\text{H-5}}$ 6,5 e $\delta_{\text{H-8}}$ 6,7, referente a hidrogênios aromáticos, simpletos. A multiplicidade e as constantes de acoplamento indicam um anel aromático com quatro substituintes sendo o padrão de substituição referente a um anel com os hidrogênios em posições um para ao outro.

No espectro de RMN de ^{13}C , observou-se 10 sinais de carbono com: um sinal referente ao carbono metílico com δ_{CH_3} 20,7, um sinal do carbono metilênico com $\delta_{\text{C-3}}$ 26,2, um carbono metínico com $\delta_{\text{C-1}}$ 50,8 (ANEXO 19). Observa-se, também, o sinal do carbono da metoxila com δ_{OCH_3} 56,3. Os seis sinais restantes referem-se aos carbonos do anel aromático que apresentam $\delta_{\text{C-8}}$ 110,3, $\delta_{\text{C-5}}$ 115,6, $\delta_{\text{C-6}}$ 125,1, $\delta_{\text{C-7}}$ 126,9, $\delta_{\text{C-8a}}$ 146,0, $\delta_{\text{C-4a}}$ 146,9. A partir dos fragmentos obtidos, foi possível montar a estrutura, sendo que a substância **5** refere-se à salsolina, que possui fórmula molecular $\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{O}_2\text{N}$. Os deslocamentos químicos dessa substância foram comparados com os dados da literatura (Figura 27, Tabela 11).

A salsolina é um alcaloide tetraisoquinólico, é comumente extraída do gênero *Salsola* (família Amaranthaceae) tendo sido extraída de diversas espécies como a *Salsola soda* L., *Salsola richteri* Kar, *Salsola kali* L., *Salsola collina* Pall. dentre outras (JIN; DU; YANG, 2011; KARAWYA et al, 1971). Porém no gênero *Ocotea* foi isolada pela primeira vez.

Tabela 11 - Deslocamentos químicos (δ), multiplicidade dos sinais e a constante de acoplamento (J) obtidos a partir de espectros de RMN de ^1H e RMN de ^{13}C experimental (^1H 300 MHz, ^{13}C 75 MHz DMSO d_6) e RMN de e encontrado na literatura (^1H 300 MHz, ^{13}C 75 MHz, CDCl_3) da salsolina.

Posição	Experimental		(PINET, S. <i>et al</i> , 2001)	
	δ ^1H (ppm)	δ ^{13}C (ppm)	δ ^1H (ppm)	δ ^{13}C (ppm)
1	4,2 (d, $J_{1-\text{CH}_3}$: 6,7 Hz)	50,8	4,1 (d, J :6,5 Hz)	49,9
3			3,0 (ddd, J :12,5; 5,7 e 5,0 Hz) e 3,3 (ddd, J : 12,5; 5,0 e 5,5 Hz)	24,3
	2,7 (m)	26,2		
4			2,7 (dt, J : 16,5 e 6,0 Hz) e 2,8 (ddd, J :16,5, 5,49, 5,7 Hz)	38,3
	2,5	40,8		
4a	-	146,9	-	146,7
5	6,5 (s)	115,6	6,6 (s)	115,0
6	-	125,1	-	123,8
7	-	126,9	-	124,4
8	6,7 (s)	110,3	6,6 (s)	110,0
8a	-	146,0	-	146,0
OCH3	3,7 (s)	56,3	3,82 (s)	55,8
CH ₃	1,5 (d, $J_{1-\text{CH}_3}$: 6,7 Hz)	20,7	1,50 (d, J :6,5Hz)	19,2

Fonte: Do autor.

5.5.6 Substância 6- Reticulina

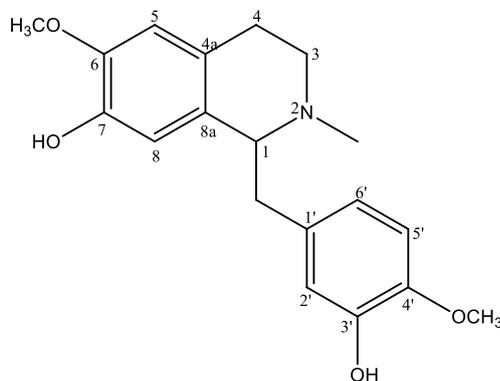


Figura 28 - Substância 6- Reticulina.
Fonte: Do autor.

O substância refere-se à reticulina, sendo os sinais de RMN ^1H característicos dessa molécula, $\delta_{\text{H-2}}$ 6,6 (d, $J_{2'-6'}$: 2,1 Hz); $\delta_{\text{H-5}}$ 6,7 (d, $J_{5'-6'}$: 8,2 Hz) e $\delta_{\text{H-6}}$ 6,5 (dd, $J_{2'-6'}$: 2,1 e $J_{5'-6'}$: 8,2 Hz) com um padrão de substituição de um anel trissubstituído, observado pela multiplicidade dos sinais (ANEXO 20). Dois sinais com $\delta_{\text{H-5}}$ 6,5 e $\delta_{\text{H-8}}$ 6,4, referentes a um anel aromático para substituído. Os sinais com $\delta_{\text{H-(OCH}_3)}$ 3,7; simpleto, integra para 6 indicando duas metoxilas presentes nessa estrutura. Além disso, observa-se um sinal de hidrogênio metílico com δ_{H} 2,5 que integra para 3, referente a metila ligado ao nitrogênio. Os demais sinais podem ser observados na Tabela 12, na qual foram comparados com dados da literatura.

A reticulina possui fórmula molecular $\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{NO}_4$. O isolamento da reticulina já foi descrito para diversas espécies de Lauraceae. É um alcaloide pertencente a subclasse dos benzil-tetra-hidroisoquinolínico. Foi descrita na literatura como indutora de alterações no sono, além de reduzir a coordenação motora, sugerindo que esta possui potente ação no sistema nervoso central (MORAIS; FILHO; ALMEIDA, 1998). Além disso, a reticulina demonstrou potencial anti-inflamatório, inibindo as vias da COX e LOX, em ensaios *in vivo*, onde verificou-se a inibição do edema de orelha e do recrutamento de neutrófilos (ALCÂNTARA, 2018).

Tabela 12 - Deslocamentos químicos (δ), multiplicidade dos sinais e a constante de acoplamento (J) obtidos a partir de espectros de RMN de ^1H experimental (^1H 300 MHz, DMSO d_6) e RMN de e encontrado na literatura (^1H 400 MHz, CDCl_3) da reticulina.

Posição	^1H experimental	^1H (CHANG et al, 2003)
1	3,5 (t, J_{1-1a} : 5,9 Hz)	3,7 (t, J : 6,8 Hz)
α	2,7 (d, J_{1a-1} : 5,9 e $J_{\alpha_a - \alpha_b}$: 14,2 Hz)	2,7 (dd, J : 13,8 e 4,6 Hz)
N-CH ₃	2,5 (s)	2,5 (s)
3	2,8 (dd, J :13,7 e J : 7,2 Hz) e 3 (m)	3,1 (m) e 3,2 (m)
4	2,6 (m)	2,8 (m)
4a	-	-
5	6,4 (s)	6,2 (s)
6	-	-
7	-	-
8	6,5 (s)	6,5 (s)
8a	-	-
1'	-	-
2'	6,6 (d, $J_{2'-6'}$:2,1 Hz)	6,7 (d, J :2,4 Hz)
3'	-	-
4'	-	-
5'	6,7 (d, $J_{5'-6'}$:8,2 Hz)	6,5 (d, J :8,4 Hz)
6'	6,5 (dd, $J_{6'-2'}$:2,1 e $J_{6'-5'}$:8,2 Hz)	6,7 (d, J :2,4 e 8,4 Hz)
OCH ₃	3,7 (s)	3,8 (s)

Fonte: Do autor.

5.5.7 Substância 7: Coclaurina

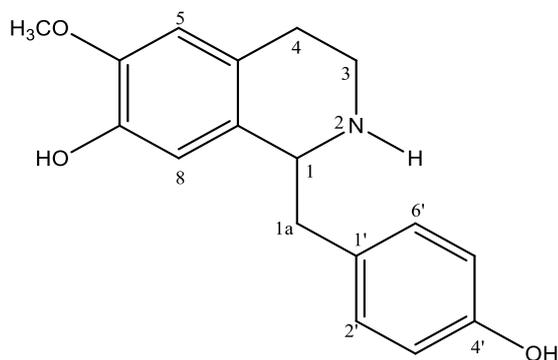


Figura 29 - Substância 7: Coclaurina
Fonte: Do autor.

No espectro de RMN de ^1H , observam-se três sinais de hidrogênios metilênicos que apresentam os seguintes deslocamentos: $\delta_{\text{H-4}}$ 2,7; integra para 1, apresentando-se como um multiplete; outro sinal de hidrogênio com $\delta_{\text{H-3}}$ 2,9 (dd, J :3.9 and J :10.0 Hz), integra para 2 e um sinal entre $\delta_{\text{H-1a}}$ 3,0-3,1, integra para 3, sendo esse sinal um multiplete (ANEXO 21). Observa-se a presença de um hidrogênio metínico que apresenta $\delta_{\text{H-1}}$ 3,8, sendo este sinal multiplete. Observa-se também, a presença de uma metoxilas (OCH_3), devido ao sinal com δ_{H} em 3,7 simpleto, e integrou para 3. Além disso, nota-se a presença de dois anéis aromáticos, o que é evidenciado por dois sinais simpletos com δ_{H} em 6,6; referentes a um anel aromático, sendo esses H localizados nas posições 5 e 8 na estrutura demonstrada. Observa-se também, outro anel com dois H com $\delta_{\text{H-3'}}$ e 5' em 6,7 e outros dois H com $\delta_{\text{H-2'}}$ e 6' em 7,0; esses H apresentam multiplicidades como dubletos e constante de acoplamento de 8,8. A partir dos dados de RMN de ^1H , foi possível montar a estrutura provável da substância. Por comparação com dados na literatura, confirmou a estrutura proposta.

A substância **7** refere-se ao coclaurina, formula molecular de $\text{C}_{18} \text{H}_{21} \text{N} \text{O}_3$, é um alcaloide benziltetraisoquinolínico, isolada no gênero *Ocotea*, sendo uma espécie na qual foi obtida esse composto a *Ocotea lancifolia* (FOURNET et al., 2007).

Tabela 13 - Deslocamentos químicos (δ), multiplicidade dos sinais e a constante de acoplamento (J) obtidos a partir de espectros de RMN de ^1H experimental (^1H 300 MHz DMSO d_6) e RMN de e encontrado na literatura (^1H 200 MHz, CCl_3OD) da coclaurina.

Posição	Experimental δ ^1H (ppm)	(ITURIAG-VÁSQUEZ et al., 2003) δ ^1H (ppm)
1a	3,0-3,1 (m)	3,1 (m)
1	3,8 (m)	3,9 (m)
3	2, 9 (dd, J :3.9 and J :10.0 Hz)	2,8 (m)
4	2,7 (m) and 3,0 (m)	2,7 (m)
5	6,6 (s)	6,7 (s)
6	-	-
7	-	-
8	6,6 (s)	6,6 (s)
8a	-	-
1'	-	-
2'	7,0 (d, $J_{2'-3'}:8,8$)	7,2 (d, $J_{2'-3'}:8,1$)
3'	6,7 (d, $J_{3'-2'}:8,8$)	6,8 (d, $J_{2'-3'}:8,1$)
4'	-	-
5'	6,7 (d, $J_{5'-6'}:8,8$)	6,8 (d, $J_{2'-3'}:8,1$)
6'	7,0 (d, $J_{6'-5'}:8,8$)	7,2 (d, $J_{2'-3'}:8,1$)
OCH_3	3,7 (s)	3,9 (s)

Fonte: Do autor.

5.5.8 Substância 8- Isoboldina

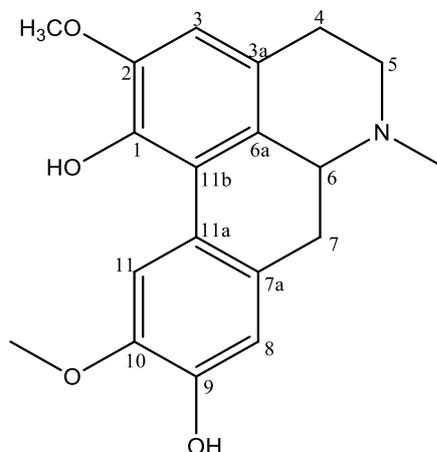


Figura 30 - Substância 8: Isoboldina
Fonte: Do autor.

Observou-se no RMN de ^1H um sinal de hidrogênio metílico com δ_{H} 2,4; que integra para 3, sendo este sinal simples (ANEXO 22). Na região com δ_{H} de 3,7 observa-se dois sinais que integram para 3 cada um, equivalente a duas metoxilas. Os sinais com $\delta_{\text{H}-3}$ 6,6; $\delta_{\text{H}-8}$ 6,7 e $\delta_{\text{H}-11}$ 7,9, integram para um, ambos são simples, são referentes a hidrogênio de anel aromático, formando dois anéis com o padrão de substituição indicado na Figura 30. Na região com δ_{H} entre 2,9 e 3,0; um sinal multipletado que integra para 4, também observou um sinal de H com δ_{H} 2,7; multipletado e integra para 2. E um sinal com δ_{H} 2,2 que é um sinal multipletado e integra para 1, esses sinais multipletados são referentes aos hidrogênios metilênicos e metínicos presentes na estrutura.

Utilizando-se o espectro de ^{13}C e o HSQC, foi possível observar os sinais característicos da metoxila com δ_{C} 56,4 (ANEXO 23) Os sinais com $\delta_{\text{C}-3}$ 109,9; $\delta_{\text{C}-8}$ 114,1 e $\delta_{\text{C}-11}$ 115,5 carbonos de anel aromático ligados aos hidrogênios de anel aromático. Além disso, os sinais com $\delta_{\text{C}-4}$ 29,1; $\delta_{\text{C}-7}$ 34,3 e $\delta_{\text{C}-5}$ 53,5 referentes aos três carbonos metilênicos. O sinal com $\delta_{\text{C}-6}$ 63,0 refere-se ao carbono metínico. Os outros sinais de H e C podem ser verificados na Tabela 14. A partir dos fragmentos obtidos, pode-se concluir que a substância refere à isoboldina, Figura 30, com fórmula molecular de $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{NO}_4$. Os deslocamentos químicos foram comparados com os dados da literatura (Tabela 14). É descrita na literatura como uma substância com potencial atividade antimicrobiana para diversos fungos e bactérias em ensaios in vivo (PELLETIER, 1996).

Tabela 14 - Deslocamentos químicos (δ), multiplicidade dos sinais e a constante de acoplamento (J) obtidos a partir de espectros de RMN de ^1H e RMN de ^{13}C experimental (^1H 300 MHz, ^{13}C 75 MHz DMSO d_6) e RMN de e encontrado na literatura (^1H 300 MHz, ^{13}C 75 MHz, C) da isoboldina.

Posição	Experimental		(GIL-ARCHILA, CUCA-SUÁREZ, 2018)	
	δ ^1H (ppm)	δ ^{13}C (ppm)	δ ^1H (ppm)	δ ^{13}C (ppm)
1	-	141,3	-	140,7
2	-	147,1	-	146,0
3	6,6 (s)	109,9	6,5 (s)	108,7
3a	-	123,6	-	123,8
4	2,7 (m) e 2,9 (m)	29,1	3,1 e 2,6 (m)	28,6
5	2,2 (m) e 2,9 (m)	53,5	3,1 e 2,5 (m)	53,3
6	2,9 (m)	63,0	3,2 – 3,1 (m)	62,5
6a	-	127,3	-	126,7
7	2,7 (m) e 2,9 (m)	34,3	2,9 (dd, J :13,9 e 4,1 Hz) e 2,6 (m)	33,9
7a	-	129,8	-	129,4
8	6,7 (s)	115,5	6,7 (s)	114,2
9	-	142,4	-	144,7
10	-	145,9	-	145,3
11	7,9 (s)	114,1	7,9 (s)	111,8
11a	-	124,1	-	124,1
11b	-	120,4	-	119,8
H- (CHO)	3,7 (s)	56,4 and 59,1	3,9 (s)	56,2
N-CH ₃	2,4 (s)	44,3	2,5 (s)	43,6

Fonte: Do autor.

5.5.9 Substância 9

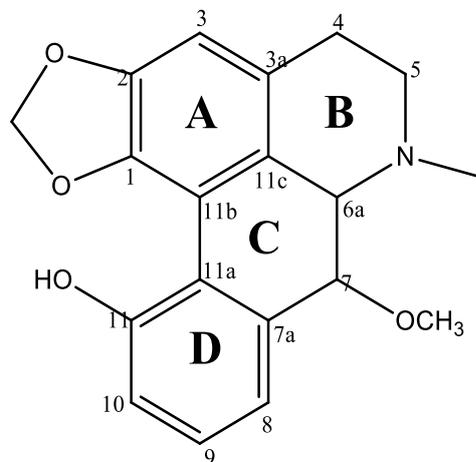


Figura 31 - Substância 9
Fonte: Do autor.

Foram observados os sinais no RMN de ^1H com $\delta_{\text{H-3}}$ 6,6, simpleto e integra para 1 referente a um H de anel aromático com 5 substituições, 3 sinais de H com δ_{H} 6,8 (d, J : 7.8); δ_{H} 6,9 (d, J : 7.8) e δ_{H} 7,2 (t, J : 7.8); referente a um anel aromático com 3 substituições, os valores das constantes de acoplamento e as multiplicidades sugerem que o composto apresenta o padrão de substituição indicado no anel D, da Figura 31 (ANEXO 24)

O sinal com δ_{H} 5,9 (d. J : 1.0) e δ_{H} 6,0 (d. J : 1.0) é referente ao grupo metileno dióxido, presente em diversos alcaloides aporfínico, além disso, a presença desse grupo nas posições 1 e 2 é mencionado como um fator relacionado a um aumento na atividade biológica desses alcaloides (BRENTAN et al., 2007; SILVA; TULLI; MILIT, 2009).

Observou-se um sinal simpleto, com δ_{H} 3,6 e integra para 3, sendo este sinal referente a uma metoxila. Também, observou-se 2 sinais referentes aos hidrogênios metínicos com $\delta_{\text{H-6}}$ 3,0 e $\delta_{\text{H-7}}$ 3,9 ambos dubletos. E dois sinais referentes a hidrogênios metilênicos com $\delta_{\text{H-5}}$ 2,5- 2,6 (integra para 2) e $\delta_{\text{H-4}}$ 2,4 (integra para 1); todos multipletos. No RMN de ^{13}C foi possível confirmar a presença de alguns grupos característicos, como a metoxila, que apresenta δ_{C} 59,6 e o grupo metileno dióxido, com δ_{C} em 100,6. O δ_{C} 66,3 e δ_{C} 84,7 são referentes aos carbonos metínicos (ANEXO 25). Os outros sinais de ^1H e ^{13}C podem ser visualizados na Tabela 15, onde é possível verificar qual ^1H foi atribuído a qual ^{13}C ; utilizando a técnica bidimensional HSQC, que verifica o acoplamento a J^1 (ANEXO 26).

A partir dos espectros bidimensionais, HMBC, foi possível observar os sinais de hidrogênio com δ_{H} 5,9 e δ_{H} 6,0 que correlacionam com os carbonos com $\delta_{\text{C-3}}$ 146,9 e $\delta_{\text{C-2}}$

142,2, confirmando a presença desse grupo no anel A (Figura 32 e ANEXO 27). Observa-se também a correlação do sinal δ_H 3,6 com o δ_C 84,7, indicando que a metoxila está no anel C, ligada ao carbono 7 da estrutura.

Para a verificação em qual posição está a OH, no anel D, utilizou-se também o HMBC, observou a correlação dos hidrogênios com δ_{H-9} 7,2 e δ_{H-10} 6,8 com o carbono ligado a hidróxila δ_{C-11} 154,1, já o hidrogênio com δ_{H-8} 6,9 não correlaciona com este carbono, indicando que ele está em uma posição para a hidroxila. Observou-se, também, que o hidrogênio com δ_{H-8} 6,9 está acoplando com o carbono δ_{C-7} 84,7; para ocorrer essa correlação o carbono 8 deve ser o H com δ_{H-8} 6,9 para ocorrer o acoplamento a J^3 . Logo, a OH deve estar na posição 11. Ainda neste anel, observa-se a correlação do δ_{H-9} 7,2 com o carbono δ_{C-7a} 141,4, também com uma correlação a J^3 .

O sinal de δ_H 2,4 e δ_C 45,2; são referentes a um CH_3 , o valor dos deslocamentos de hidrogênio e carbono, indicam que este grupo está ligado ao N. Esse hidrogênio δ_H 2,4, correlaciona com os δ_{C-5} 52,9 e δ_{C-6} 66,3. Confirmando a posição da metila.

A partir dos sinais observados, foi possível elucidar a estrutura do composto 9, sendo este composto um derivado da duguexina (DEBOURGES et al, 1987), diferenciando-se dessa estrutura apenas na substituição do carbono 7, a duguexina apresenta uma hidroxila nesse carbono, enquanto o composto 9 apresenta uma metoxila. Sendo a substância **9** um derivado inédito com fórmula molecular ($C_{19}H_{19}NO_4$).

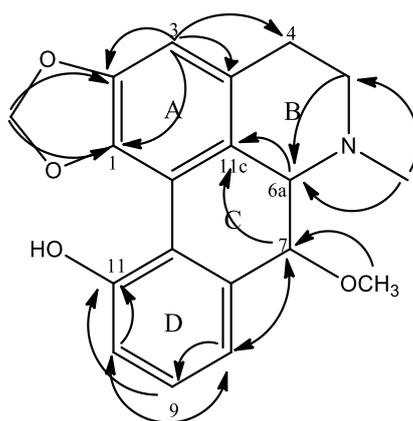


Figura 32 - Correlações obtidas pelo mapa de contornos HMBC.

Fonte: Do autor.

Tabela 15 - Deslocamentos químicos (δ), multiplicidade dos sinais e a constante de acoplamento (J) obtidos a partir de espectros de RMN de ^1H e RMN de ^{13}C experimental (^1H 300 MHz, ^{13}C 75 MHz DMSO *d*-6) da substância **9**.

Posição	Experimental	
	δ ^1H (ppm)	δ ^{13}C (ppm)
1	-	142,6
2	-	146,9
3	6,6 (s)	107,1
3a	-	126,9
4	2,5-2,6 (m)	27,7
5	2,4 e 2,9 (m)	52,9
6	3,0 (d, J_{6-7} : 11,2)	66,3
7	3,9 (d, J_{7-6} : 11,2)	84,7
7a	-	141,4
8	-	154,2
9	6,9 (d, J : 7,8)	113,9
10	7,2 (t, J : 7,8)	129,2
11	6,8 (d, J : 7,8)	116,1
11a	-	132,8
11b	-	111,4
11c	-	125,6
OCH3	3,6 (s)	59,6
OCH20	5,9 (d, J : 1,0) 6,0 (d, J : 1,0)	100,6
N-CH ₃	2,5 (s)	45,2

Fonte: Do autor.

5.6 DESREPLICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS NO EXTRATO BRUTO.

Para verificar se as substâncias isoladas poderiam ser um artefato realizou-se uma busca de suas m/z no extrato bruto das folhas e do caule, para confirmar se as m/z correspondiam ao da substância desejada realizou-se cálculos para verificar se o número de carbonos estavam de acordo utilizando-se o padrão isotópico, posteriormente observou-se que o software gerou a formula molecular correspondente de cada composto, com exceção do

composto 5, que no extrato encontrou-se sua m/z e o número de carbonos calculados estavam de acordo com o número real, porém o software não classificou corretamente sua fórmula. No cromatograma da Figura 33 é possível verificar os tempos de retenção das substâncias isoladas no extrato.

Através de cromatografia líquida de ultra desempenho acoplada à espectrometria de massas HPLC-ESI-TOF nos modos negativo e positivo foi possível a identificação dos compostos isolados no extrato etanólico das folhas e casca de *O. diospirofolia* (Figura 3). Detectou-se no modo negativo os seguintes compostos: 1 (mururina A), com m/z 447,0716, composição elementar: $C_{24}H_{16}O_9$, erro: -0,4 mDa. Este composto teve tempo de retenção: 4,03 min (Figura 33). O composto 2 (ácido 5-cafeoilquínico) foi detectado no tempo de retenção: 0,47 min, com m/z 353,0873, composição elementar: $C_{16}H_{17}O_9$, erro: 1,1 mDa. Para o composto 3 (éster metílico do ácido neoclorogénico) o tempo de retenção foi de 0,47 min, m/z 367,1029, composição elementar: $C_{17}H_{19}O_9$, erro: 0,8 mDa. O composto 4 (quercitrina) foi verificado no tempo de retenção: 3,25 min, m/z 447,0927, com uma composição elementar: $C_{21}H_{19}O_{11}$, erro: -0,8 mDa.

Os compostos 6 (reticulina: m/z 330,1705, composição elementar: $C_{19}H_{23}NO_4$, erro 1,6 mDa e tempo de retenção: 2,54 min), 7 (coclaurina: m/z 286,1443, composição elementar: $C_{17}H_{20}NO_3$, erro: -1,1 mDa e tempo de retenção: 3,1 min), 8 (isoboldina: m/z 328,1549, composição elementar: $C_{19}H_{22}NO_4$, erro: 0 mDa e tempo de retenção: 2,75 min) e 9 (diospirofolina: m/z 326,1392, composição elementar: $C_{19}H_{20}NO_4$, erro: -1,2 mDa e tempo de retenção: 3,7 min) foram detectados na análise de modo positivo.

De acordo com os resultados HPLC-ESI-TOF, estes compostos isolados são provavelmente os principais nos extratos de folhas e casca (Figura 33). Os derivados clorogênicos 2 e 3 e o alcalóide 6 foram encontrados em ambas as folhas e extratos de casca. A maioria dos 6 é muito comum neste gênero, o que corrobora nossos achados [15]. O composto 5 foi o único não detectado nos extractos etanólicos em bruto, sugerindo que é um composto menor concentrado nos passos de purificação sucessivos.

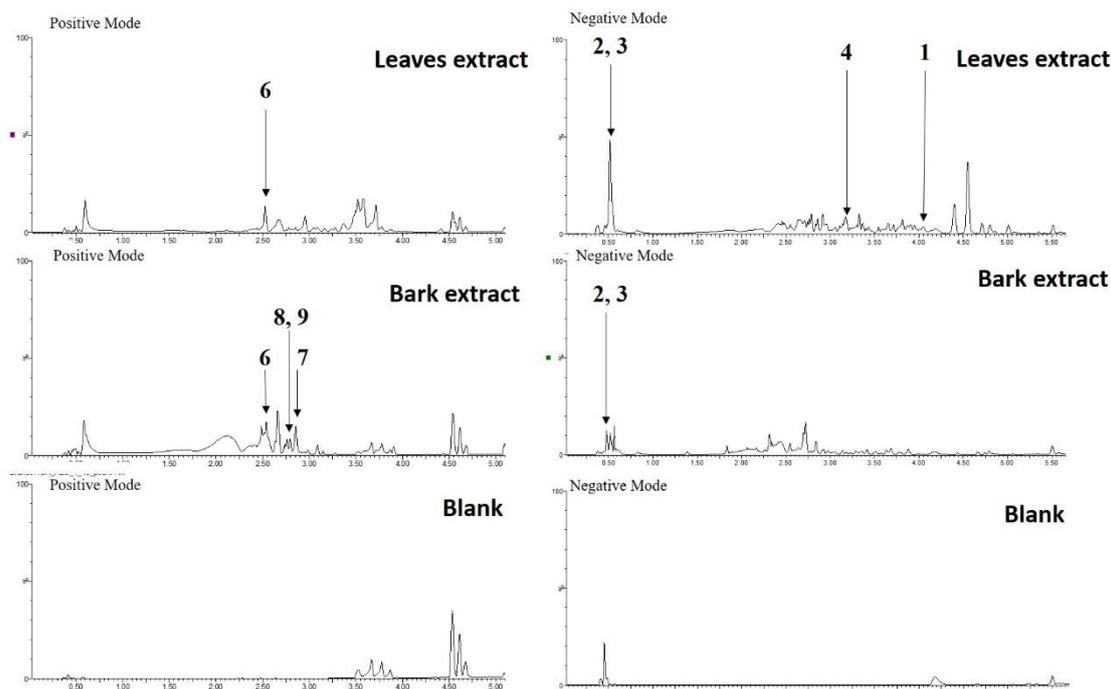


Figura 33 - As substâncias isoladas que foram detectadas nos cromatogramas obtidos por HPLC-ESI-TOF.

Fonte: Do autor.

6.7 ÓLEOS ESSENCIAIS

Foram obtidos 0,7108 g de óleo essencial das folhas (OEF) e 0,415g do óleo essencial da casca (OEC), havendo um rendimento de, respectivamente, 0,26% e 0,21%. O rendimento obtido é equiparado aos valores relatados na literatura para outras espécies de *Ocotea*, como a *O. varaguensis* e *O. whitei*, que apresentaram um rendimento, respectivamente, de 0,29% e 0,24% (TAKAKU et al., 2006).

Os dados obtidos na análise de CG-EM foram, então, identificados, utilizando a biblioteca Nist e por meio da comparação dos índice de Kovatz (IK) experimental e da literatura (ADAMS, 2017).

Para OEF foram detectados 24 constituintes detectados e para o OEC, foram detectadas 35 substâncias. Foi possível observar que o OEF possui 6 substâncias e o OEC 17 substâncias diferentes entre si. Além disso, eles apresentam 20 substâncias em comum (Tabela 16).

Os substâncias que estão presentes em maior quantidade no OEF são: α -felandreno (14,8%) (I), β -pineno (8,9%) (II), limoneno (8,7%) (III), biciclogermacreno (8,2%) (IV), β -bisaboleno (7,7%) (V), δ -3-careno (7,7%) (VI), α -pineno (6,8%) (VII), *E*-muurola-4(14),5-

dieno (6,35%) (**VIII**), *E*-cariofileno (6,2%) (**IX**) e terpinoleno (**X**) (5,4%), totalizando 71,9 % da composição do OEF. Já para o OEC, observou-se que os constituintes majoritários foram: α -felandreno (15,4%) (**I**), *E*-muurola-4(14),5-dieno (10,6 %) (**VIII**), β -pineno (8,4%) (**II**) sylvestrene (6,7%) (**XI**), α -pineno (6,2%) (**VII**), biciclogermacreno (5,7%) (**IV**), (*E*)-cariofileno (5,3%) (**IX**), δ -3-careno (5,1%) (**VI**), totalizando 63,4 % do OEC (Figura 34).

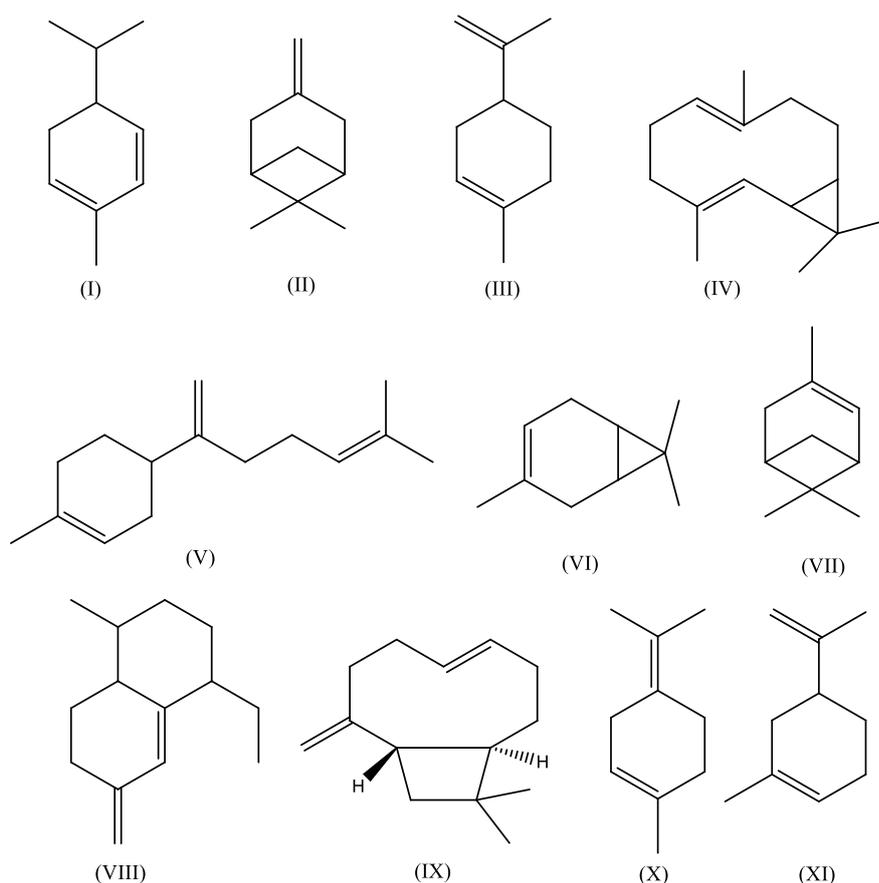


Figura 34 - Principais substâncias constituintes dos óleos essenciais da folha e casca da *O. diospyrifolia*.

Fonte: Do autor.

6.8 ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA PARA OS ÓLEOS ESSENCIAIS

Foram realizados ensaios para verificar a capacidade anti-inflamatória dos OEF e OEC. Utilizou-se como controle positivo o Acheflan®, que é um medicamento fitoterápico anti-inflamatório muito importante. As principais substâncias presentes na planta da qual é extraído o óleo essencial (*Cordia verbenácea*) são o α -humuleno e o *E*-cariofileno. Estudos sobre o Acheflan indicam que ele inibe a via da COX, podendo ser utilizado como controle positivo para verificar a inibição da formação do edema (FERNANDES *et al.*, 2007).

O OEF apresentou significativa atividade anti-inflamatória, inibindo cerca de 88,9% da formação do edema, em torno de 8,9% a mais que o fitoterápico Acheflan®, utilizado como referência. O OEC também apresentou atividade anti-inflamatória, inibindo 68,6% do edema de orelha (Figura 35).

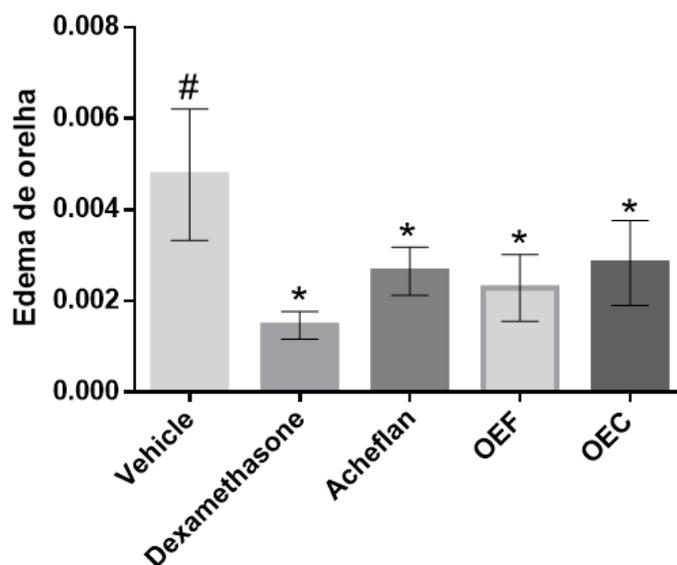


Figura 35 - Ensaio edema de orelha para OEF e OEC e seus respectivos controles: veículo (controle negativo) e Acheflan (controle positivo). As amostras foram testadas com uma concentração de 0,5 mg por orelha. Os resultados foram analisados por ANOVA one-way seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunnett e expressos como média \pm EMP.

Fonte: Do autor.

Para a quantificação das mieloperoxidases, observou-se que os óleos essenciais da casca e da folha reduziram o recrutamento de neutrófilos. Tanto o OEF quanto o OEC diferenciaram estatisticamente do controle negativo, sendo que o OEC foi mais eficiente na inibição do MPO, tendo sua atividade comparada ao fármaco de referência para o ensaio de MPO, a dexametasona.

A inibição da via da LOX pode possibilitar o desenvolvimento de novos fármacos com menos efeitos colaterais quando comparados aos AINES, que inibem apenas a via da COX, resultando em infiltração dos neutrófilos, que estão associados aos danos gástricos (CHAGAS-PAULA et al., 2011).

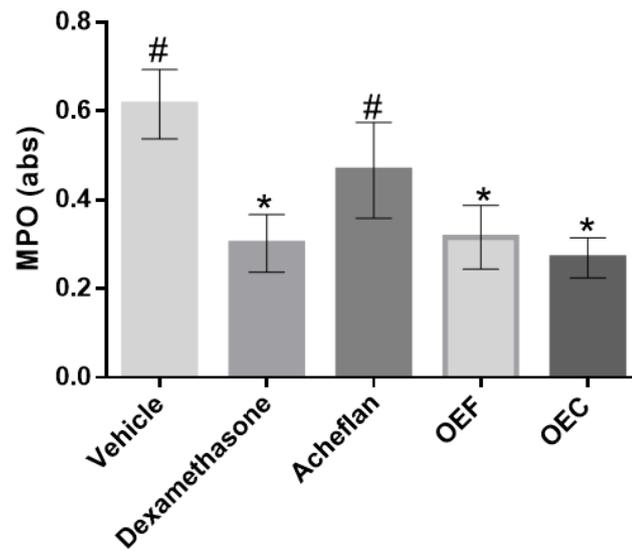


Figura 36 - Ensaio MPO para OEF e OEC e seus respectivos controles: veículo (controle negativo) e controle positivo: Dexametasona e Acheflan®. As amostras foram testadas na concentração de 0,5 mg por orelha. Os resultados foram analisados por ANOVA one-way seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunnett e expressos como média \pm EMP.

Fonte: Do autor.

Tabela 16 - Desrepliação das substâncias dos óleos essenciais da casca e da folha da *O. diospyrifolia*, o índice de Kovatz teórico (IK), índice de similaridade (IS) e a abundância relativa em %.

(Continua)

Compounds	OEF Relative abundance (%)	OEC Relative abundance (%)	Kovats Index	SI
(Z)-asarone	1.35	-	1668	96
1,2-dimetoxi-4-(2- metoxieteno) benzeno	2.57	-	1551	90
biciclogermacreno	8.24	5.65	1480	-
(Z)- α -bisaboleno	2.09	-	1487	-
β -bisaboleno	7.66	0.83	1493	-
bulnesol	-	0.35	1649	-
γ -cadineno	-	0.73	1496	-
δ -cadineno	0.54	3.64	1506	88
α -cadinol	-	3.52	1637	-
δ -3-careno	7.72	5.14	1003	96
(E)-caryofileno	6.24	5.33	1401	97
α -copaeno	0.65	1.79	1360	96
α -cubebeno	-	1.28	1334	96
cubeben-11-ol	-	0.30	1576	-
1-epi-cubenol	-	0.50	1610	-
<i>o</i> -cimeno	2.40	3.24	1015	97
β -elemeno	-	0.45	1376	-
germacreno B	-	1.15	1539	-
globulol	-	0.92	1566	-
α -humuleno	1.12	1.80	1436	96
isoelemicin	0.64	-	1638	90
limoneno	8.71	-	1019	-
(E)-muurolo-4(14),5- dieno	6.35	10.57	1466	-
α -muuroloeno	-	0.83	1484	90
γ -muuroloeno	-	0.89	1462	-

Tabela 17 - Desrepliação das substâncias dos óleos essenciais da casca e da folha da *O. diospyrifolia*, o índice de Kovatz teórico (IK), índice de similaridade (IS) e a abundância relativa em %.

(Continuação)

epi- α -muurolol	-	1.29	1624	-
α -muurolol	-	0.54	1629	-
mirreno	2.10	1.77	-	96
(<i>E</i>)- β -ocimeno	1.64	1.40	1638	97
A-felandreno	14.84	15.43	-	95
α -pineno	6.77	6.16	-	97
β -pineno	8.91	8.42	-	97
selina-6-en-4-ol	2.01	-	1636	88
Spatulenol	0.39	0.34	1560	95
Silvestreno	-	6.65	1019	94
α -terpineno	0.52	0.55	1008	95
γ -terpineno	-	0.50	1048	98
α -terpineol	-	0.55	1180	98
Terpinoleno	5.42	3.39	1078	-
α -tujeno	0.62	0.99	-	96
Viridiflorol	-	0.93	1574	-
Total	99.5	97.8		

7 CONCLUSÃO

A espécie *Ocotea diospyrifolia* (Meisn.) Mez, demonstrou apresentar significativa atividade anti-inflamatória quando se utilizaram as folhas para obtenção do extrato. A partir do extrato bruto das folhas foi realizado o particionamento e a fração acetato demonstrou ser a fração que apresentou uma maior concentração dos biomarcadores da atividade anti-inflamatória de inibição da via da COX e da LOX. Os óleos essenciais das folhas e cascas da espécie também demonstraram este mesmo mecanismo de ação, que é considerado superior ao dos medicamentos anti-inflamatórios disponíveis, com relação a eficácia e efeitos adversos. A partir desses dados, foi possível realizar o estudo metabolômico, onde detectou-se 39 substâncias que estão correlacionadas positivamente com a atividade anti-inflamatória investigada. Posteriormente, iniciou-se o estudo fitoquímico, isolando-se 9 substâncias, dessas 8 são conhecidos e uma inédita. Dentre essas substâncias descritas na literatura, algumas apresentam propriedades anti-inflamatórias, enquanto outras ainda precisam ser estudadas. Desta forma, os resultados deste trabalho são promissores, revelando a importância da *O. diospyrifolia* como fonte de extratos e substâncias inéditas farmacologicamente ativas, que com certeza merece ser mais estudada.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/ mass spectrometry**. 5 ed. Texas: Allured, 2017.
- AGUIAR, U. N. et al. Preparação e caracterização do complexo de inclusão do óleo essencial de *Croton zehntneri* com β -CD. **Química Nova**, v. 37, n. 1, p. 50–55, 2014.
- ALCÂNTARA, B. G. V. **Metabolômica e Fitoquímica de espécies Lauraceae e avaliação da inibição das principais vias inflamatórias por seus extratos e substâncias purificadas**. 2018. 72f. Dissertação (Mestrado em Química) - Departamento de Química, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2018.
- KETTLE A. J. ; WINTERBOURN C. C. Assays for the Chlorination activity of Myeloperoxidase. **Assessing Molecular, Cell, and Tissue Damage**, v. 233, n. 1992, p. 502–512, 1994.
- BARRETO, M. P. A mata atlântica e o ensino de história : da pré-história ao período colonial brasileiro. **Movimento Revista de Educação**, v. 6, n. 6, p. 272–305, 2017.
- BATISTA, A. et al. Aromatic compounds from three brazilian lauraceae species. **Química Nova**, v. 33, n. 2, p. 321–323, 2010.
- BRANCO, A. et al. Rubrofusarina , um policetídeo natural inibidor da topoisomerase II- D humana. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 703–708, Dez. 2008.
- BRAVO, J. A. Alcaloïdes de la especie *Aniba muca*. **Revista Boliviana de Química**, v. 13, n. 1, p. 19-22, 1996.
- BRENTAN, D. et al. Isolamento e avaliação da atividade citotóxica de alguns alcalóides oxaporfínicos obtidos de annonaceae. **Química Nova**, v. 30, n. 8, p. 1809–1812, 2007.
- BROTTO, M. L.; CERVI, A. C.; DOS SANTOS, E. P. O gênero *Ocotea* (Lauraceae) no estado do Paraná Brasil. **Rodriguesia**, v. 64, n. 3, p. 495–525, 2013.
- BYLESJO, M. et al. OPLS discriminant analysis: combining the strengths of PLS-DA and SIMCA classification. **Journal of Chemometrics**, v. 20, p. 398–405, Feb. 2007.
- CAI, M. et al. Apigenin-7-O- β -D-(-6''-p-coumaroyl)-glucopyranoside treatment elicits neuroprotective effect against experimental ischemic stroke. **International Journal of Biological Sciences**, v. 12, n. 1, p. 42–52, 2016.

- CARVALHO, D. E. Isoflavanone dimers hexaspermone. **Phytochemistry**, v. 35, n. 6, p. 1567–1572, 1994.
- CHAGAS-PAULA, D. A. et al. Chlorogenic acids from *Tithonia diversifolia* demonstrate better anti-inflammatory effect than indomethacin and its sesquiterpene lactones. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, p. 355–362, June. 2011.
- CHAGAS-PAULA, D. A. et al. A Metabolomic Approach to Target Compounds from the Asteraceae Family for Dual COX and LOX Inhibition. **Metabolites**, v. 5, p. 404–430, July. 2015.
- CHANG, Y. et al. Cytotoxic benzophenanthridine and benzyloquinoline alkaloids from *Argemone mexicana*. **Zeitschrift fur Naturforsch**, v. 58, p. 521–526, Feb. 2003.
- CLIFFORD, M. N. et al. Hierarchical scheme for LC-MSⁿ identification of chlorogenic acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 10, p. 2900–2911, 2003.
- COMALADA, M. et al. In vivo quercitrin anti-inflammatory effect involves release of quercetin, which inhibits inflammation through down-regulation of the NF-κB pathway. **European Journal of Immunology**, v. 35, n. 2, p. 584–592, 2005.
- DAI, P.; HARADA, Y.; TAKAMATSU, T. Highly efficient direct conversion of human fibroblasts to neuronal cells by chemical compounds. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 56, n. 3, p. 166–170, 2015.
- DEBOURGES, D. et al. Alcaloides des annonacees, 77¹. Alcaloides de *Duguetia spixiana*. **Journal of Natural Products**, v. 50, n. 4, p. 664–673, 1987.
- DE BESSA, N. G. F. et al. Prospecção fitoquímica preliminar de plantas nativas do cerrado de uso popular medicinal pela comunidade rural do assentamento vale verde - Tocantins. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 1, p. 692–707, 2014.
- DE VOS, R. C. et al. Untargeted large-scale plant metabolomics using liquid chromatography coupled to mass spectrometry. **Nature Protocols**, v. 2, n. 4, p. 778–91, 2007.
- DOS SANTOS, A. R. et al. Constituintes polares das folhas de *Machaonia brasiliensis* (Rubiaceae). **Quimica Nova**, v. 27, n. 4, p. 525–527, 2004.
- DUDLEY, E. et al. Targeted metabolomics and mass spectrometry. **Advances in Protein Chemistry and Structural Biology**, v. 80, p. 45–83, 2010.

- ERNST, M. et al. Mass spectrometry in plant metabolomics strategies: from analytical platforms to data acquisition and processing. **Natural Product Reports**, v. 31, n. 6, p. 784–806, 2014.
- FERNANDES, E. S. et al. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. **European Journal of Pharmacology**, v. 569, n. 3, p. 228–36, 2007.
- FOURNET, A. et al. Phytochemical and antiprotozoal activity of *Ocotea lancifolia*. **Fitoterapia**, v. 78, n. 5, p. 382–384, 2007.
- FRANCHIN, M. et al. The use of Brazilian propolis for discovery and development of novel anti-inflammatory drugs. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 153, p. 49–55, June. 2018.
- FUKUSAKI, E.; KOBAYASHI, A. Plant metabolomics: potential for practical operation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 100, n. 4, p. 347–354, 2005.
- FUNARI, C. S. et al. Metabolômica, uma abordagem otimizada para exploração da biodiversidade brasileira: Estado da arte, perspectivas e desafios. **Quimica Nova**, v. 36, n. 10, p. 1605–1609, 2013.
- GADDIPATI, R. S.; RAIKUNDALIA, G. K.; MATHAI, M. L. Dual and selective lipid inhibitors of cyclooxygenases and lipoxygenase: A molecular docking study. **Medicinal Chemistry Research**, v. 23, n. 7, p. 3389–3402, 2014.
- GÀO, X.; SCHÖTTKER, B. Reduction–oxidation pathways involved in cancer development: a systematic review of literature reviews. **Oncotarget**, v. 8, n. 31, p. 51888–51906, 2017.
- GELFAND, E. W. Importance of the leukotriene B4-BLT1 and LTB4-BLT2 pathways in asthma. **Seminars in Immunology**, v. 33, p. 44–51, Aug. 2017.
- GIANNERINI, A. C.; QUINET, A. E ANDREATA, R. H. P. O gênero *Ocotea* Aubl. (Lauraceae) no Parque Nacional do Itatiaia, Brasil. **Pesquisas Botânicas**, v. 58, p. 283–330, 2007.
- GIL ARCHILA, E.; CUCA SUÁREZ, L. E.. Phytochemical study of leaves of *Ocotea caudata* from Colombia. **Natural Product Research**, v. 32, n. 2, p. 195–201, 2018.
- GUYOT, B. et al. Esterification of phenolic acids from green coffee with an immobilized

lipase from *Candida antarctica* in solvent-free medium. **Biotechnology Letters**, v. 19, n. 6, p. 529–532, 1997.

HABIB CHAHADE, W. et al. Anti-inflammatory nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Einstein**, v. 6, p. 166–74, 2008.

HAWKINS, D. M. The problem of overfitting. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences**, v. 44, n. 1, p. 1–12, 2004.

HILÁRIO, M. O. E.; TERRERI, M. T.; LEN, C. A.. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: cyclooxygenase 2 inhibitors. **Jornal de Pediatria**, v. 82, n. 8, p. 206–212, 2006.

ITURRIAGA-VÁSQUEZ, P. et al. Simplified tetrandrine congeners as possible antihypertensive agents with a dual mechanism of action. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 7, p. 954–957, 2003.

JACOBSEN, N. E. **NMR spectroscopy explained: simplified theory, applications and examples for organic chemistry and structural biology**. 1 ed. John Wiley & Sons, 2007.

JARDIM, I. C. S. F. Extração em fase sólida : fundamentos teóricos e novas estratégias para preparação de fases sólidas. **Scientia Chromatographica**, v. 2, n. 1, p. 13–25, 2010.

JIN, Y.; DU, J.; YANG, Y.. Constituents of *Salsola collina*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 47, n. 2, p. 235–237, 2011.

KAMAL, N. et al. Metabolomics-guided isolation of anti-trypanosomal metabolites from the endophytic fungus *Lasiodiplodia theobromae*. **Planta Medica**, v. 83, n. 6, p. 565–573, 2017.

KAMIMURA, V. A. et al. Tree diversity and elevational gradient: The case of Lauraceae in the Atlantic Rainforest. **Flora: Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, v. 234, p. 84–91, Sept. 2017.

KARAWYA, M. S. et al. Chenopodiaceae isolation salsoline and salsolidine were isolated from *Salsola richteri* Kar . Is2 Salsamine isolated from this species3 was established to be an artefact formed during the extraction of the alkaloids . 4 Borkowski et aLs also found salsolin. **Phytochemical Reports**, v. 10, n. 1962, p. 3303–3304, 1971.

KATAJAMAA, M.; OREŠIČ, M. Data processing for mass spectrometry-based metabolomics. **Journal Chromatography A**, v.1158, p. 318–328, Apr. 2007.

KOROTKOVA, M.; LUNDBERG, I. E. The skeletal muscle arachidonic acid cascade in

health and inflammatory disease. **Nature Publishing Group**, p. 1–9, Jan. 2014.

KRAKAUER, T. The polyphenol chlorogenic acid inhibits staphylococcal exotoxin-induced inflammatory cytokines and chemokines. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 24, n. 1, p. 113–119, 2002.

KRAWISZ, J. E.; SHARON, P. ; STENSON, W. F. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. **Gastroenterology**, v. 87, n. 6, p. 1344–1350, 1984.

LAKSHMI, S. A review on chromatography with High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and its functions. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 4, n. 1, p. 1–15, 2015.

LEPORATTI, M. L. et al. Formerly natural product letters chemical , biological , morphoanatomical and antimicrobial study of *Ocotea puchury*-major Mart. **Natural Product Research** , v. 28, p. 37–41, Jan. 2014.

LIGGI, S. et al. KniMet: a pipeline for the processing of chromatography–mass spectrometry metabolomics data. **Metabolomics**, v. 14, n. 4, p. 1–4, 2018.

LILAND, K. H.. Multivariate methods in metabolomics - from pre-processing to dimension reduction and statistical analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 30, n. 6, p. 827–841, 2011.

LORENZI, H. Arvores brasileiras: manual de identificacao e cultivo de plantas arboreas do Brasil. Nova Odessa. **Plantarum**, v. 2, p. 368, 1998.

MARQUES, C. A. Importância econômica da da familia Lauraceae. **Floresta e Ambiente**, v. 8, n. 1, p. 195–206, 2001.

MARTINS, E. M. et al. Genetic diversity and population genetic structure in three threatened *Ocotea* species (Lauraceae) from Brazil ' s Atlantic Rainforest and implications for their conservation. **Conservation Genetics Resources**, v. 16, p. 1–14, July. 2015.

MEDZHITOV, R. Overview essay inflammation 2010 : New Adventures of an Old Flame. **Cell**, v. 140, p. 771–776, Mar. 2010.

MEIRER, K.; STEINHILBER, D.; PROSCHAK, E. Inhibitors of the arachidonic acid cascade: Interfering with multiple pathways. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 114, n. 1, p. 83–91, 2014.

MISRA, B. B. et al. Optimized GC–MS metabolomics for the analysis of kidney tissue metabolites. **Metabolomics**, v. 14, n. 6, p. 1-14, 2018.

MOTTA, E. V. S. et al. Atividades antioxidante, antinociceptiva e anti-inflamatória das folhas de *Mucuna pruriens* (L.) DC. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 2, p. 264–272, 2013.

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

MYERS, O. D. et al. One step forward for reducing false positive and false negative compound identifications from mass spectrometry metabolomics data: new algorithms for constructing extracted ion chromatograms and detecting chromatographic peaks. **Analytical Chemistry**, v. 89, n. 17, p. 8696–8703, 2017.

NOGUEIRA, R. C.; DE CERQUEIRA, H. F.; SOARES, M. B. P. Patenting bioactive molecules from biodiversity: the Brazilian experience. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 20, n. 2, p. 145–157, 2010.

NORIEGA, P. **Ishpink, *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. History, traditional uses, chemical, pharmacological properties and theeconomic potential of its essentials oils present within this amazonian species.** Quito: Nova Science Publishers, 2016.

PACHECO, S. et al. History of liquid chromatography. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 4, p. 1225–1271, 2015.

PARK, J. B. 5-Caffeoylquinic acid and caffeic acid orally administered suppress P-selectin expression on mouse platelets. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 20, n. 10, p. 800–805, 2009.

PATTI, G. J.; YANES, O.; SIUZDAK, G. Metabolomics: The apogee of the omics trilogy. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 5, n. 2, p. 45–48, 2013.

PAVIA, D. L. et al. **Introdução à espectroscopia**. 4. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010.

PÉREZ, Y. et al. Inhibition of cyclooxygenase and 5-Lipoxygenase enzymes by d-002.

Current Topics in Nutraceutical Research, v. 12, n. 2, p. 13–18, 2014.

PELLETIER, J. M. et al. Therapeutic role of dual inhibitors of 5-LOX and COX, selective and non-selective non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 62, n. 6, p. 501-509, 2003.

PINTO, L. P. et al. Mata Atlântica brasileira : Os desafios para a conservação da biodiversidade de um hotspot mundial. **Essências em Biologia da Conservação**, n. July, 2006.

RAMAKRISHNA, A.; RAVISHANKAR, G. A. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. **Plant Signaling and Behavior**, v. 6, n. 11, p. 1720–1731, 2011.

RIBEIRO, C. M. R.; DE SOUZA, N. Â. Esquema geral para elucidação de substâncias orgânicas usando métodos espectroscópico e espectrométrico. **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 1026–1031, 2007.

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**, 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**, v. 136, n. 3, p. 504–510, 2011.

SCARANO, F. R.; CEOTTO, P. Brazilian Atlantic forest: impact, vulnerability, and adaptation to climate change. **Biodiversity and Conservation**, v. 24, n. 9, p. 2319–2331, 2015.

SILVA, D. B.; TULLI, E. C. O.; MILIT, G. C. G. The antitumoral , trypanocidal and antileishmanial activities of extract and alkaloids isolated from *Duguetia furfuracea*. **Phytomedicine**, v. 16, p. 1059–1063, 2009.

SILVA, Í. C. Neutrófilos : aspectos clássicos, plasticidade e novas funções imunorregulatórias. **Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais**, v. 7, p. 35–46, 2015.

SLAVICH, G. M. Understanding inflammation, its regulation, and relevance for health: A top

scientific and public priority. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 45, p. 13–14, 2015.

SLOBODA, B. et al. Litterfall and Nutrient dynamics in a mature atlantic rainforest in Brazil. **Floresta e ambiente** . n.24, p. 279-291 , 2017.

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

SORDILLO, L. M. Symposium review: Oxylipids and the regulation of bovine mammary inflammatory responses. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 6, p. 5629–5641, 2018.

SOUZA, G. H. B. ; MELLO, J. C. P.; LOPES, N. P. **Revisões em processos e técnicas avançadas de isolamento e determinação estrutural de ativos de plantas medicinais**. Ouro Preto : UFOP, 2011.

STANBURY, R. M; GRAHAM, E. M. Systemic corticosteroid therapy side effects and their management. **British Journal of Ophthalmology**, v. 82, n. 6, p. 704–708, 1998.

TAKAKU, S.; HABER, W. A; SETZER, W. N. Leaf essential oil composition of 10 species of *Ocotea* (Lauraceae) from Monteverde , Costa Rica. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, p. 525–532, Aug. 2007.

TAKASHIMA, J.; ASANO, S.; OHSAKI, A.. Mururins A-C, three new lignoids from *Brosimum acutifolium* and their protein kinase inhibitory activity. **Planta Medica**, v. 68, n. 7, p. 621–625, 2002.

TOMA, M. et al. Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 8, p. 137–142, Apr. 2001.

THE PLANT List, Working list of all known plant species, 2013. Disponível em: <<http://www.theplantlist.org/tpl/record/kew-2401097>>. Acesso em: 10 Dec. 2018.

VIEIRA, P. C. Classificação pela forma física do sistema cromatográfico. **Química Nova**, v. 7, n. 7, p. 21–25, 1998.

WANG, M. et al. Ecofriendly Mechanochemical Extraction of Bioactive Compounds from Plants with Deep Eutectic Solvents. **Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 5, n. 7, p. 6297–6303, 2017.

WANG, Q. et al. Anti-inflammatory effect and isolation of phenylethanoid and acylated flavone glycosides from *Panzeria alaschanica*. **Zeitschrift für Naturforsch**, v. 70, n. 536, p.

379–384, 2015.

WEBER, R. J. M. et al. Computational tools and workflows in metabolomics: An international survey highlights the opportunity for harmonisation through Galaxy.

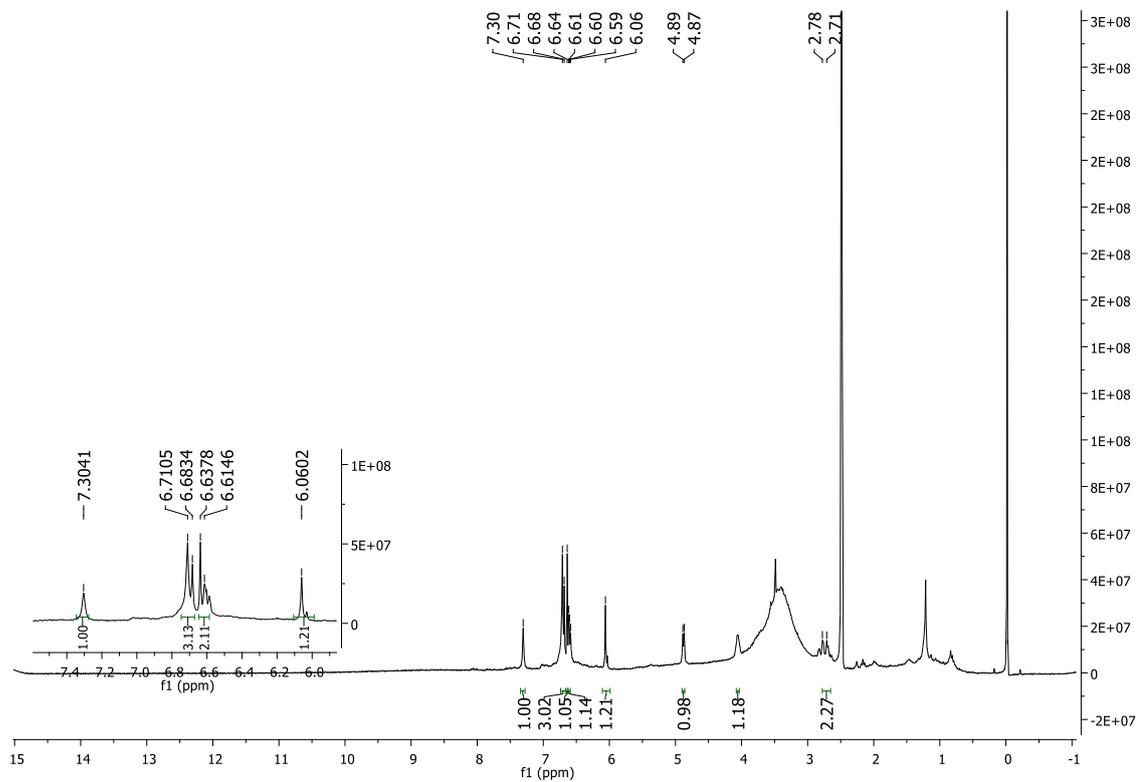
Metabolomics, v. 13, n. 2, p. 1–5, 2017.

YANG, N. Y.; TAO, W. W.; DUAN, J. A. Antithrombotic flavonoids from the faeces of *Trogopterus xanthipes*. **Natural Product Research**, v. 24, n. 19, p. 1843–1849, 2010.

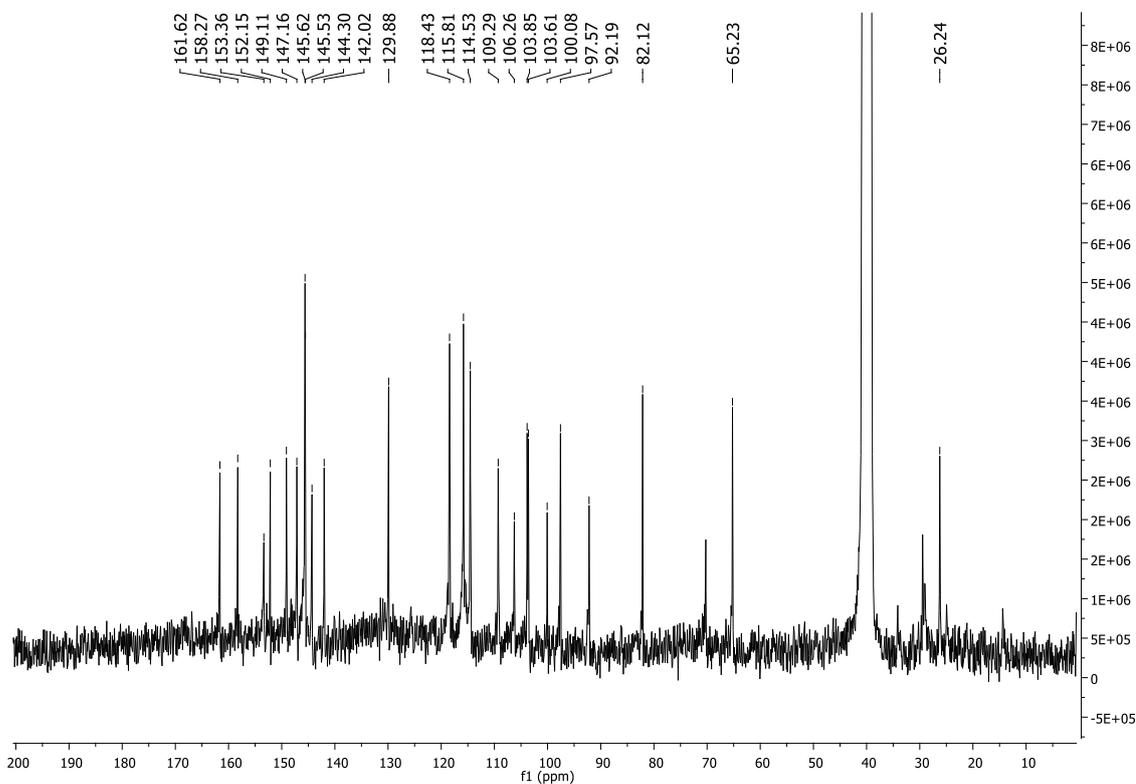
YULIANA, N. D. et al. Metabolomics for the rapid dereplication of bioactive compounds from natural sources. **Phytochemistry Reviews**, v. 12, n. 2, p. 293–304, 2013.

ZHU, X. et al. Phenolic compounds from *Viburnum cylindricum*. **Helvetica Chimica Acta**, v. 88, n. 2, p. 339–342, 2005.

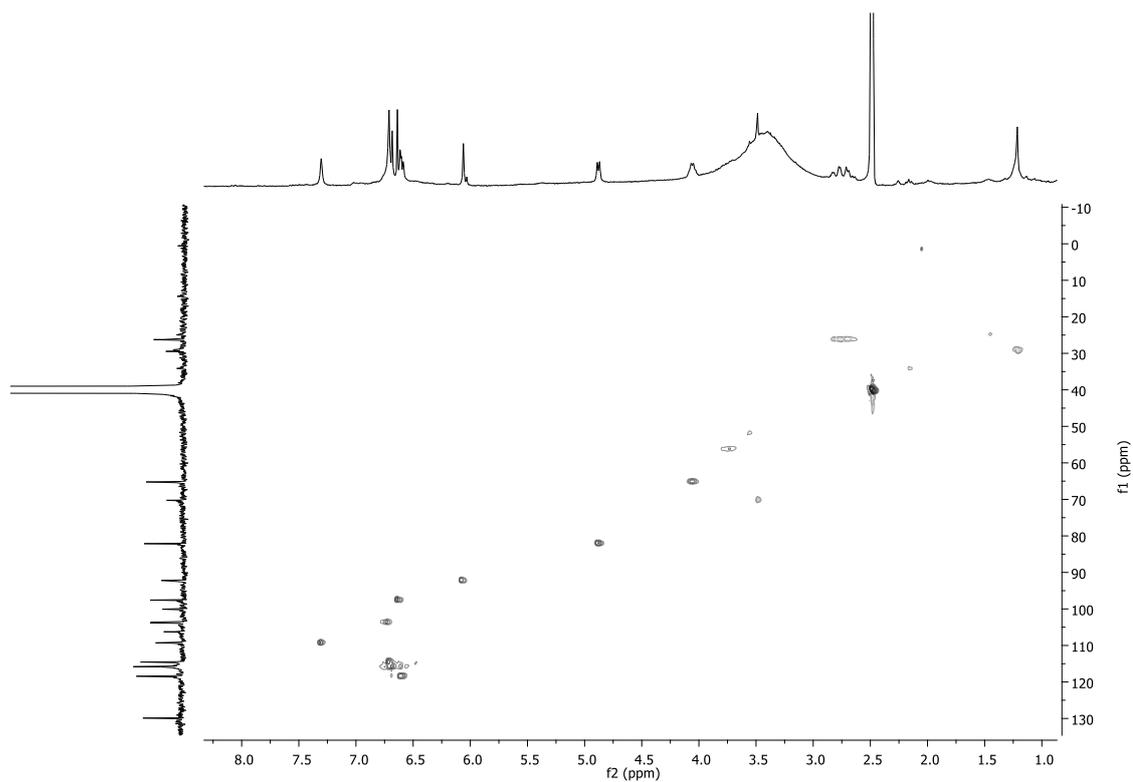
ANEXO 1: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, em DMSO- d_6) substância **1**.



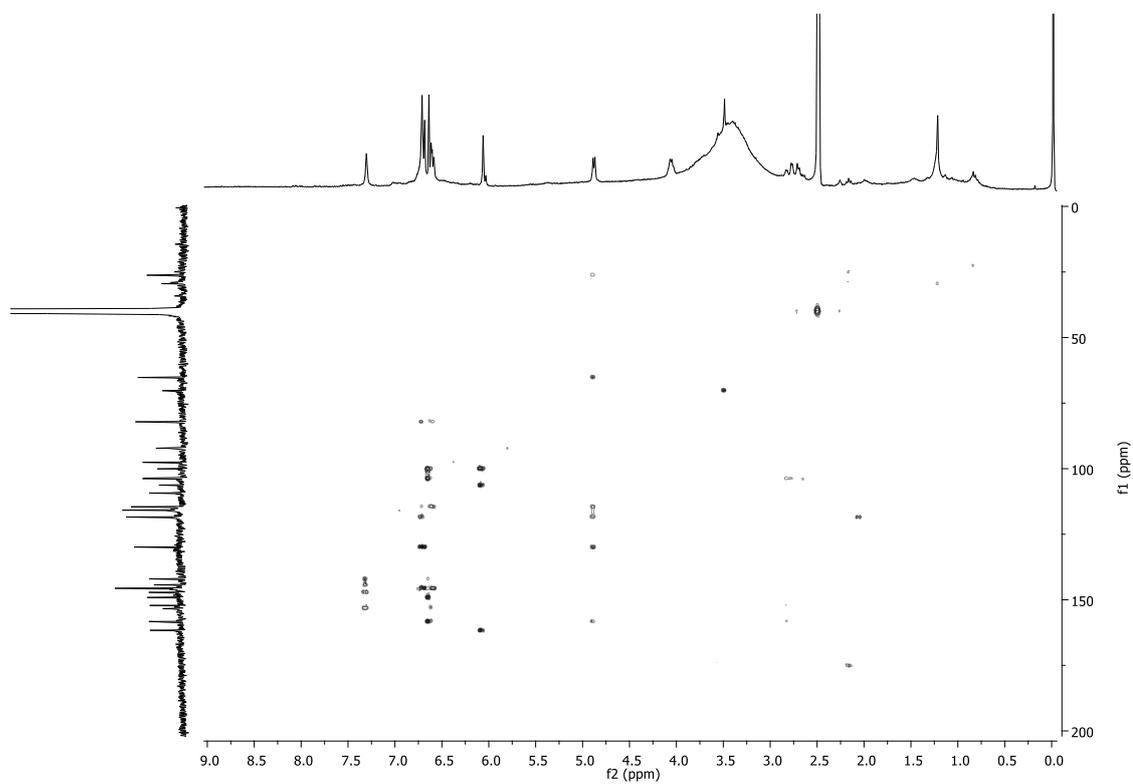
ANEXO 2: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, em DMSO- d_6) substância **1**.



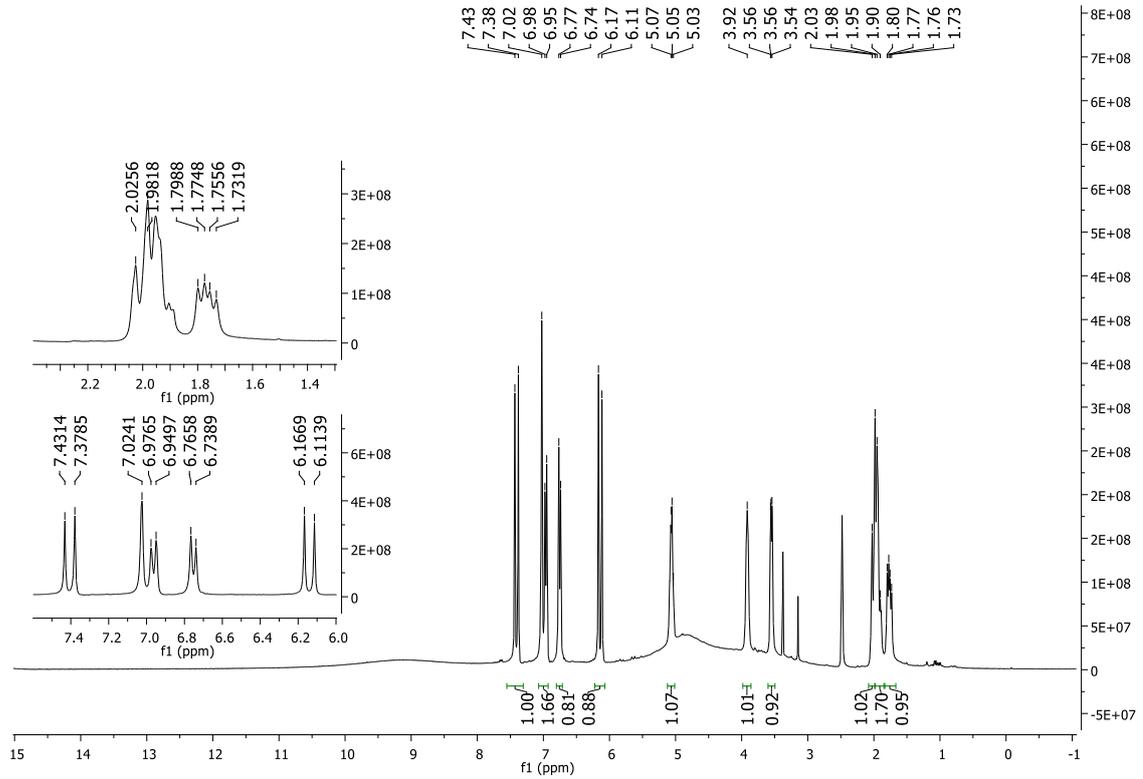
ANEXO 3: Mapa de contornos HSQC (300 MHz, DMSO-*d*₆) substância 1.



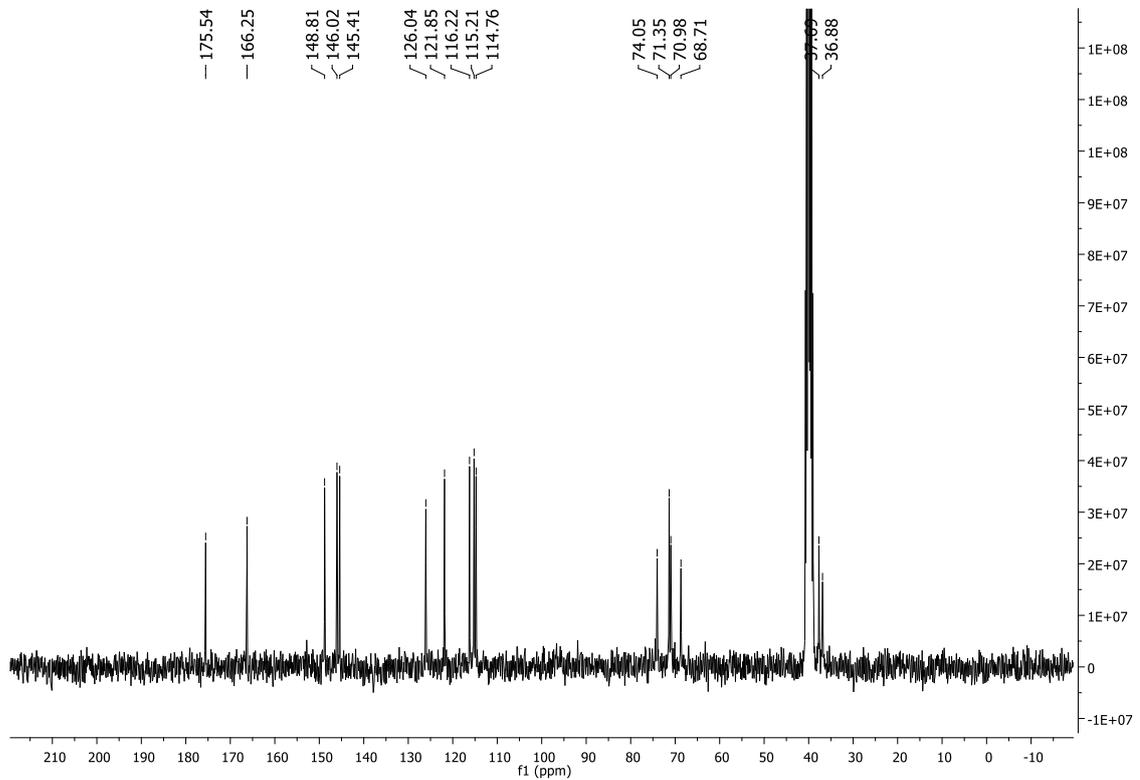
ANEXO 4: Mapa de contornos HMBC (300 MHz, DMSO-*d*₆) substância 1.



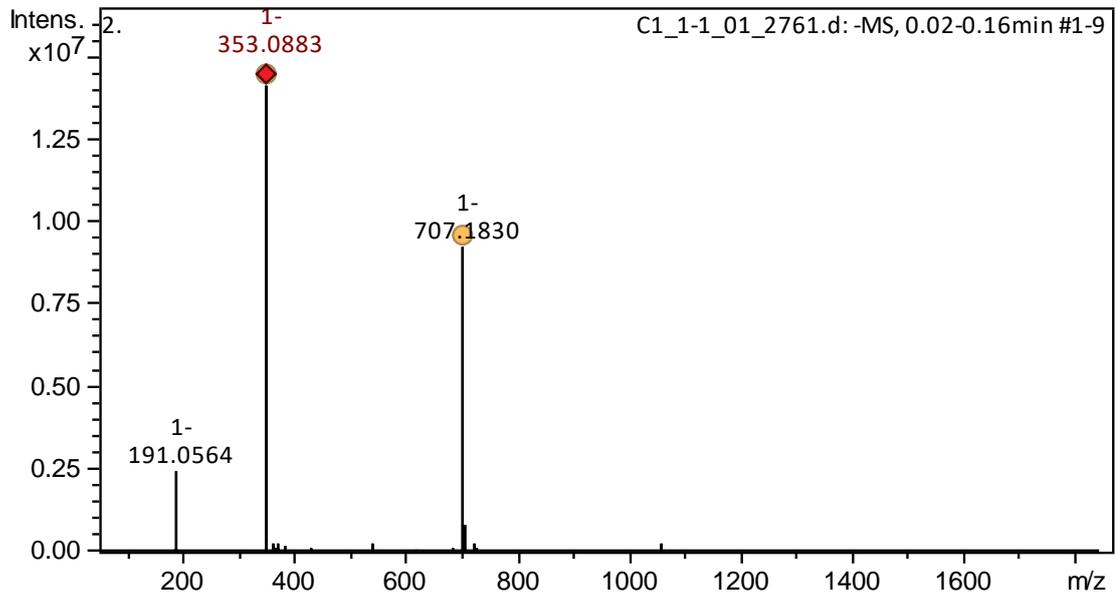
ANEXO 5: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, em $\text{DMSO-}d_6$) substância 2.



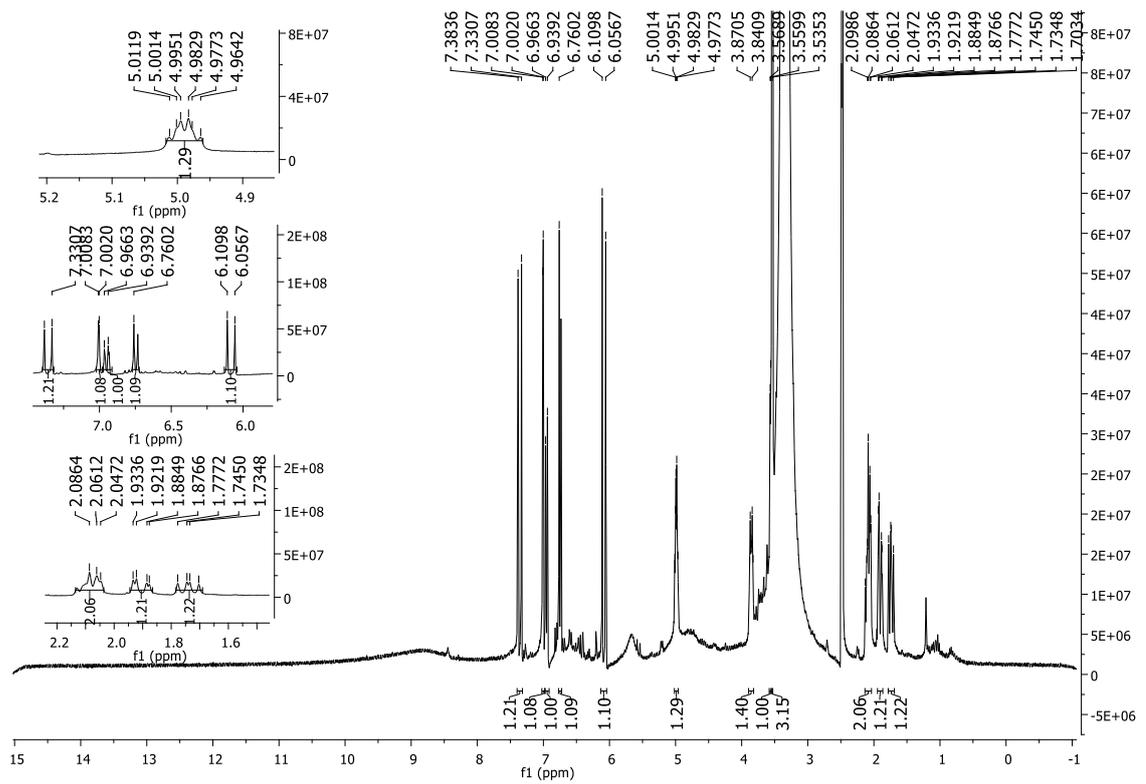
ANEXO 6: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, em $\text{DMSO-}d_6$) substância 2.



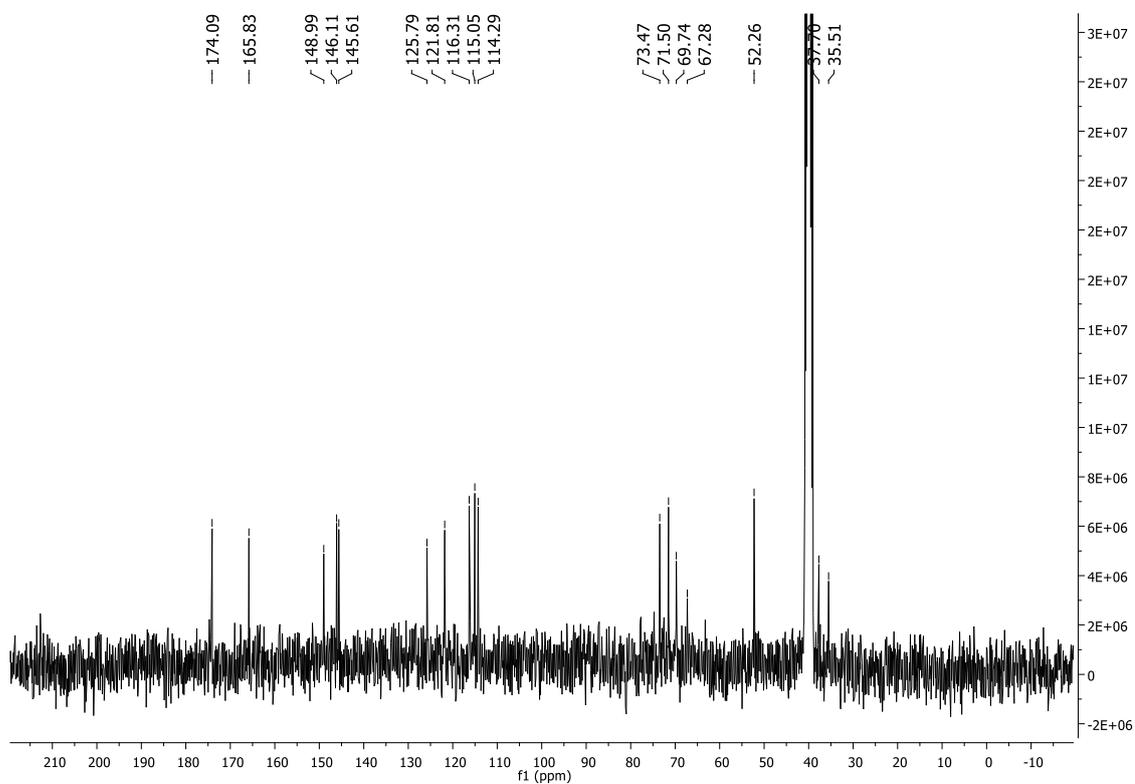
ANEXO 7: Espectro de Massas da substância 2, com sistema ESI, faixa de 0-1800.



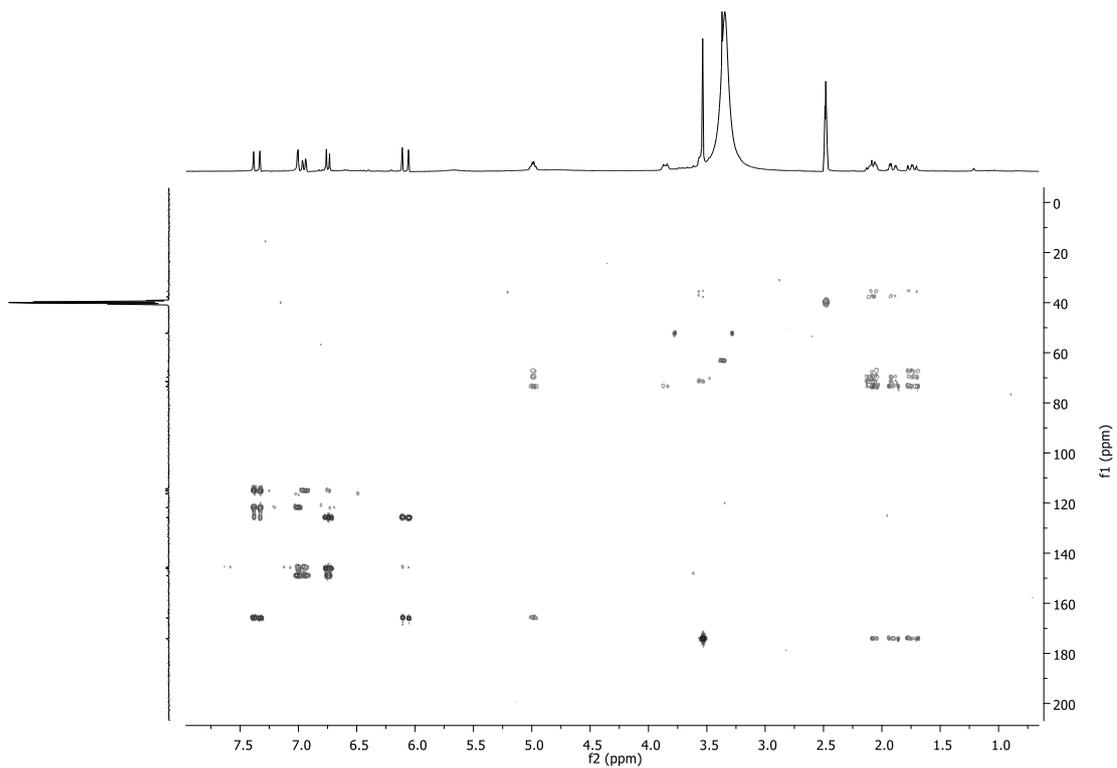
ANEXO 8: Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, em DMSO-d₆) substância 3



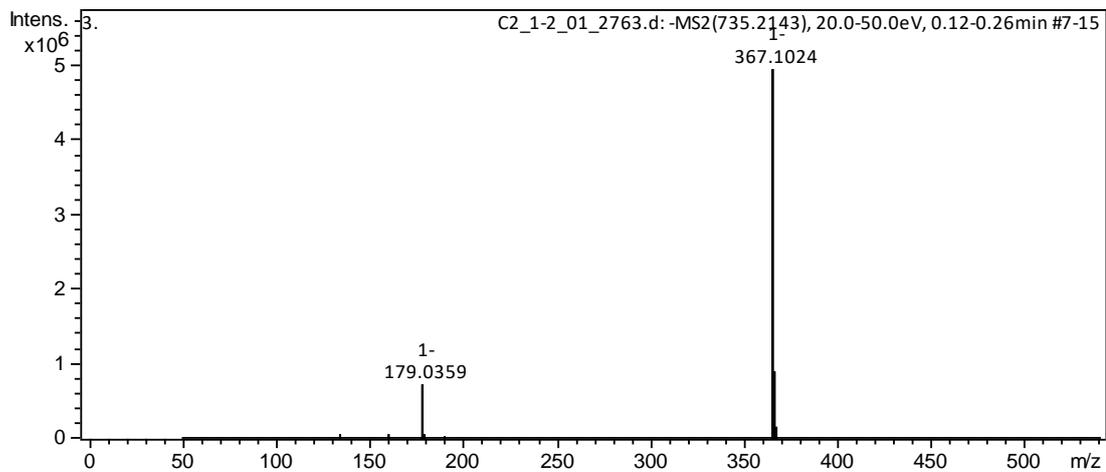
ANEXO 9: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, em DMSO-d₆) substância **3**.



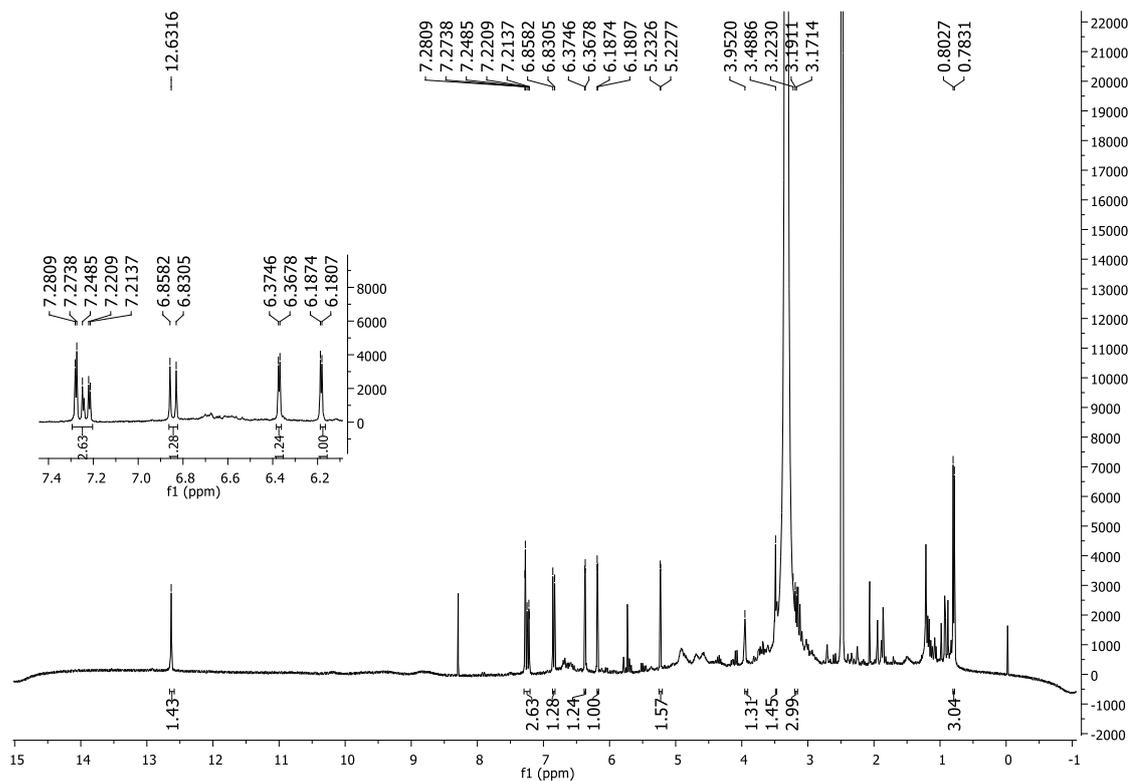
ANEXO 10: Mapa de contornos HMBC (300 MHz, DMSO-d₆) substância **3**.



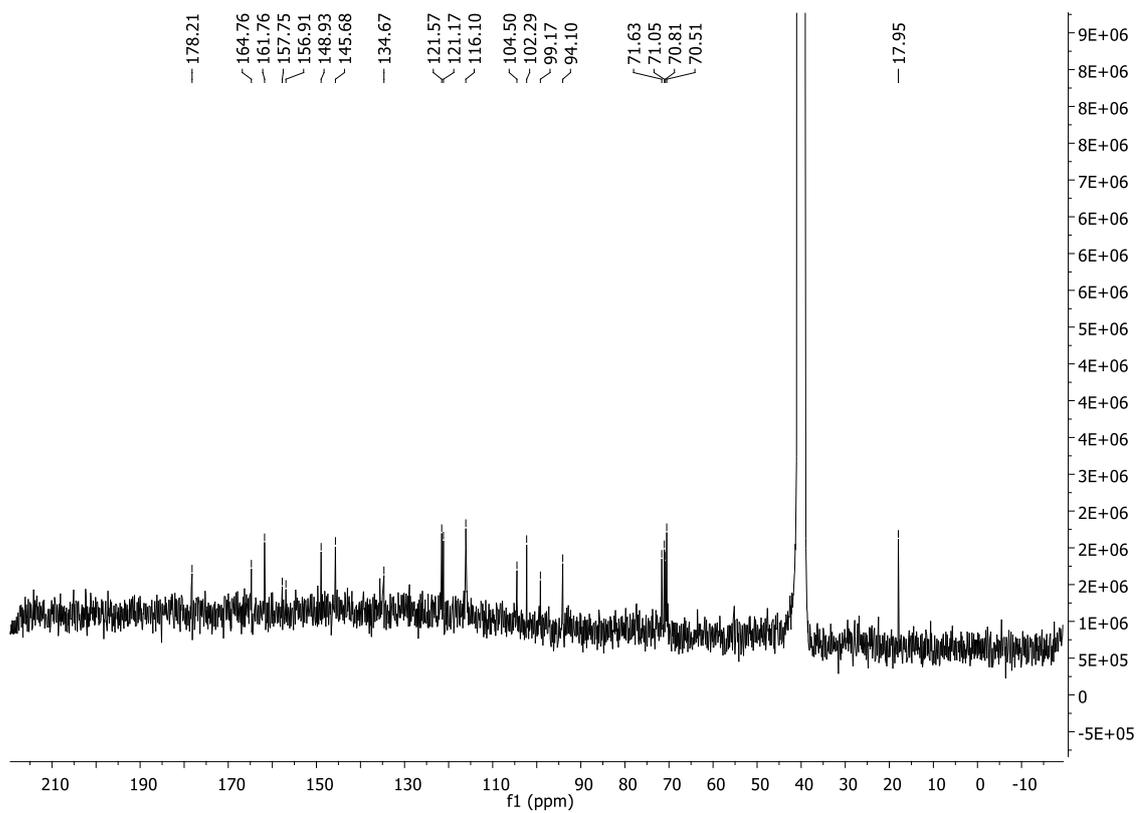
ANEXO 11: Espectro de Massas da substância **3**, com sistema ESI, faixa de m/z 0-550.



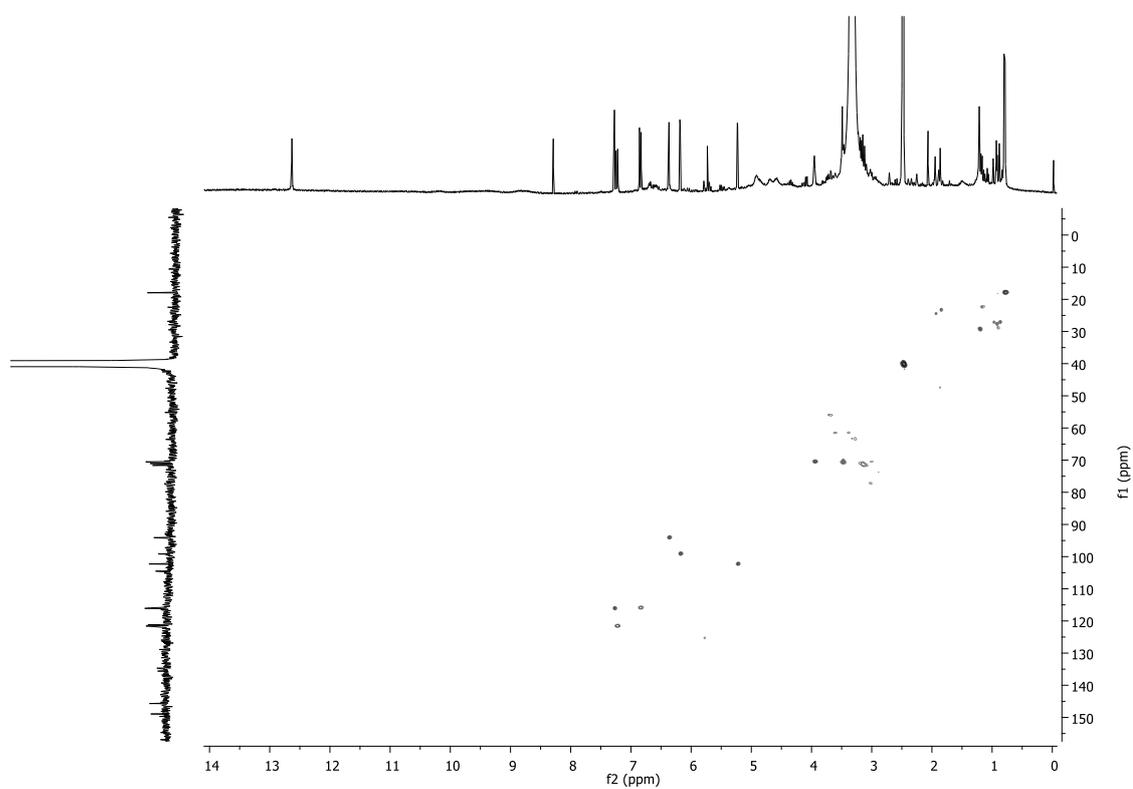
ANEXO 12: Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, em DMSO-d₆) substância **4**.



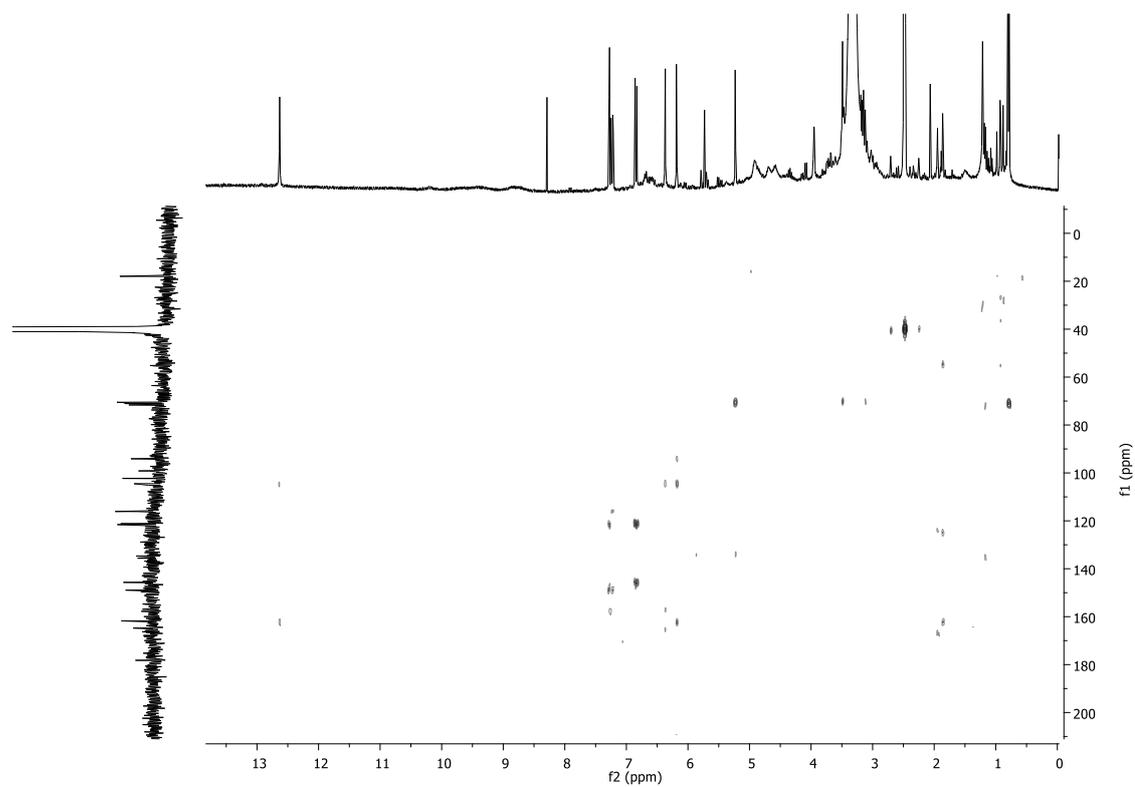
ANEXO 13:Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, em DMSO-*d*₆) substância **4**.



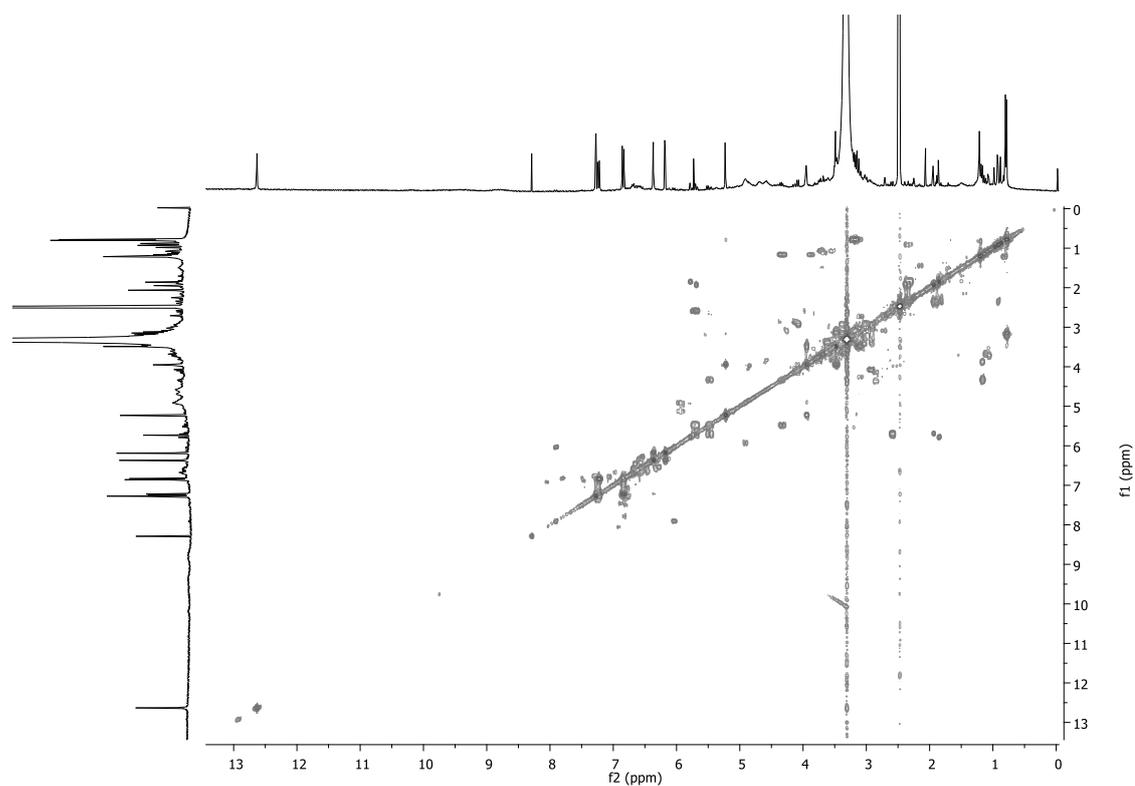
ANEXO 14:Mapa de contornos HSQC (300 MHz, DMSO- *d*₆) substância **4**.



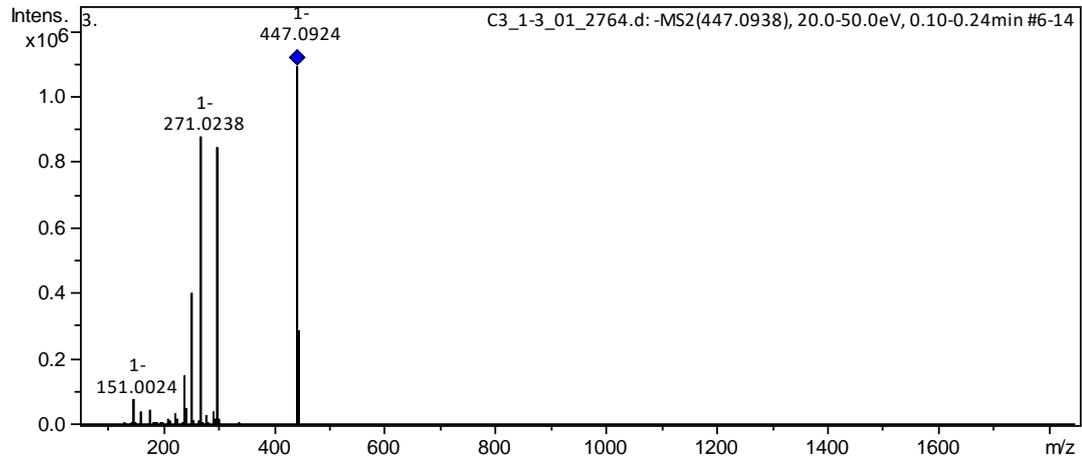
ANEXO 15: Mapa de contornos HMBC (300 MHz, DMSO- *d*₆) substância **4**.



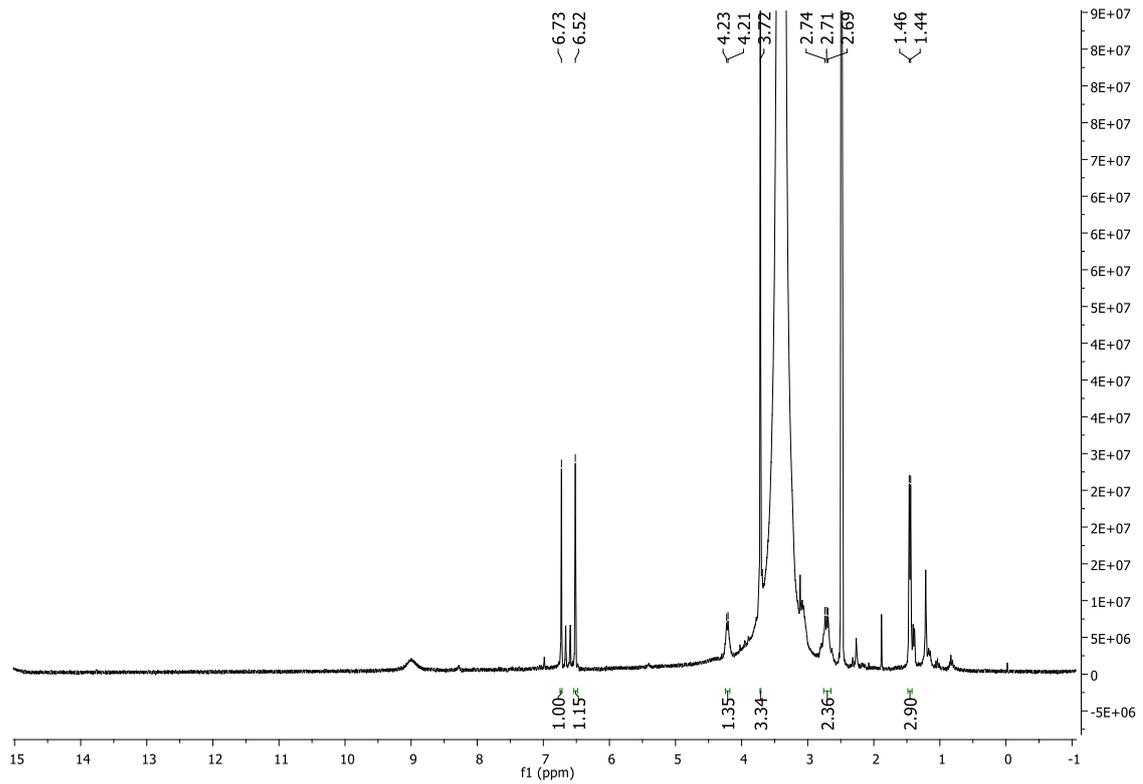
ANEXO 16: Mapa de contornos COSY (300 MHz, DMSO- *d*₆) substância **4**.



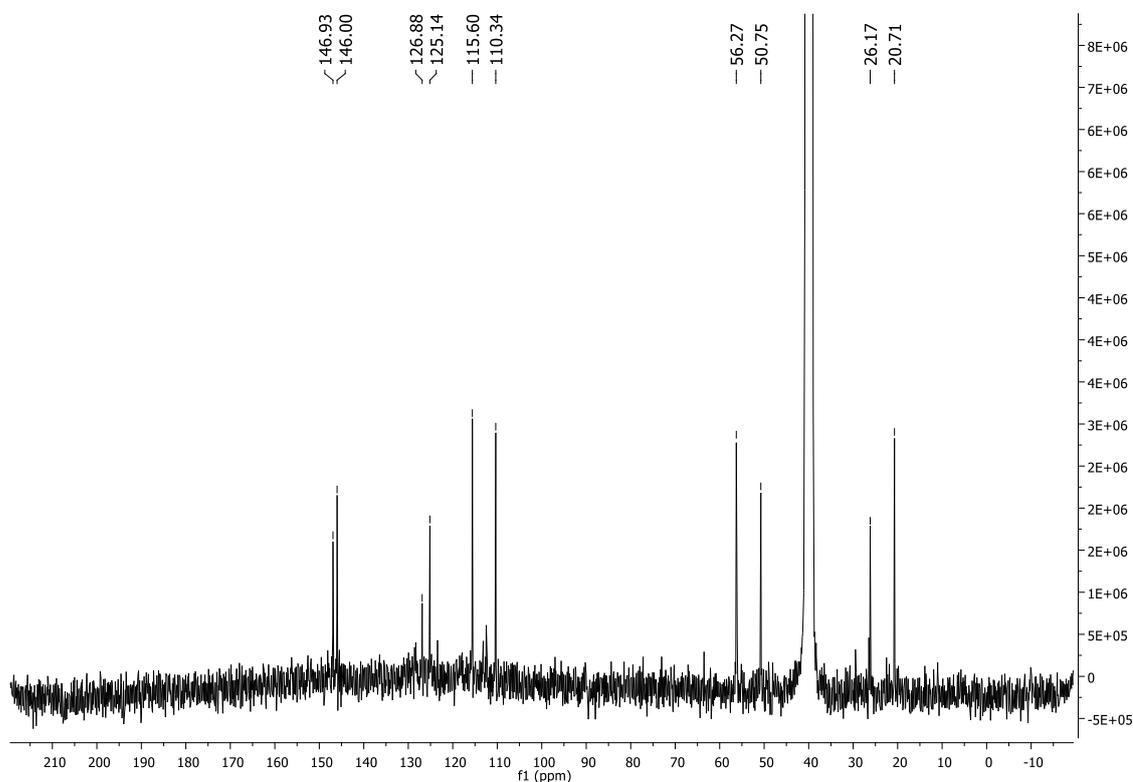
ANEXO 17:Espectro de Massas da substância **4**, com sistema ESI, faixa de 0-1800.



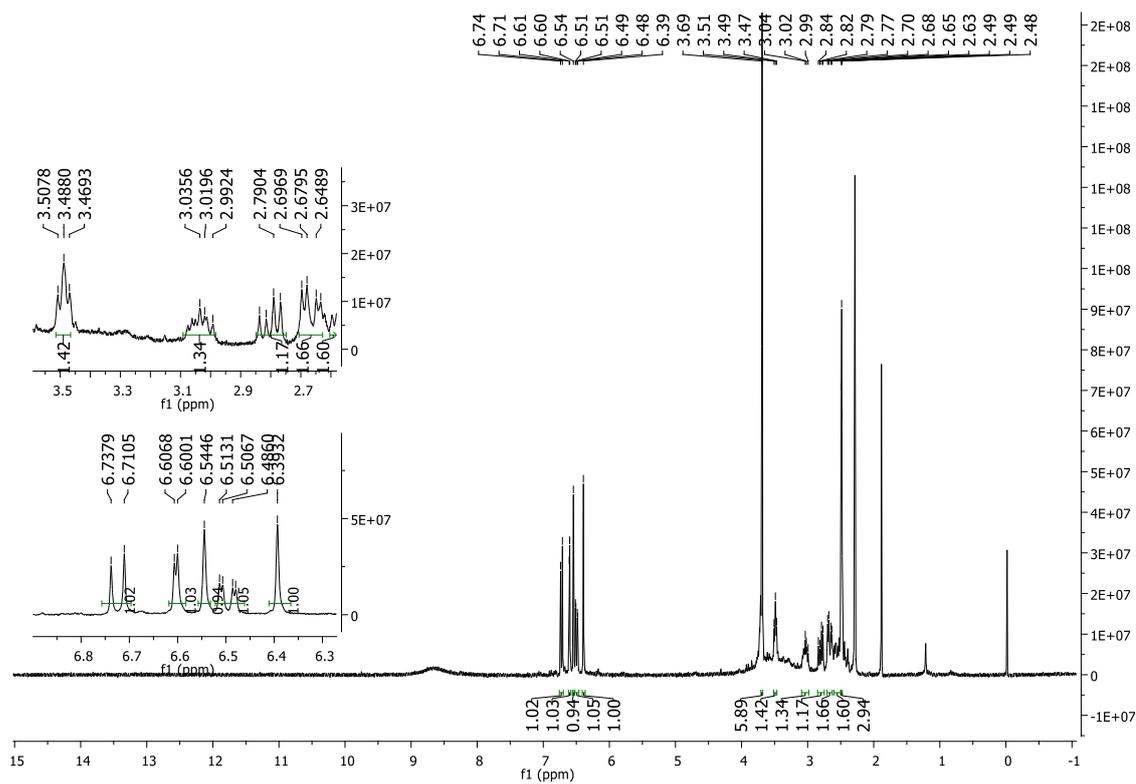
ANEXO 18:Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, em DMSO- *d*₆) substância **5**.



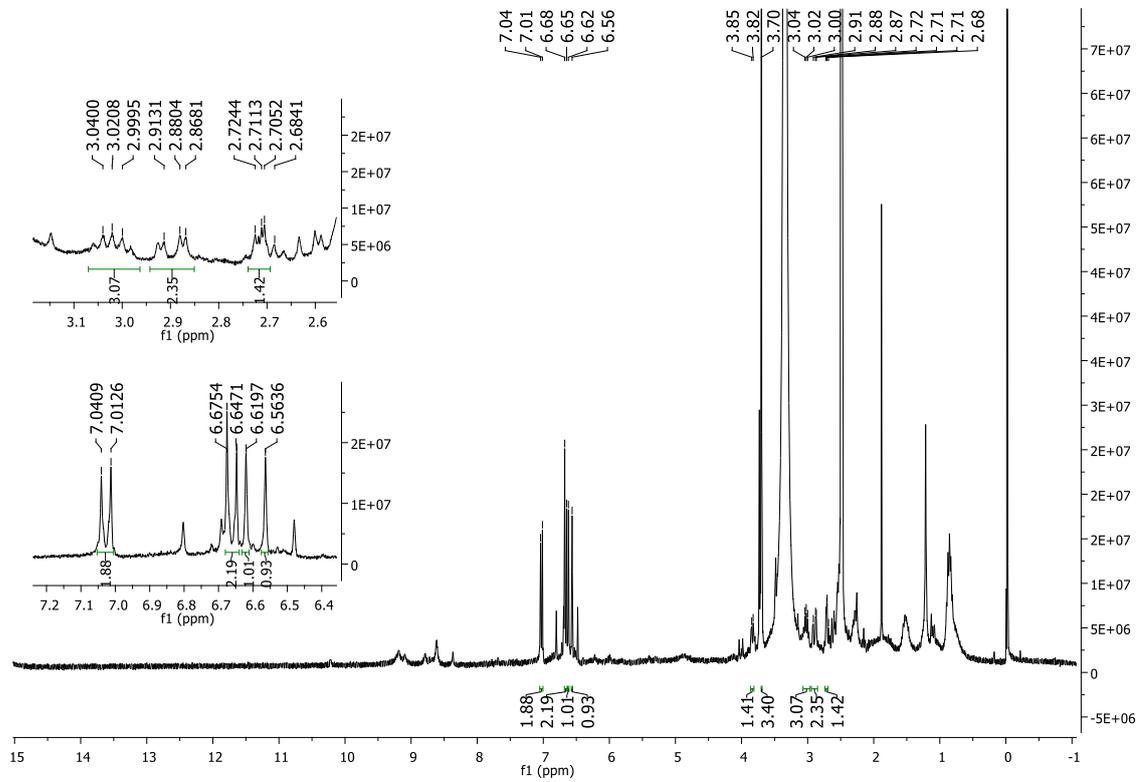
ANEXO 19: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, em $\text{DMSO-}d_6$) substância 5.



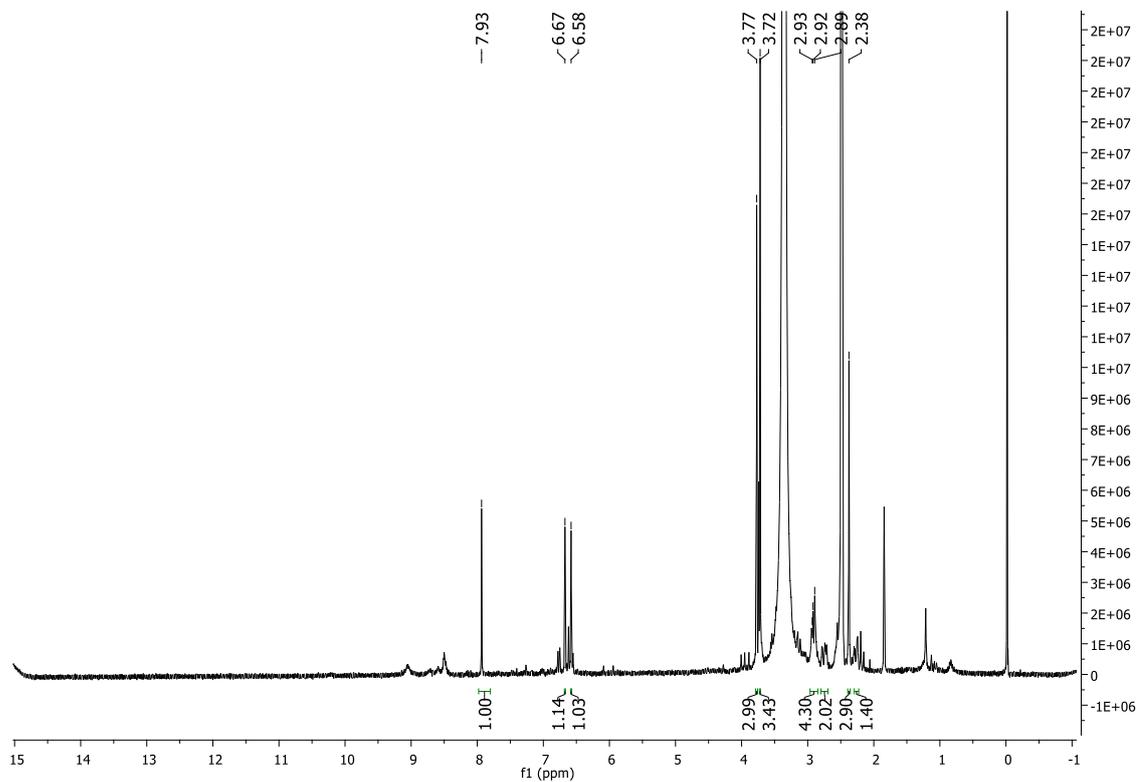
ANEXO 20: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, em $\text{DMSO-}d_6$) substância 6



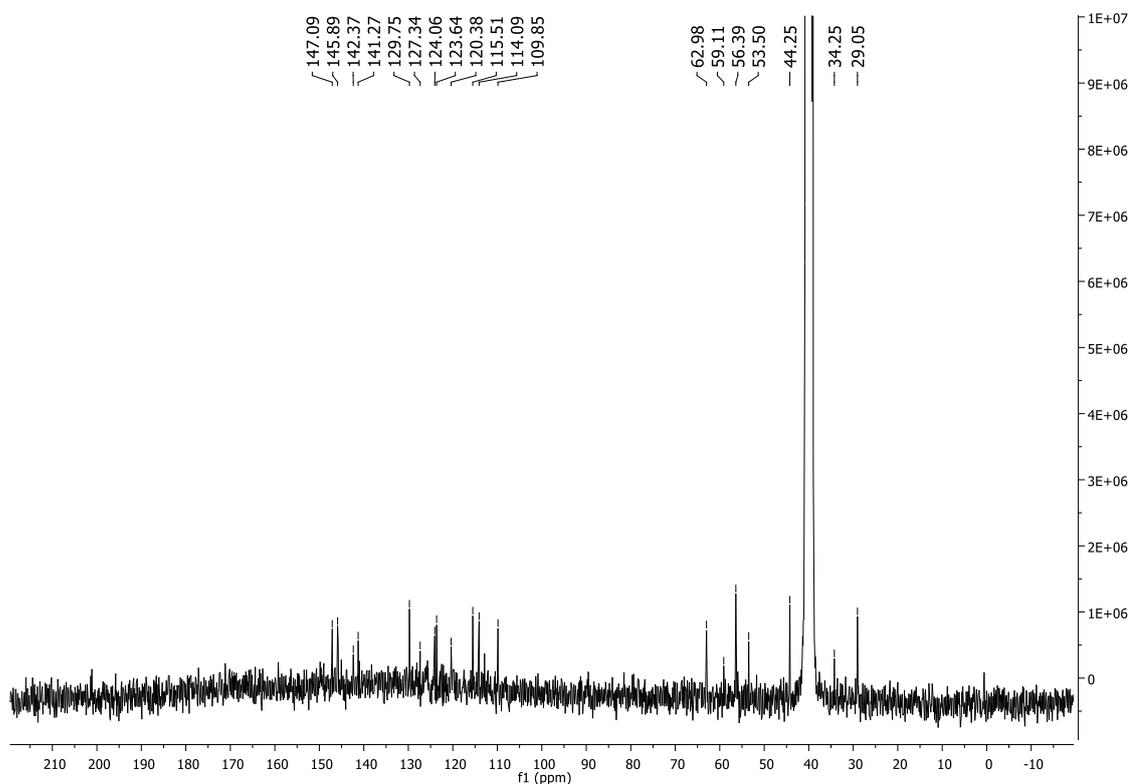
ANEXO 21: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, em DMSO- d_6) substância 7.



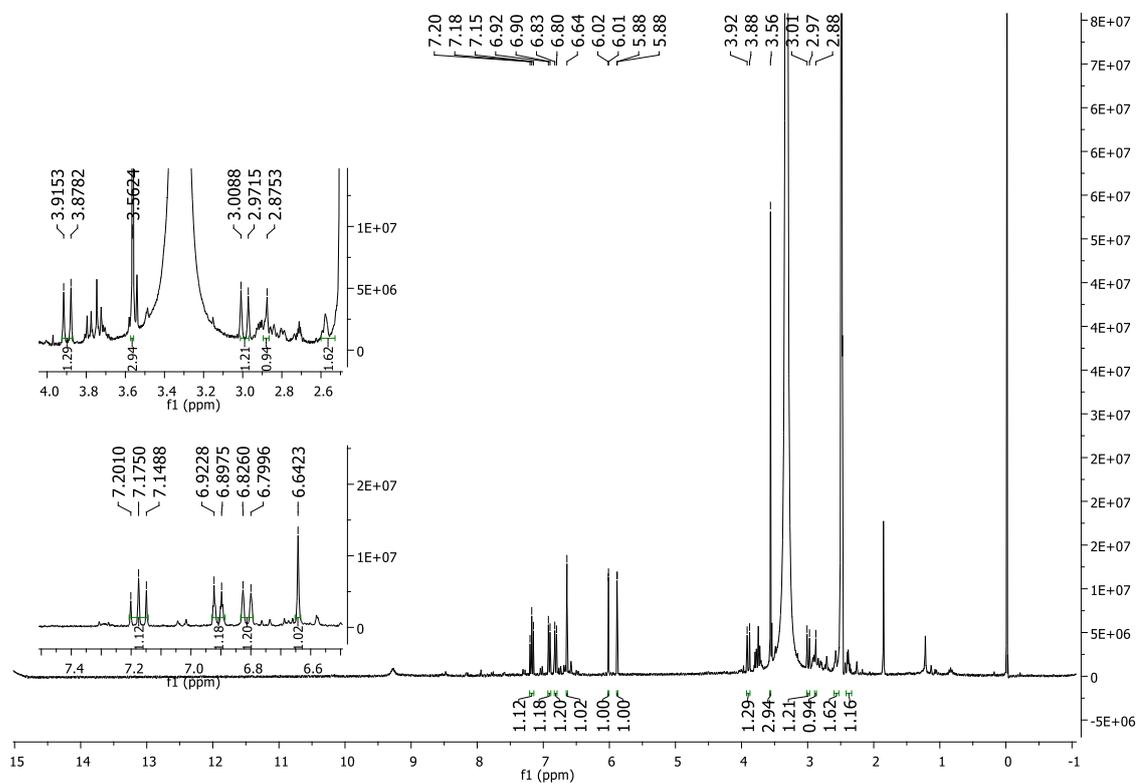
ANEXO 22: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, em DMSO- d_6) substância 8



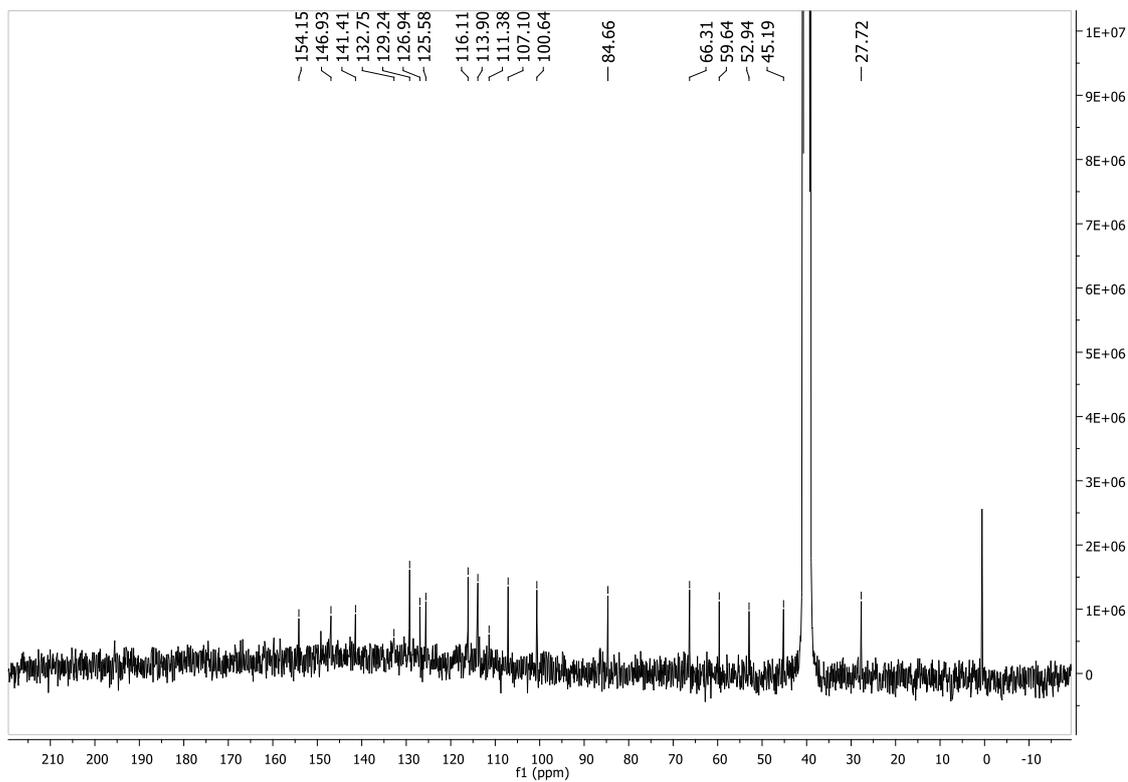
ANEXO 23: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, em DMSO-*d*₆) substância 8



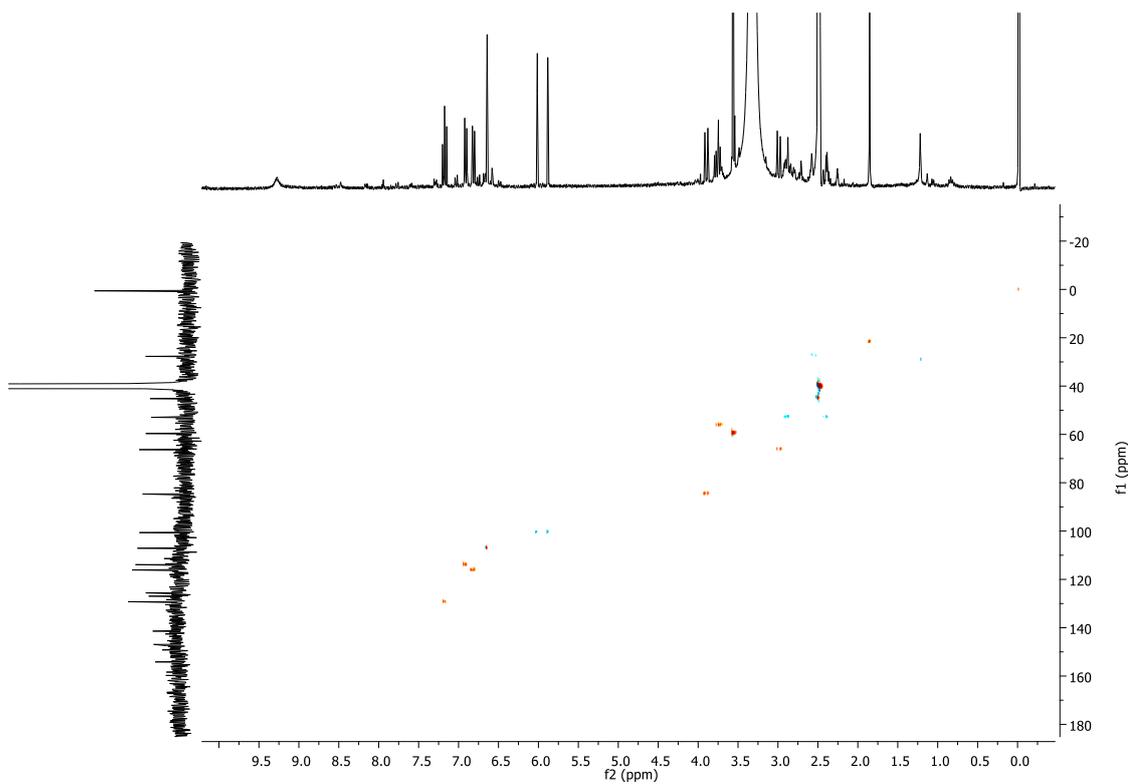
ANEXO 24: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, em DMSO-*d*₆) substância 9



ANEXO 25: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, em DMSO-*d*₆) substância **9**.



ANEXO 26: Mapa de contornos HSQC (300 MHz, DMSO-*d*₆) substância **9**.



ANEXO 27: Mapa de contornos HMBC (300 MHz, DMSO- *d*₆) substância **9**.

