

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

LIBARDONE JOSE RIBEIRO BRUSTULIM

**ANATOMIA FOLIAR E CAULINAR, CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E
ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Ocotea porosa* (NEES &
MART.) BARROSO: UMA ABORDAGEM INTERDISCIPLINAR**

PONTA GROSSA-PR

2019

LIBARDONE JOSE RIBEIRO BRUSTULIM

**ANATOMIA FOLIAR E CAULINAR, CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E
ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Ocotea porosa* (NEES &
MART.) BARROSO: UMA ABORDAGEM INTERDISCIPLINAR**

Dissertação apresentada como requisito à obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Setor de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientadora: Profa. Dra. Jane Manfron Budel

Coorientador: Prof. Dr. Paulo Vitor Farago

PONTA GROSSA-PR

2019

Ficha Catalográfica Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação
BICEN/UEPG

B912 Brustulim, Libardone Jose Ribeiro
 Anatomia foliar e caulinar, caracterização química e atividades
 biológicas do óleo essencial de *Ocotea porosa* (Nees & Mart.) Barroso:
 uma abordagem interdisciplinar / Libardone Jose Ribeiro Brustulim . Ponta
 Grossa, 2019.
 67 f.

 Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde - Área de Concentração:
 Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia),
 Universidade Estadual de Ponta Grossa.

 Orientadora: Profa. Dra. Jane Manfron Budel.
 Coorientador: Prof. Dr. Paulo Vitor Farago.

 1. Citotoxicidade. 2. Morfoanatomia. 3. Óleo essencial. 4.
 Antioxidante. 5. Imbuia. I. Budel, Jane Manfron. II. Farago, Paulo Vitor. III.
 Universidade Estadual de Ponta Grossa. Fármacos, Medicamentos e
 Biociências Aplicadas à Farmácia. IV.T.

CDD: 615

LIBARDONE JOSE RIBEIRO BRUSTULIM

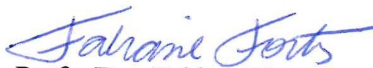
ANATOMIA FOLIAR E CAULINAR, CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA
E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO ÓLEO ESSENCIAL DE *OCOTEA*
POROSA (NEES & MART.) BARROSO: UMA ABORDAGEM
INTERDISCIPLINAR

Dissertação apresentada para obtenção do título de mestre em Ciências da Saúde na
Universidade Estadual de Ponta Grossa, Área de Atenção Interdisciplinar em Saúde.

Ponta Grossa, 11 de março de 2019.



Profa. Dra. Jane Manfron Budel – Orientador
Doutora em Ciências Farmacêuticas
Universidade Estadual de Ponta Grossa



Profa. Dra. Fabiane Fortes
Doutora em Ciências Médicas
Universidade Estadual do Paraná



Profa. Dra. Katia Sabrina Paludo
Doutora em Ciências
Universidade Estadual de Ponta Grossa



Profa. Dra. Patrícia Mathias Döll Boscardin
Doutora em Ciências Farmacêuticas
Universidade Estadual de Ponta Grossa

Dedico este trabalho à minha mãe Vilma, pelo apoio incondicional, e a todos que de alguma maneira contribuíram para que eu pudesse chegar até aqui.

AGRADECIMENTOS

À Deus, que sempre me manteve de pé, forte, iluminado e abençoado.

A amiga e professora Melissa Georgia Schwartz, pelo incentivo, apoio e motivação, em mais essa trajetória. Obrigado pelo aporte pedagógico, multiprofissional durante a confecção desse estudo. Muito obrigado.

À Professora Dra. Jane Manfron Budel, pela dedicação e paciência nas orientações, confiança e apoio em todos os momentos. Obrigada por me encorajar a superar meus limites.

Ao Professor Dr. Paulo Vitor Farago, por sempre ter me ajudado e apoiado, pelas aulas brilhantes de metodologia da pesquisa, que tanto contribuiu na construção desse estudo.

À Professora Dra. Katia Paludo, pela ajuda, dedicação e gentileza durante meu experimento, com os testes citotóxicos. Obrigada também pelas nossas conversas e por compartilhar sua experiência profissional comigo. sinto um carinho enorme por você. Sinto-me honrado em ter trabalho com você.

Ao professor Dr. Luís Antonio Esmerino, por me ensinar ajudar com os testes antimicrobianos, sempre de forma gentil e contribuindo no aspecto multidisciplinar. Muito obrigado.

À Professora Dra. Beatriz Helena Lameiro de Noronha Sales Maia, pelo auxílio na análise química dos óleos essenciais.

Aos Professores Edson Aires da Silva e Marta Borges Maia, pelo incentivo e exemplo como educadores.

À técnica do Laboratório de Farmacognosia Luciane Mendes Monteiro, pela dedicação e parceria na realização deste trabalho.

Aos amigos e colegas de mestrado Wagner Ozório D'Almeida, Valter Paes de Almeida, Paola Raeski, Lislaine Klider e Isabel Pietczak Migacz pela amizade e companheirismo.

A colega Bárbara Justus pela ajuda com as análises antimicrobianas.

Ao Acadêmico de iniciação científica, Kennon Rios Santos, pelo auxílio no experimento de citotoxicidade.

À senhora Lurdes Mundstock e Rafaeli de Paula Bueno, por ceder o material botânico utilizado na realização dessa pesquisa

Ao Laboratório Multiusuário (c-LABMU) pela.

À Universidade Estadual de Ponta Grossa pela oportunidade.

À Faculdades Integradas do Vale do Iguaçu – UNIGUAÇU, pelo apoio incondicional na realização dos experimentos, cedendo laboratórios e equipamentos. E pelo incentivo dado aos docentes para a realização do Mestrado.

RESUMO

Ocotea é um dos importantes gêneros da família Lauraceae e compreende cerca de 350 espécies, sendo encontradas, especialmente na América latina. No Brasil, espécies do gênero são importantes economicamente, pela utilização da madeira. Todavia a caracterização da espécie por estudos morfoanatômicos, químicos e atividades biológicas envolvendo o óleo essencial são precários. Esse trabalho teve como objetivo realizar o estudo da morfoanatomia das folhas de *Ocotea porosa* a fim de auxiliar na identificação desse táxon, determinar a composição química, investigar o potencial citotóxico e a atividade antioxidante do óleo essencial dessa espécie vegetal. O material botânico foi coletado em União da Vitória, Paraná, Brasil. A partir dos métodos usuais de microscopia óptica e eletrônica de varredura, ficou comprovado que as folhas são hipoestomáticas, possuem estômatos paracíticos e possuem tricomas tectores. A nervura central e o pecíolo são biconvexos e apresentam um feixe vascular colateral em arco aberto. O caule apresenta camada esclerenquimática e areia cristalina formada por oxalato de cálcio. Compostos fenólicos são encontrados na epiderme, floema e xilema da nervura central, pecíolo e caule. Por meio de hidrodestilação de folhas, obteve-se um teor de $1,03\% \pm 0,7\%$ de óleo essencial. Os componentes majoritários do óleo essencial de *O. porosa* identificados por CG-EM foram o biciclogermacreno (24,62%), α -pineno (19,71%) e β -pineno (13,86%). Quanto à citotoxicidade avaliada pelo método do MTT, o óleo essencial de *O. porosa* mostrou-se citotóxico para as linhagens celulares fibroblasto murino (McCoy, ATCC® CRL-1696), melanoma murino (B16F10) e adenocarcinoma de mama humano (MCF7). Desta forma não evidenciou seletividade contra as células tumorais em estudo. Quanto à análise antioxidante o óleo essencial evidenciou baixa atividade pelo método DPPH e não evidenciou ação inseticida e antimicrobiana.

Palavras-chave: Citotoxicidade. Morfoanatomia. Óleo essencial. Antioxidante, imbuia, IC₅₀.

ABSTRACT

Ocotea is one of the most important genera of the family Lauraceae and comprises about 350 species, being found, especially in Latin America. In Brazil, species of the genus are economically important for using the wood. However, the characterization of the species by morphological, chemical and biological activities involving the essential oil are precarious. The objective of this work was to study the morpho-anatomy of the leaves of *Ocotea porosa* in order to help in the identification of this taxon, determine the chemical composition, investigate the cytotoxic potential of the essential oil and the antioxidant activity. The botanical material was collected in União da Vitória (Paraná, Brazil). From the usual methods of optical microscopy and scanning electron microscopy, it has been proven that the leaves are hypostomatic, have paracytic stomata and have non-glandular trichomes. The central vein and the petiole are biconvex and have a collateral vascular bundle in an open arch. The stem has a sclerenchymatic layer and calcium oxalate crystals. Phenolic compounds are found in the epidermis, phloem and xylem of the central vein, petiole and stem. The main anatomical marker of the stem is the presence of a continuous sclerenchymatous sheath in the pith. Two shapes of calcium oxalate crystals namely crystal sand and raphides are observed in this species. By means of hydrodistillation of leaves, a content of $1.03\% \pm 0.7\%$ of essential oil was obtained. The essential oil of *O. porosa* were identified by GC-MS and the major compounds were bicyclogermacrene (24.62%), α -pinene (19.71%) and β -pinene (13.86%). As for cytotoxicity assessed by the MTT method, the essential oil of *O. porosa* was shown to be cytotoxic to the cell lines murine fibroblast (McCoy, ATCC® CRL-1696), murine melanoma (B16F10) and human breast adenocarcinoma (MCF7). Thus, there was no selectivity against the tumor cells under study. As for the antioxidant analysis, the essential oil did not show activity.

Keywords: Cytotoxicity. Morphoanatomy. Essential oil. Antioxidant. Imbuia.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - Estrutura química dos alcaloides.	17
FIGURA 2 - Distribuição da espécie <i>Ocotea porosa</i> (Nees & Mart.) Barroso no Brasil.....	20
FIGURA 3 - Exsicata de <i>Ocotea porosa</i> (Nees & Mart.) Barroso catalogada no herbário da UEPG	22
FIGURA 4 - Aparato de clewenger utilizado na extração de óleo essencial de <i>O. porosa</i>	32
FIGURA 5 - Morfoanatomia de <i>Ocotea porosa</i> (Nees & Mart.) Barroso	41
FIGURA 6 - Secções transversais (TS) de <i>Ocotea porosa</i> (Nees & Mart.) Barroso	42
FIGURA 7 – Testes histoquímicos da folha de <i>Ocotea porosa</i> (Nees & Mart.) Barroso	44
FIGURA 8 - Óleo essencial de <i>Ocotea porosa</i> (Nees & Mart.) Barroso extraído por meio de hidrodestilação.....	45
FIGURA 09 - Cromatograma do óleo essencial de <i>Ocotea porosa</i> (Nees & Mart.) Barroso...	47
FIGURA 10 - Espectro de massas do biciclogermacreno presente no óleo essencial <i>Ocotea porosa</i> (Nees & Mart.) Barroso... ..	49
FIGURA 11 - Espectro de massas do α - pineno presente no óleo essencial <i>Ocotea porosa</i> (Nees & Mart.) Barroso.....	49
FIGURA 12 - Espectro de massas do β - pineno presente no óleo essencial <i>Ocotea porosa</i> (Nees & Mart.) Barroso.....	50
GRÁFICO 1 - Viabilidade celular após 72 h de exposição à diferentes concentrações: óleo essencial de <i>Ocotea porosa</i> pelo método do MTT.	51
FIGURA 14 - Alterações morfológicas encontradas em linhagens celulares incubadas com 77 $\mu\text{g/mL}$ do óleo essencial de <i>O. porosa</i> por 24 horas. A: linhagem de adenocarcinoma de mama humano (MCF7) controle (incubada apenas com meio de cultura). B: MCF7 tratada com óleo de <i>O. porosa</i> . C: Linhagens celulares de melanoma murino (B16F10) controle (incubadas apenas com meio de cultura). D: B16F10 tratada com óleo essencial de <i>O. porosa</i> . É possível perceber alterações morfológicas importantes como condensação de cromatina ($\blacktriangle$), arredondamento celular ($\uparrow$) e formação de <i>blebs</i> ($\blacksquare$). Aumento 1000x, coloração de May Grunwald-Giemsa	56

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Índices de retenção e identificação dos compostos presentes no óleo essencial de <i>Ocotea porosa</i> (Nees & Mart.) Barroso	46
TABELA 2 - Valores de IC ₅₀ para as linhagens celulares incubadas com o óleo essencial de <i>Ocotea porosa</i> e os índices de seletividade (IS) das linhagens tumorais (B16F10 e MCF-7) em relação à linhagem não tumoral (McCoy).....	52
TABELA 3 - Média e desvio padrão das porcentagens de atividade antioxidante : método do DPPH• em diferentes concentrações, no tempo 30 min.....	54
TABELA 4 - Determinação da atividade antioxidante pela formação do complexo fosfomolibdênio.....	55
TABELA 5 - Referente à atividade antimicrobiana por microdiluição.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS

A	absorvância
AA	atividade antioxidante
AAR	atividade antioxidante relativa
ABRAF	Associação Brasileira dos Produtores de Floresta Plantada
ABTS	+ radical catiônico
a.C.	período cronológico antes do nascimento de Cristo
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
°C	graus Celsius
CG	cromatografia gasosa
CG-EM	cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia de massa
CIM	concentração inibitória mínima
cm	centímetros
DNA	ácido desoxirribonucleico
DMAPP	difosfato de dimetillalil
DPPH	radical livre 1,1-difenil-2-picrilhidrazila
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
et al.	expressão latina abreviada et alli, (=e outros)
FAA	fixador de tecidos vegetais constituído de formol, ácido acético e álcool etílico
FPP	pirofosfato de farnesil
GPP	difosfatogeramil
h	hora
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IC ₅₀	concentração necessária para reduzir 50 % de algo
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IPP	difosfato de isopentenil
L	Litro
m	metro
mg	miligrama
min	minuto
mL	mililitro
mm	milímetro
mmol	milimol
nº	número
Na ₂ SO ₄	sulfato de sódio
nm	nanômetro
OMS	Organização Mundial da Saúde
OH ⁻	íon hidroxil
O ₂ ⁻	íon superóxido
O ²	oxigênio singlete
OE	óleo essencial

ROS	espécies reativas de oxigênio
UFPR	Universidade Federal do Paraná
V	volume
µg	micrograma
µL	microlitro
µm	micrômetro
%	porcentagem

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1	PLANTAS MEDICINAIS	16
2.2	FAMÍLIA Lauraceae JUSS.....	18
2.3	O GÊNERO <i>Ocotea</i> Aubl.	19
2.3.1	<i>Ocotea porosa</i> (Nees & Mart.) Barroso.....	21
2.4	ÓLEOS ESSENCIAIS	23
2.5	Atividade citotóxica / antitumoral	25
2.6	Atividade antioxidante	26
2.7	Atividade inseticida	27
2.8	Atividade microbiológica	27
3	OBJETIVOS	29
3.1	OBJETIVO GERAL.....	29
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
4	MATERIAL E MÉTODO	30
4.1	OBTENÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO	30
4.2	PREPARAÇÃO DA AMOSTRA PARA MICROSCOPIA DE LUZ	30
4.3	MICROMEDIDAS.....	30
4.4	ANÁLISES HISTOQUÍMICAS	31
4.5	PREPARAÇÃO DA AMOSTRA PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA POR EMISSÃO DE CAMPO (FESEM).....	31
4.6	EXTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DO ÓLEO ESSENCIAL..	31
4.7	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL	32
4.8	AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	33
4.8.1	Atividade Citotóxica.....	33
4.8.1.1	Linhagens tumorais.....	33
4.8.1.2	Ensaio de viabilidade com MTT	33
4.8.1.3	Cálculo da Concentração inibitória mínima IC ₅₀	34
4.8.1.4	Cálculo do índice de seletividade.....	34
4.8.2	Atividade Antioxidante.....	34
4.8.2.1	Método da redução do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH)34	34
4.8.2.2	Determinação da atividade antioxidante: formação do complexo fosfomolibdênio... 35	
4.8.3	Atividade inseticida.....	36
4.8.3.1	Criação dos insetos.....	36
4.8.3.2	Bioensaio tópico.....	36
4.8.3.3	Bioensaio residual.....	37
4.8.3.4	Bioensaio fumigação.....	37
4.8.4	Atividade antimicrobiana.....	38
4.8.4.1	Método micro diluição em caldo.....	38
5	ANALISE ESTATÍSTICA	39
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
6.1	ESTUDOS ANATÔMICOS	40
6.2	EXTRAÇÃO E TEOR DO ÓLEO ESSENCIAL (EO)	45
6.3	IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS	45
6.4	AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS	50
6.4.1	Citotoxicidade	50
6.4.1.1	Determinação da citotoxicidade e IC ₅₀ do óleo essencial de <i>Ocotea porosa</i>	50
6.4.2	Análise morfológica	53

6.4.3	Atividade antioxidante	54
6.4.3.1	Método da redução do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH)	54
6.4.3.2	Determinação da atividade antioxidante: formação do complexo fosfomolibdênio	55
6.4.4	Atividade inseticida	56
6.4.5	Atividade microbiológica	56
7	CONCLUSÃO	57
	REFERÊNCIAS	58

1 INTRODUÇÃO

Os vegetais têm sido utilizados por diversas civilizações desde a antiguidade tanto como fonte alimentar quanto na utilização como fármacos para o tratamento de várias patologias (DUTRA et al., 2016). A prática milenar do uso de plantas medicinais tornou-se parte fundamental no processo evolutivo, contribuindo de forma significativa para o desenvolvimento tecnológico (VANDERLINDE et al., 2012; SOUZA et al., 2011).

O tratamento de doenças utilizando produtos naturais de origem vegetal apesar de serem consideradas formas antigas da prática medicinal são utilizadas por diversas comunidades no mundo todo e servem de base para a pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos (DAVID, WOLFENDER, DIAS, 2015, LAHLOU, 2013). Estima-se que 80% da população dos países em desenvolvimento dependam das plantas medicinais para seus cuidados primários em saúde (PICKING, 2017).

O ecossistema brasileiro, rico em diversidade principalmente vegetal, possui matéria prima para ensaios e análises de novos fármacos aplicados no tratamento de diferentes doenças, uma vez que são muitos os compostos químicos vegetais que apresenta (RUFATTO et al., 2013).

Dessa forma, para garantir que o uso de uma planta seja seguro e eficaz é essencial o desenvolvimento de ensaios farmacológicos e toxicológicos (BLASS, 2015; CHAVEERACH, SUDMOON; TANEE, 2017). Considerando o desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos são necessárias diversas pesquisas de caráter multidisciplinar, pois esses estudos envolvem diversas áreas do conhecimento a exemplo da botânica, agronomia, química, farmacologia, etnofarmacologia, toxicologia, desenvolvimento tecnológico, entre outros (MACIEL, et al., 2002).

Espécies de Lauraceae se destacam entre as outras famílias botânicas pela sua importância econômica. Diversas espécies são utilizadas pelas indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética, especialmente porque são produtoras de óleos essenciais. Muitas espécies ainda têm uso medicinal restrito às comunidades tradicionais que detêm o conhecimento empírico da utilização dessas plantas (MARQUES, 2001).

Ocotea Aubl. é um dos gêneros mais representativos da família Lauraceae com 428 espécies (THE PLANT LIST, 2018), sendo 169 espécies ocorrendo no Brasil (*Ocotea* na Flora do Brasil 2020 em construção). Os representantes brasileiros mais importantes do gênero são *O. porosa* (Nees & Mart.) Barroso e *O. pretiosa* Mez. (VATTIMO-GIL, 1980). A

taxonomia e a delimitação do gênero são problemáticas, especialmente em relação à *Cinnamomum* e *Nectandra* (ROHWER, 1986).

Investigações de atividades biológicas de espécies de *Ocotea* têm mostrado resultados significativos, principalmente para as atividades antioxidante, citotóxicas e inseticidas (SILVA, 2017). Muitas das atividades biológicas de espécies de *Ocotea* estão relacionadas à presença dos óleos essenciais, entretanto a quantidade e a qualidade dos componentes dos óleos essenciais podem variar dependendo do órgão da planta, métodos utilizados para extração e armazenamento, e com as características edáfica e ambientais. Nesse sentido, é importante o estudo da composição química do óleo essencial, pois este interfere diretamente nas atividades biológicas (SAULLE et al., 2018).

Ocotea porosa (Nees & Mart.) Barroso, conhecida popularmente como imbuia, canela-imbuia, canela-preta e canela-broto, apresenta *Oreodaphne porosa* Ness, *Phoebe porosa* (Nees & Mart.) Mez e *Cinnamomum porosum* (Nees & Mart.) Kosterm como sinônimas (THE PLANT LIST, 2018).

O. porosa possui escassos estudos anatômicos e histoquímicos, de composição química e de atividades biológicas do óleo essencial extraído de folhas. Adicionalmente, há estudo do óleo essencial de *O. porosa* apenas extraído da madeira dessa espécie vegetal (WEYERSTAHL et al., 1994; REYNOLDS, 1995).

Considerando as atividades biológicas de espécies de *Ocotea*, a ausência de estudos dos constituintes do óleo essencial extraído de folhas de *O. porosa* e a carência de estudos anatômicos e histoquímicos, o objetivo desse trabalho foi fornecer caracteres micrográficos de folha e caule a fim de auxiliar na identificação da espécie, determinar os constituintes químicos e as atividades antioxidante, citotóxica, inseticidas e antimicrobianas do óleo essencial de *O. porosa*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PLANTAS MEDICINAIS

A humanidade sempre utilizou plantas para sua alimentação e também para o tratamento de doenças. Registros anteriores a Cristo demonstravam o uso de plantas como medicamentos (CRAGG, NEWMAN, 2016, DUTRA, 2016). Na Mesopotâmia encontrou-se o primeiro registro do uso de plantas medicinais, no qual eram usados óleos das espécies de *Cedrus atlantica* (Endl.) Manetti ex Carrière, *Cupressus sempervirens* L. e *Papaver somniferum* L., estas espécies são utilizadas até hoje para o alívio de tosse, resfriados, infecções e inflamações. Foram encontrados em túmulos egípcios e datam de 3000 a.C., como o Papiro Hieratic e Papiro Ebers. No ano de 1500 a.C. foi encontrado o *Ebers Papyrus* que tem descrito 811 prescrições com uso de 700 medicamentos, incluindo cebola, papoula, coentro, mirra, aloe, anis entre outras espécies (ATANASOV, 2015; CRAGG, NEWMAN, 2016).

Na Babilônia, em 1770 a.C. foram encontrados registros que descreviam entre as drogas vegetais usadas para o tratamento de doenças o ópio, rícino, mirra, diversos minerais entre outros. Na medicina Indiana (Ayurveda e Riveda) os medicamentos usados atualmente são os mesmos desde 2000 a.C. incluindo plantas sagradas, além do sândalo, áloe, óleo de gergelim, óleo de rícino, gengibre, canabis, cravo, cardamomo, pimenta, entre outros. A medicina chinesa, famosa pelas técnicas de acupuntura, tem em seus apontamentos (3000 a.C.) evidências do uso de plantas medicinais como o anis, ginseng, ruibarbo, romã entre outros (ELUFIOYE; BADAL 2016; ATANASOV, 2015; CRAGG, NEWMAN, 2016).

As plantas também foram importantes para fixar grupos populacionais em determinadas regiões geográficas, estabelecendo suas culturas alimentar. As espécies vegetais desempenharam importante papel na história da descoberta de novas drogas para a medicina, sendo utilizadas para o tratamento de diversas doenças (CHE et al., 2017).

O estabelecimento do consumo de determinadas plantas por grupos populacionais com a baixa incidência de doenças levou cientistas a pesquisar a relação existente, como exemplo entre dieta mediterrânea e a menor incidência de câncer. Esta informação levou ao isolamento de diferentes compostos presentes em alimentos como por exemplo o β -caroteno, licopeno, curcumina, catequinas, antocianinas, resveratrol, entre outros compostos. No

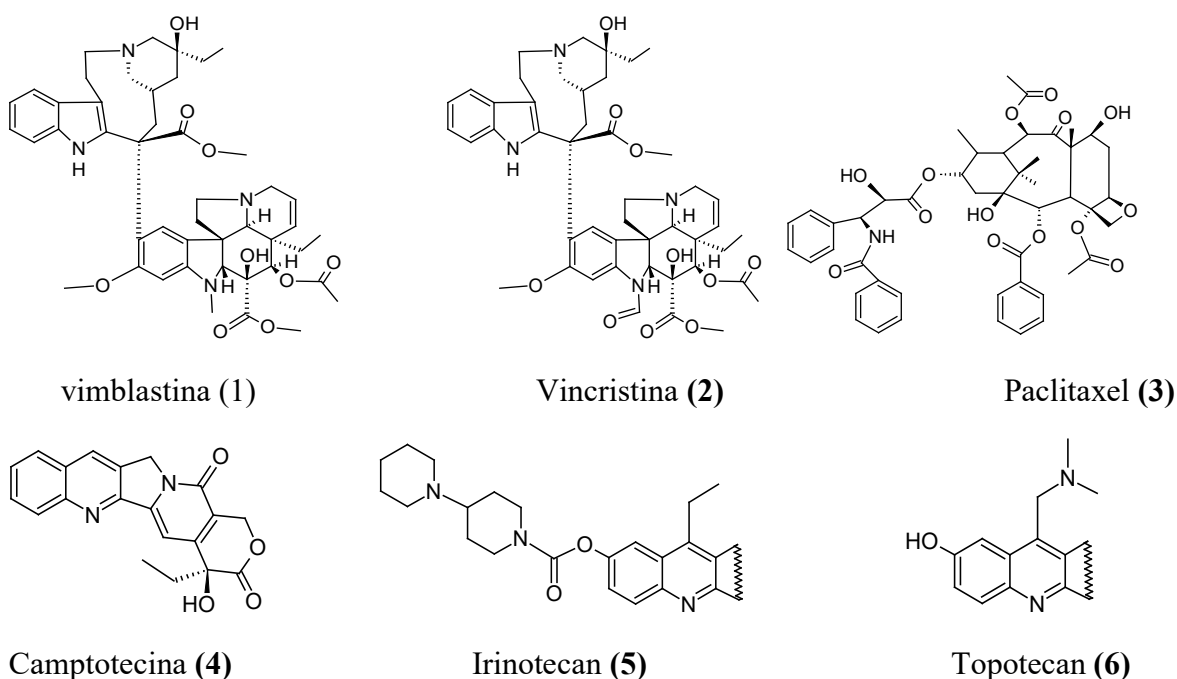
entanto, alguns sem efeito contra o câncer, mas que continuam sendo estudados para descobrir outras atividades biológicas (GORDON; CRAGG; PEZZUTO, 2016).

As plantas ainda fazem parte da medicina tradicional em todo mundo. Estima-se que 80% da população no mundo não tem acesso a medicina convencional, fazendo uso das plantas como a principal fonte para o tratamento de doenças (PFERSCHY-WENZIG; BAUER, 2015).

Devido a grande aplicabilidade das plantas na medicina tradicional, estudos da composição química e os efeitos biológicos de espécies vegetais tem sido cada vez mais enfatizados). Por exemplo, os alcaloides vimblastina (1) e vincristina (2), ambos isolados de *Catharanthus roseus*, o paclitaxel (3), isolado das cascas de *Taxus brevifolia*, e a camptotecina, isolada de *Camptotheca acuminata* Decne são fármacos utilizados no tratamento linfoma de Hodgkin, sarcoma de Kaposi, câncer de ovário e testículo e leucemia linfoblástica aguda infantil (BRANDÃO et al., 2010; CRAGG, NEWMAN, 2016).

O paclitaxel (3) (Taxol[®]), utilizado no tratamento de câncer de mama, ovário e pulmão, induz diferentes tipos de morte celular, seu exato mecanismo de citotoxicidade frente a células é amplamente estudado. Os análogos dos taxanos tem se mostrado importantes para o desenvolvimento de agentes antineoplásicos (CRAGG, NEWMAN, 2016; LEE et al., 2016).

FIGURA 1 - Estrutura química dos alcaloides.



Fonte: Autor, 2018.

A classe de agentes derivados da camptotecina **(4)**, um alcaloide isolado de uma árvore ornamental chinesa, *Camptotheca acuminata* Decne também oferece uma contribuição importante. O extrato da *C. acuminata* é utilizado no tratamento de atividade antitumoral e a camptotecina foi estabelecida como o componente ativo (CRAGG, NEWMAN, 2016; LEE et al., 2016).

Em ensaios pré-clínicos feitos na década de 70, a substância apresentou uma baixa atividade cancerígena e toxicidade para os rins, entretanto, pesquisas realizadas posteriormente, desenvolveram o irinotecan **(5)** e topotecan **(6)**, dois equivalentes da camptotecina, utilizados para câncer de ovário, pulmão e cólon-retal (BRANDÃO et al., 2010; CRAGG; NEWMAN, 2016).

Estima-se que existam entre 350.000 e 550.000 espécies de plantas, das quais menos de 20% foram investigadas. O Brasil detém aproximadamente 10% da flora mundial, sendo que menos de 1% de suas espécies já foram estudadas quanto a sua composição química e suas propriedades biológicas (KUMAR, 2015).

A fitoterapia representa aproximadamente 5% do mercado atual de medicamentos, devendo-se considerar as diferenças existentes no uso entre países desenvolvidos e em desenvolvimento, neste último, o uso de produtos a base de plantas medicinais para o tratamento de doenças chega a representar 80% dos medicamentos usados.

A pesquisa científica com produtos naturais para a descoberta de compostos biologicamente ativos bem como, suas estruturas químicas, é um passo importante para a evolução da ciência na busca de medicamentos que possam ser efetivos na cura das doenças (GORDON; CRAGG; PEZZUTO, 2016). No entanto, apenas uma pequena parcela do reino vegetal foi avaliada quanto as suas propriedades químicas e biológicas, assim, continua sendo importante a busca por novas biomoléculas ativas, bem como, a elucidação química e identificação das atividades biológicas (KUMAR, 2015).

2.2 FAMÍLIA Lauraceae JUSS.

Lauraceae é uma das maiores famílias das Angiospermas, sendo catalogadas aproximadamente 2.978 espécies divididas em 68 gêneros (THE PLANT LIST, 2018). Essa família vem sendo apontada como uma das mais representativas, tanto em número de indivíduos quanto em riqueza de táxons nos inventários florísticos e fitossociológicos (BROTTO; CERVI; SANTOS, 2013).

Espécies de Lauraceae apresentam ampla distribuição geográfica, no entanto, é na América do Sul onde ocorre a maior concentração de diversidade de espécies. No Brasil, essa família apresenta 24 gêneros com 438 espécies registradas, distribuídas de Norte a Sul do país (FLORA DO BRASIL 2020, em construção, 2018).

Espécies de Lauraceae são importantes economicamente, pois são utilizadas na marcenaria e construção civil, na fabricação de papel, na indústria química, farmacêutica e de perfumes (MARQUES et al., 2001). Muitas espécies são também utilizadas na culinária a exemplo do louro (*Laurus nobilis* L.) Além do uso como condimento na culinária, essa espécie era utilizada pelos gregos e romanos para confeccionar coroas, com as quais se homenageavam guerreiros e atletas vitoriosos (BROTTO; CERVI; SANTOS, 2013).

Outra espécie de destaque é *Persea americana* Mill., procedente da América Central, reconhecida pelo alto valor nutricional da polpa dos seus frutos, do mesocarpo e da semente, e também do óleo que é utilizado na para a fabricação de cosméticos. A canela (*Cinnamomum zeylanicum* Blume) também merece lugar de destaque entre as espécies de Lauraceae, pois, especialmente suas cascas são muito utilizadas na medicina e na culinária (BROTTO; CERVI; SANTOS, 2013).

Em vestígios da Floresta Atlântica, Lauraceae tem grande representatividade tanto pela numerosa população, quanto pela riqueza de táxons (QUINET; ANDREATA, 2002). Entre esses, destacam-se as espécies produtoras de madeira, a exemplo de *O. porosa* (BRITO, 2009). Decorrente da exploração econômica, cerca de 36 espécies dessa família estão sob ameaça de extinção (IUCN, 2018). Adicionalmente, de acordo com a Portaria nº 443/2014 do Ministério do Meio Ambiente no Brasil, diversas espécies da família encontram-se nas categorias “vulneráveis”, “ameaçadas” e “criticamente em perigo” (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2014).

2.3 O GÊNERO *Ocotea* Aubl.

O gênero *Ocotea* é dos mais representativos da família Lauraceae, sendo descrito primeiramente por Aublet (1775) e tendo como espécie-tipo *O. guianensis* Aubl. É considerado o maior gênero no Neotrópico, apresentando aproximadamente 792 espécies distribuídas do México e sul da Flórida até a Argentina, das quais 140 ocorrem no Brasil (THE PLANT LIST, 2018), onde 84 são endêmicas. O estado do Paraná possui representação muito significativa em quase todas as formações florestais e campestres (BROTTO; CERVI;

SANTOS, 2013). Algumas espécies de *Ocotea* aparecem entre as dominantes no estrato arbóreo da Floresta Ombrófila Densa e Floresta Ombrófila Mista (RODERJAN et al., 2001). A figura 2 mostra a distribuição da espécie *Ocotea porosa* no Brasil.

FIGURA 2 – Distribuição da espécie *Ocotea porosa* (Nees & Mart.) Barroso no Brasil.



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

Nas florestas Paranaenses, *Ocotea* se encontra entre os gêneros mais abundantes, representado por 11 espécies na Floresta Ombrófila Mista e 18 espécies em na Floresta Ombrófila Densa e, ainda 8 espécies em Floresta Estacional Semidecidual, (SCHEER, BLUM, 2011).

Araucaria angustifolia (Bertol.) Kuntze é uma das principais espécies associadas à Floresta Ombrófila Mista e integram-se a ela diversas espécies, destacando-se *Campomanesia xanthocarpa* (Mart.) O.Berg (gabioba), *Cedrela fissilis* Vell. (cedro-rosa), *Dicksonia sellowiana* Hook. (xaxim-bugio), *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil. (erva-mate), *O. odorifera* (Vell.) Rohwer (canela-sassafrás), *O. porosa* (imbuia), *Podocarpus lambertii* Klotzsch ex Endl. (pinheiro-bravo), entre outras (MAACK, 2002).

Ocotea apresenta grande variação morfológica, servindo como última opção para espécies que não são prontamente acomodadas em outros gêneros (VAN DER WERFF 1991). Coe-Teixeira (1980) afirma que os gêneros *Nectandra* e *Ocotea* são muito difíceis de distinguir, sendo possível identificá-los apenas pela posição das glândulas basais e da forma

das anteras. Adicionalmente, a plasticidade morfológica, o grande número de espécies, a inexistência de estudos taxonômicos atualizados, e a carência de coletas associadas a determinações pouco precisas torna esse grupamento vegetal de difícil taxonomia (BROTTO; CERVI; SANTOS, 2013).

O estudo realizado por DAMASCENO (2017) mostra que a morfologia dos estames e o desenvolvimento da cúpula do fruto são considerados os caracteres morfológicos de maior importância pelos especialistas na família, e são usualmente empregados nas chaves de identificação, para a 36 separação entre espécies de Lauraceae (COE-TEIXEIRA, 1980; BROTTO; CERVI; SANTOS, 2013).

As espécies de *Ocotea*, *O. catharinensis* Mez., *O. odorifera* (Vellozo) Rohwer e *O. porosa* são conhecidas popularmente como imbuias e têm alto valor comercial tanto de sua madeira quanto dos óleos essenciais que delas são extraídos. Devido à importância econômica, especialmente na Mata Atlântica do Brasil, essas espécies têm sofrido exploração predatória, o que levou as espécies ao estado de vulnerabilidade (MARTINS et al., 2014).

2.3.1 *Ocotea porosa* (Nees & Mart.) Barroso

Ocotea porosa, conhecida popularmente como imbuia, canela-imbuia, imbuia-amarela, imbuia-preta e imbuia-zebrina, é uma árvore monóica que pode atingir 7 m de altura e diâmetro de 50-150 cm na altura do peito. O caule é grosso, tortuoso, formando copa ampla, pouco densa, sendo as folhas simples, alternas e verde-claras. A inflorescência se apresenta como racemos simples ou subracemosos corimbosos, sendo as flores hermafroditas, pequenas, amareladas e os estames externos (típicos de *Ocotea*) quase sésseis. O fruto da imbuia é uma baga globosa (esférica), de 13 a 17 mm de diâmetro, com superfície lisa, pesando 1,2 a 2,3 g, o qual deve ser despulpado para a retirada da semente (KALIL FILHO et al., 2004; 2005). A semente apresenta superfície lisa, contendo inúmeras estrias, medindo de 12 a 15 mm de diâmetro (SIMEONE; KALIL FILHO, 2010).

A figura 3 mostra a exsiccata da espécie *Ocotea porosa*, confeccionada e depositada no herbário da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

FIGURA 3 – Exsicata de *Ocotea porosa* (Nees & Mart.) Barroso, catalogada no herbário da UEPG.



Fonte: Autor 2018

O. porosa é encontrada nos estados do sul, sudeste, centro-oeste e nordeste do Brasil, concentrando-se em vastas áreas no norte do Estado de Santa Catarina, onde foi considerada árvore mais importante depois do pinheiro-brasileiro, imprimindo a fisionomia à paisagem (BRITO, 2009). Essa espécie, possivelmente seja a espécie arbórea mais longeva da "floresta de araucária", podendo ultrapassar 500 anos de vida (CARVALHO, 1994). É tolerante à sombra até cerca de 1 m de altura. Indivíduos de tamanho maior em ambientes pouco iluminados não são encontrados no interior de florestas, o que indica uma possível mudança de comportamento em relação à luminosidade (AMATO; MARQUES, 2001).

A madeira de imbuia por muito tempo foi manipulada na confecção de móveis diversos, sendo considerada como artigo de luxo. A madeira empregada para movelaria, exportada e suas qualidades estéticas são universalmente apreciadas. Foi também utilizada na construção civil usada como vigas, caibros, ripas, forro, tábuas e tacos para assoalhos, marcos ou batentes de portas e janelas, venezianas, molduras e lambris. Na carpintaria e marcenaria também recebeu destaque sendo muito requisitada para obras de entalhes, coronha de arma de fogo, estaca, piquete, esquadrias, instrumentos musicais, escadarias, dormentes e hidráulicas (CORRÊA, 1969).

2.4 ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais (OE) são produtos do metabolismo secundário de algumas plantas, denominadas aromáticas por possuírem atividades conservantes, terapêuticas e por darem sabor agradável aos alimentos. Os OEs são utilizados há muitos anos por diversas civilizações. O uso de plantas aromáticas data de 10.000 anos a.C. (KUBECZKA, 2016) e Paracelsus Von Hohenheim, no século 16, foi o primeiro a utilizar o termo “óleo essencial”, que significa “a alma da planta” ou “a quinta essência” para a cura (HENRIQUES; SIMÕES-PIRES; APEL, 2012). O aperfeiçoamento do uso dos OEs iniciou-se por volta do século XIII quando as farmácias começaram a produzir compostos denominados de óleos-remédios e a registrar as suas propriedades farmacológicas e efeitos fisiológicos nas Farmacopéias (BRITO, 2009).

Os OEs, conhecidos como essências, óleos voláteis e óleos etéreos, são complexas misturas de compostos voláteis de baixo peso molecular produzidos por organismos vivos e extraídos por métodos físicos, utilizando-se a planta inteira ou seus diferentes órgãos. Os compostos voláteis são derivados principalmente de três rotas biossintéticas, via do mevalonato formando os sesquiterpenoides, via do metil-eritritolfosfato produzindo monoterpenoides, e via do ácido chiquímico formando fenilpropanoides. Uma vez biossintetizado, os terpenoides podem sofrer diversas reações enzimáticas, a exemplo da isomerização e oxidação (RAUT; KARUPPAYIL, 2014; FRANZ, NOVAK, 2016).

Os compostos voláteis presentes nos OEs apresentam diversas funções ecológicas, como antibacterianos, antivirais, antifúngicos, inseticidas, inibidores da germinação, na proteção contra predadores, na atração de polinizadores, na proteção contra desidratação, elevação da temperatura, entre outros (SOLETTI, 2015). Os OEs podem ser biossintetizados

e acumulados em todos os órgãos das plantas e anatomicamente são armazenados em estruturas secretoras, a exemplo de cavidades, dutos e tricomas glandulares (BUDEL et al., 2018a).

OEs têm sido amplamente utilizados em todo o mundo e a demanda por produtos com alta qualidade está constantemente aumentando. Para garantir a qualidade, os OEs podem ser analisados por diferentes técnicas, a exemplo de métodos físicos, organolépticos, químicos, cromatográficos e análise espectroscópica (DO et al., 2015).

Grandes quantidades de OEs são produzidas anualmente e utilizadas nas indústrias de aromas, fragrâncias, cosméticos, farmacêutica e alimentícia (DO et al., 2015). Alguns OEs são produzidos em grande escala, por exemplo, em 2008, a produção de óleo de laranja era ~ 51.000 toneladas, óleo de hortelã-pimenta ~ 32.000 toneladas e óleo de limão ~ 9.200 toneladas (SAWAMURA, 2010).

Diversas famílias botânicas apresentam espécies aromáticas que têm sido alvo de pesquisa, por exemplo em dicotiledôneas, destacam-se Apiaceae, Asteraceae, Geraniaceae, Illiciaceae, Lamiaceae, Lauraceae, Myristicaceae, Myrtaceae, Oleaceae, Rosaceae e Santalaceae. Em monocotiledôneas, a plantas aromáticas são substancialmente mais restritas à Acoraceae, Poaceae and Zingiberaceae (FRANZ, NOVAK, 2016).

Diversas atividades biológicas de OEs têm sido encontradas e entre essas destacam-se: antibacteriana, antifúngica, antitumoral, antimutagênica, antidiabética, antinociceptiva, antiviral, anti-inflamatória, antitripanossoma, antimalárica, vasodilatadora, citotóxica e inseticida (HENRIQUES; SIMÕES-PIRES; APEL, 2007; FLORÃO et al., 2012; RAUT; KARUPPAYIL, 2014; BUCHBAHUR, BOHUSCH, 2016; PEREIRA et al., 2017; PERERA et al., 2011; BUDEL et al., 2018).

Comumente, nos OEs, são encontrados entre 20 e 60 compostos voláteis em diferentes concentrações, e estes são caracterizados por dois ou três componentes principais com concentrações mais altas em comparação com outros compostos presentes. Em geral, os compostos majoritários presentes nos OEs são os responsáveis pelas atividades biológicas (GUIMARÃES et al., 2012; RAUT, KARUPPAYIL, 2014).

A composição química dos OEs produzidos por uma espécie vegetal pode variar dentro da mesma espécie. Essa variação pode ocorrer por fatores edáficos e ambientais, presença de quimiotipos, além dos métodos utilizados para extração e armazenamento desses óleos essenciais (SOLETTI, 2015; SAULLE, 2018).

A família Lauraceae está entre as mais utilizadas por indústrias. As espécies *Cinnamomum camphora* (L.) Presl. e *Lindera benzoin* (L.) Blume são reconhecidas como algumas das principais espécies produtoras de óleos essenciais da família. *Cinnamomum camphora* (L.) Presl., popularmente conhecida como cânfora, é uma das espécies conhecidas desde a Grécia antiga (MARQUES, 2001).

Entre as espécies de *Ocotea* encontradas em Santa Catarina, destaca-se a espécie *O. pretiosa* (Nees) Benth & Hooke (canela-sassafrás), da qual se pode extrair um OE muito peculiar pelo seu odor característico, misto de cinamomo, sassafrás e rosa, semelhante à *O. costulata* Mez que apresenta agradável aroma de cânfora pela presença do OE na casca e na madeira.

Ocotea apresenta o maior número de espécies medicinais entre as Lauraceae. *O. aciphylla* (Nees) Mez é usada como tônico e estomáquico em infusões de folhas, enquanto que a casca é utilizada como anti-reumática e depurativa. Estudos etnobotânicos, mencionam o uso da folha para enrolar o cigarro em rituais de cura, por índios do Xingu, quando queimada, pode ter um efeito narcótico (MARQUES, 2001).

O. indecora Schott. é utilizada como sudorífica, anti-reumática e até anti-sifilítica, devido as propriedades do OE obtido da casca que é geralmente extraído do caule ou da raiz. O OE de *O. barcellensis* Mez, extraído da madeira, é utilizado no tratamento da pitiríase, enquanto que o OE de *O. opifera* Mart, extraído dos frutos, é utilizado no combate ao reumatismo e artrites (BRITO, 2009).

Uma avaliação preliminar realizada com *O. porosa* para testar a ação antifúngica do OE não apresentou inibição do crescimento dos organismos *Cladosporium sphaerospermum* e *C. cladosporioides* (BRITO, 2009).

2.5 ATIVIDADES CITOTÓXICAS

Atualmente, um problema considerado grave na saúde pública é a incidência de diversos tipos de câncer. Caracterizada pela multiplicação desordenada de células que invadem o organismo, tecidos e órgãos, o câncer, uma doença invasiva e agressiva, tem seu desenvolvimento acelerado e desordenado, com a capacidade de formar tumores, afetando o funcionamento do organismo (SAMPAIO; COSTA, 2017).

O câncer está sendo considerado uma doença de países desenvolvidos, há mais de quarenta anos. Porém observa-se também um crescente número de casos em países em

desenvolvimento, que possuem poucos recursos voltados à qualidade da Medicina (MORAES et al., 2017).

No Brasil, estimou-se para o ano de 2017, apontamentos sobre a ocorrência de aproximadamente 600 mil novos casos de câncer, incluindo os casos de pele não melanoma, reforçando a magnitude desse problema no país (ALVES; MORAIS NETO, 2015; MORAES et al., 2017).

Muitos estudos apresentam resultados promissores em relação a atividade citotóxica dos OEs de plantas contra células tumorais. Terpenoides tem se demonstrado atuantes na prevenção da proliferação de células tumorais através de necrose ou indução de apoptose. Nesse contexto, estudos de OEs e compostos voláteis presentes em espécies de *ocotea*, a exemplo de *O. caudata* (Nees) Mez, *O. cujumary* Mart. e *O. caniculata* (Rich.) evidenciaram ação citotóxica frente a diferentes linhagens celulares (DA SILVA et al., 2017).

2.6 ATIVIDADES ANTIOXIDANTES

A enorme quantidade de compostos fenólicos nos OE favorece os estudos com interesse focado ao seu potencial antioxidante, uma vez que os radicais livres e outras espécies reativas de oxigênio, quando existentes na constituição do organismo, favorecem várias alterações celulares que se relacionam à patologias diversas, entre elas doenças cardiopatias, câncer, diabetes, Alzheimer, entre outras (LI et al., 2012; MIGUEL, 2010).

OEs que possuem propriedade antioxidante comprovadas têm sido utilizados na indústria farmacêutica, de cosmético e, principalmente, na alimentícia. Como exemplo temos os óleos de orégano (*Origanum vulgare* L.), de menta (*Mentha* spp.) e alecrim (*Rosmarinus officinallis* L.). Entretanto, OEs com propriedades antioxidantes podem apresentar uso terapêutico, uma vez que o potencial antioxidante está ligado a uma série de atividades farmacológicas por representar uma proteção contra danos celulares causados por radicais livres e espécies reativas de oxigênio (HENRIQUES; SIMÕES-PIRES; APEL, 2007).

Dentre as atividades farmacológicas já encontradas em algumas espécies de *Ocotea*, destacam-se a antioxidante (BRUNI et al., 2004). Neste contexto, os OEs e seus componentes químicos isolados agem como antioxidantes naturais por conterem normalmente em sua estrutura química um anel benzeno com uma hidroxila funcional que atua como doador de elétrons seja ele o hidrogênio ou outro (AMIRI, 2012; DÖLL-BOSCARDIN, 2010).

2.7 ATIVIDADES INSETICIDAS

Extratos e substâncias químicas diversas são testados e muitas vezes utilizados num sistema agroecológico como praguicidas ou mesmo utilizadas como modelo de novos inseticidas necessários para uma produção orgânica (TAVARES et al., 2009).

Compostos bioativos provenientes de vegetais possuem ação repelente, inibição de crescimento e efeito tóxico, representando estratégias para o manejo e controle de insetos (CAVALCANTE et al. 2006).

Pesticidas sintéticos são amplamente usados como estratégia para o controle de pragas e doenças de plantas, porém sua aplicação ilimitada causa problemas diversos como o acúmulo de resíduos em produtos tratados, a contaminação do ambiente e o desenvolvimento de resistência das pragas entre outros (PRIETO, et.al. 2010).

Devido aos inconvenientes gerados pelo uso contínuo de agroquímicos convencionais, a necessidade de desenvolver novos biocontroladores para tratar pragas que afetam muitas plantas, fontes de alimentos ou uso industrial aumentou (PRIETO, et.al. 2010). Nesse sentido, OE extraídos de *O. odorifera* mostraram resultados promissores como inseticidas naturais no controle de *Sitophilus zeamais* (PINTO JUNIOR et al., 2006). Apesar dos OE estarem se destacando no controle de pragas, não se conhece a ação inseticida do OE de *O. porosa*.

2.8 ATIVIDADES MICROBIOLÓGICAS.

A utilização dos OEs com o objetivo de inibir a multiplicação bacteriana, pode ser demonstrado por diversos mecanismos, como por exemplo, a coagulação do citoplasma, alteração na membrana plasmática e nas proteínas de membrana e na degradação da parede bacteriana (CANTON et al., 2010).

Recentes pesquisas justificam o surgimento de novas espécies de microrganismos e novos perfis de resistência comparado aos antimicrobianos convencionais (MENDES et al., 2011). Terpenos, seus derivados oxigenados e terpenoides, incluindo compostos fenólicos são os grupos mais comuns presentes nos OEs. Esses grupamentos têm mostrado atividade contra vírus, fungos, bactérias e protozoários (PROBST, 2012).

A terapia da combinação entre antibiótico e extratos de plantas pode expandir o espectro antimicrobiano, evitando o aparecimento de resistência mutante e minimizando a

toxicidade. Muitas vezes o efeito sinérgico exercido pela a combinação de drogas, ultrapassa o seu desempenho individual, tornando o agente antibacteriano mais eficaz na inibição de uma espécie particular de micro-organismo (CHANDA; RAKHOLYA, 2011).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Realizar estudo anatômico de folha e caule, caracterizar quimicamente e investigar as atividades inseticida, antioxidante e citotóxica do óleo essencial de *Ocotea porosa* (Nees & Mart.) Barroso.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Coletar o material botânico de *O. porosa*;
- Promover a identificação botânica de *O. porosa*;
- Avaliar anatomicamente as folhas e caules de *O. porosa*;
- Extrair e determinar o teor de óleo essencial de folhas de *O. porosa*;
- Identificar e quantificar os compostos voláteis presentes no óleo essencial de *O. porosa*;
- Avaliar *in vitro* a atividade citotóxica do óleo essencial de *O. porosa*.
- Testar a atividade inseticida do óleo essencial de *O. porosa*.
- Determinar a atividade antioxidante do óleo essencial de *O. porosa*;
- Avaliar a ação antimicrobiana do óleo essencial de *O. porosa*;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO

A coleta do material botânico foi realizada no bairro Rio Vermelho, no Município de União da Vitória, na região sul do estado do Paraná (830 m de altitude, 26.9°18,5" S de latitude e 51.0°58,8" O de longitude), no mês de março de 2017. Foram confeccionadas exsiccatas, depositadas e identificadas pelo número HUPG 22243, no herbário da Universidade Estadual de Ponta Grossa, Paraná. O acesso ao patrimônio genético *Ocotea porosa* (Nees & Mart.) Barroso foi autorizado pelo Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN/SISGEN) e está registrado sob o número AD3F256.

4.2 PREPARAÇÃO DA AMOSTRA PARA MICROSCOPIA DE LUZ

Para o estudo anatômico, folhas e os caules frescos de *O. porosa* foram coletados e fixados em solução de FAA70, contendo etanol 70% (90%), formaldeído (5%) e ácido acético (5%). O material vegetal foi fixado em FAA 70 (JOHANSEN, 1940) e estocados em etanol a 70% (BERLYN; MIKSCHE, 1976).

As lâminas semipermanentes foram seccionadas nos sentidos transversal e longitudinal à mão livre, utilizando-se lâminas de barbear. Para a montagem das lâminas foi usado uma gota de glicerina 50% e para lutagem utilizou-se esmalte incolor. As secções foram coradas com azul de astra e fucsina básica (ROESER, 1962) ou azul de toluidina (O'BRIEN et al., 1964). Para a análise das características epidérmicas das folhas, as amostras serão mergulhadas em solução de hipoclorito de sódio até ficarem translúcidas. As amostras foram lavadas com água e coradas com safranina (KRAUS, ARDUIN, 1997).

4.3 MICROMEDIDAS

Estudos quantitativos dos estômatos foram realizados por meio de 20 medidas de múltiplas folhas de *O. porosa*. O índice estomático (SI) foi calculado utilizando a seguinte fórmula $SI = (S/(E+S)) \times 100$; em que S = número de estômatos por unidade de área, e E = número de células epidérmicas (incluindo tricomas) na mesma área unitária.

O comprimento e a largura dos estômatos foram medidos a partir de 20 estômatos em diferentes locais da lâmina foliar para se determinar o tamanho estomático médio.

4.4 ANÁLISES HISTOQUÍMICAS

Para os testes histoquímicos foram realizadas secções transversais mão livre com material fresco. Os reativos utilizados foram: Sudam III para compostos lipofílicos (SASS, 1951), solução de cloreto férrico 2% (JOHANSEN, 1940) e solução de dicromato de potássio 20% (GABE, 1968) para a pesquisa de compostos fenólicos, solução de floroglucinol/HCl para detectar lignina (FOSTER, 1949) e solução de lugol para verificar a presença de amido (BERLYN; MIKSCHE, 1976). Os resultados foram registrados por meio de fotomicrografias no microscópio fotônico Olympus CX 31, acoplado à câmera digital C7070 do laboratório de Farmacognosia da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

4.5 PREPARAÇÃO DA AMOSTRA PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA POR EMISSÃO DE CAMPO (FESEM)

Para essa análise foram utilizadas folhas e caules frescos de *O. porosa* e analisados em um microscópio eletrônico de varredura por emissão de campo (Mira 3 Tescan). Primeiramente, as amostras foram submetidas à desidratação em série etanólica crescente (30, 50, 70, 80, 90 e 100%) e após montagem em suporte, foram submetidas à metalização com ouro em aparelho Quorum, modelo SC7620.

4.6 EXTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DO ÓLEO ESSENCIAL (OE)

Folhas de *O. porosa* foram coletadas, selecionadas e padronizadas para obtenção do material vegetal. Em seguida, foi seco em estufa com ventilação, à temperatura de 35° e cortados em pequenos pedaços (~ 1 cm). A extração foi realizada por meio de hidrodestilação, utilizando o aparelho de Clevenger (USP XXXVII, 2014) para essência menos densa, onde utilizou-se 300 gramas do material vegetal em 500 ml de água, com duração de 6 horas. Após esse tempo, a quantidade de OE obtida foi determinada através da medição em tubo graduado. O material obtido foi estocado em tubos Eppendorf, em temperatura de $4 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

FIGURA 4 - Aparato de Clevenger utilizado na extração de óleo essencial de *O. porosa*.



Fonte: O autor, 2018

4.7 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL

As análises do OE de *O. porosa* foram realizadas utilizando um cromatógrafo Shimadzu GC-2010 Plus GC-EM/EM acoplado a um detector de massas tandem TQ8040 triplo tipo quadrupolo e um injetor automático AOC-5000 Plus para análise de amostras líquidas. A amostra foi diluída a 1% (v/v) em diclorometano e caracterizada usando as seguintes condições analíticas: coluna capilar de sílica fundida Rtx-5MS (5% difenil + 95% dimetilpolisiloxano (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m). O gás utilizado foi o hélio com vazão de 1,02 mL min⁻¹, em modo de divisão 1:90, o injetor a 250 °C e o sistema de ionização 70 eV. 1 μ L de amostra foi injetado na seguinte rampa de aquecimento: temperatura inicial de 60 °C (0') a 250 °C, com aquecimento a 3 °C/min. Uma série homóloga de hidrocarbonetos saturados lineares, C8 a C19, foi usada para calcular o índice de retenção. O índice de retenção experimental foi calculado usando a equação de Van den Dool e Kratz (mostrada abaixo):

$$Retention\ index = 100 \times (C_n - C_{n-1}) \times \left(\frac{T_x - T_{n-1}}{T_n - T_{n-1}} \right) + 100 \times C_{n-1} \quad (1)$$

C_n é o número de átomos de carbono do n-alcano cujo tempo de retenção é imediatamente maior que o tempo de retenção do analito, C_{n-1} é o número de átomos de carbono do n-alcano cujo tempo de retenção é imediatamente menor que o tempo de retenção T_x é o tempo de retenção do analito, T_n é o tempo de retenção do alcano C_n, T_{n-1} é o tempo de retenção do alcano C_{n-1}.

Os componentes dos OEs foram identificados comparando os índices de retenção e espectros de massa com a literatura de Adams (2007) e os espectros de massa também foram comparados com a biblioteca de massa NIST 02 (NIST, Gaithersburg, EUA). A quantificação relativa foi determinada a partir da normalização da área dos picos com a área total do cromatograma, sem o uso de nenhum fator de correção. Essas análises foram realizadas na Universidade Federal do Paraná.

4.8 AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS

4.8.1 Atividade Citotóxica

4.8.1.1 Linhagens tumorais

Foram utilizadas células de melanoma murino (B16F10), carcinoma de mama humano (MCF-7) e a linhagem não tumoral de fibroblasto murino (McCoy) obtidas de culturas mantidas no laboratório da Universidade Estadual de Ponta Grossa, através de expansão contínua em meio RPMI® 1640 suplementado com 10% Soro Fetal Bovino (SFB) e antibióticos (penicilina e estreptamicina) em estufa a 37°C em uma atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂.

4.8.1.2 Ensaio de viabilidade com MTT

O método do MTT baseia-se na utilização de um corante, o brometo de 3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT) para determinar a viabilidade celular por meio da atividade mitocondrial, majoritariamente pela hidrogenases. O MTT é um sal de tetrazólio, solúvel em água, o qual é convertido em um formazan púrpura insolúvel após a clivagem do anel de tetrazólio por desidrogenases mitocondriais (MOSMANN, 1983). As células McCoy, B16F10 e MCF7 (3×10^3 /poço) foram plaqueadas 24 h antes da exposição ao OE de *O. porosa* para a aderência, espalhamento e estabilização das mesmas na placa. Depois as células foram expostas a concentrações crescentes de OE (7700 µg/mL a 77 mg/mL) em meio RPMI, suplementado com 10% de soro fetal bovino e antibióticos por 72 h. Imediatamente antes do tratamento, as soluções contendo o óleo e o meio de cultivo eram submetidas a agitação vigorosa utilizando agitador do tipo “vortex” por pelo menos 1 min. Após período de tratamento o meio foi substituído por uma solução de MTT (0,5µg/µL) por 2 h a 37°C. Em seguida, a solução de MTT foi substituído por álcool isopropílico ácido (HCl

0,1M) para solubilização dos cristais de formazan e leitura da absorbância em 570 nm em leitor de microplacas. A densidade óptica obtida no grupo controle (células sem tratamento) foi considerada como equivalente a 100% de células viáveis e a viabilidade celular nos demais tratamentos foi calculada por regra de três. Portanto, quanto maior a densidade óptica obtida no ensaio, maior o número de células viáveis.

EQUAÇÃO 2 - Cálculo da porcentagem de viabilidade celular pelo método de redução do MTT.

$$\text{Viabilidade (\%)} = \left(\frac{\text{Absorbância do tratado}}{\text{Média das absorbâncias do controle}} \right) \times 100 \quad (2)$$

4.8.1.3 Cálculo da Concentração inibitória mínima IC₅₀

A concentração que inibe em 50% a viabilidade celular (IC₅₀) foi calculada usando programa GraphPad Prisma, versão 7.00 para Windows (GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com) seguindo tutorial fornecido pela GraphPad Software, Inc, acessado em 19 de maio de 2018. (<https://www.graphpad.com/support/faq/how-to-determine-an-icsub50sub/>).

4.8.1.4 Cálculo do índice de seletividade

O índice de seletividade (IS) do OE foi definido pela razão da IC₅₀ do composto entre as linhagens não-tumoral (McCoy) e as tumorais (MCF-7 e B16F10) conforme Equação 3:

$$\text{IS} = \text{IC}_{50} (\text{CÉLULA NÃO TUMORAL}) / \text{IC}_{50} (\text{CÉLULA TUMORAL}) \quad (3)$$

4.8.2 Atividade Antioxidante

4.8.2.1 Método da redução do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH)

A atividade antioxidante dos OEs foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Yamaguchi et al. (1998). Foram preparadas diferentes concentrações (35, 30, 25, 20, 15, 10,

5, 1 e 0,5 mg/mL) dos OEs em metanol. Esse solvente também foi empregado na obtenção das diluições seriadas dos controles positivos: ácido ascórbico e ácido gálico (1000 a 0,387 µg/mL) e na obtenção da solução de DPPH (0,1mM).

Em microplacas de 96 poços foram transferidos 20 µL das soluções de OEs de *O. porosa* bem como dos controles positivos e do branco (metanol) e 100 µL da solução de DPPH. As placas foram homogeneizadas durante 1 min e a leitura foi realizada após 30 min de incubação no escuro à temperatura ambiente em leitor de microplacas (Biotek Instruments, Winooski, VT, EUA) no comprimento de onda de 517 nm.

A atividade antioxidante (AA) foi determinada sob a forma de porcentagem e calculada pela taxa de declínio da absorvância da solução de DPPH com o OE ou padrões, após 30 min de reação, em relação à solução de referência (DPPH em metanol), de acordo com a equação 04:

$$\%AA = 100 - [(A_{\text{amostra}} - A_{\text{branco}} / A_{\text{controle}}) \times 100] \quad (4)$$

Onde, A é o valor de cada absorvância. A partir da porcentagem da atividade antioxidante obtida para cada concentração de óleo essencial foi construído um gráfico. A equação da reta obtida foi utilizada para o cálculo do IC₅₀, substituindo o valor de Y por 50%. O valor de IC₅₀ encontrado representa a concentração da amostra com capacidade de reduzir 50% da concentração de DPPH adotada.

4.8.2.2 Método Redução pelo complexo de fosfomolibdênio.

O método de redução do complexo fosfomolibdênio foi utilizado para determinar a capacidade antioxidante total. Uma alíquota de 300 µL de OE em uma solução de etanol a 200 µg/mL foi adicionada a um tubo de ensaio, juntamente com 3 mL do reagente (4 mmol/Molibdato de amônio L, fosfato de sódio a 28 mmol/L e ácido sulfúrico a 0,6 mol/L). O tubo foi selado e transferido para um banho de até a 95 °C durante 90 min. O tubo foi arrefecido e a leitura foi realizada utilizando um espectrofotômetro modelo UV/Vis Shimadzu1601-695 nm a 695 nm contra um branco (a 300 µL de etanol foram adicionados 3 mL de reagente) em triplicado. Para fins de cálculo, o ácido ascórbico foi considerado como

100% de atividade antioxidante, de acordo com a Equação 5:

$$\% \text{ AA} = (\text{Abs. amostra} - \text{Abs. branco} / \text{Abs. ácido ascórbico} - \text{Abs. branco}) \times 100 \quad (5)$$

4.8.3 Atividades inseticidas

4.8.3.1 Criação dos insetos

As cepas dos insetos (*Cimex lectularius*) (Bayonne 'Resistente a inseticidas' e Ft. Dix 'Susceptível') foram fornecidas pelo Dr. Changlu Wang, Departamento de Entomologia, Universidade Rutgers, New Brunswick, NJ e foram criadas em massa no National Center of Natural Products Research, Oxford, Mississippi. Os insetos foram alimentados em frascos de vidro transparente de 473 mL, contendo papel-toalha (papel 92 - padrão multiuso) como abrigos. Os frascos foram cobertos com pano de malha fina para ventilação e foram mantidos no lugar com um elástico (Campbell e Miller, 2015). Os frascos foram mantidos em uma câmara de crescimento a 26°C e 60% de umidade relativa com um fotoperíodo de 13:11 h claro/escuro. Os insetos foram alimentados com sangue de coelho desfibrinado (Hemostat, CA) semanalmente.

Os insetos foram alimentados de acordo com o método descrito por Montes et al. (2002). Alimentadores de sangue (CG-1836-75 ChemGlass, NJ) foram ligados a um banho de água utilizando tubos de látex e um pedaço de membrana de parafilme "M" foi esticado ao longo do fundo do alimentador. Colocou-se uma quantidade de 5 mL de sangue de coelho desfibrinado (Hemostat) no centro oco do material de vidro e reuniu-se no parafilme. O parafilme forneceu uma barreira para o inseto se alimentar. O banho de água foi ajustado para circular e aquecer o sangue a 37°C. Os insetos deitaram após a alimentação e os frascos foram removidos.

4.8.3.2 Bioensaio tópico

Estudos inseticidas com o OE de *O. porosa* foram conduzidos de acordo com o procedimento descrito por Romero et al. (2009). Os insetos adultos foram separados usando uma pinça de peso pena nas placas de Petri. Os insetos foram anestesiados com CO₂ e 1 mL de uma solução de tratamento em acetona foi colocada na superfície dorsal do abdômen com

um dispensador de repetição de mão (Hamilton Co., Reno, NV) equipado com uma seringa de vidro de 50 mL (Hamilton Co). Insetos controle receberam apenas 1 mL de acetona. Após o tratamento, os insetos foram transferidos para os frascos de vidro transparente de 20 mL contendo tira de papel (padrão 92 - papel multiuso) e mantidos na câmara de crescimento. Os dados para a mortalidade dos insetos foram registados aos 1, 2, 3, 5 e 7 dias após o tratamento. Os insetos foram considerados mortos quando nenhuma parte do corpo se moveu, após serem tocados com uma agulha. Ocorreram 3 repetições com 10 insetos (ambos os sexos)/réplica. Quatro doses foram utilizadas, 125, 50, 25 e 12,5 µg EO/inseto e a deltametrina foi usada como inseticida padrão.

4.8.3.3 Bioensaio residual

Estudos residuais foram feitos usando o método de papel filtro em uma placa de Petri, conforme descrito por Campbell e Miller (2015) após pequenas modificações. Um disco de papel de filtro de 20 cm² (Whatman # 1) foi tratado com uma alíquota de 100 µL de cada concentração de tratamento (25, 50 e 100 µg EO/cm²) usando pipeta. A alíquota de 100 µL de tratamento cobriu completamente o papel de filtro. Os papéis de filtro tratados, foram então colocados na placa de Petri (50 mm x 9 mm, Falcon). Os tratamentos de controle receberam apenas acetona. Dez insetos adultos foram liberados no papel de filtro e a mortalidade foi registrada durante 7 dias como mencionado anteriormente. Foram utilizadas 3 repetições com 10 insetos/replicação. A deltametrina foi usada como padrão.

4.8.3.4 Bioensaio de fumigação

Os insetos foram submetidos à toxicidade por vapor em frascos de vidro transparente de 125 mL. Um pequeno pedaço de papel foi colocado no fundo da jarra para fornecer um substrato para os insetos descansarem durante os testes com o óleo essencial de *O. porosa*. Bed bugs foram introduzidas nos frascos 2-4 h antes do tratamento para se aclimatarem. Uma solução de tratamento ou alíquota de acetona de 2 µL foi depositada diretamente na superfície interna da parede lateral da garrafa a 4 cm do fundo da garrafa usando uma seringa a 50 µL à prova de gás (Hamilton Company, Reno, NV) acoplada a um PB600, Reno, NV) repetindo dispensa. Cinco concentrações: 15,6, 31,25, 62,5, 125 e 250 µg EO/125 cm² foram testadas contra os insetos. Os frascos foram colocados na câmara de

crescimento e os dados para mortalidade foram registrados 24 h após o tratamento. O 2,2-diclorovinil-dimetilfosfato (DDVP) foi usado como padrão.

4.8.4 Atividade antimicrobiana

4.8.4.1 Método da microdiluição em caldo

Para a análise da atividade antimicrobiana foram utilizadas cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923, *Escherichia coli* ATCC® 25922 e o fungo *Candida albicans* ATCC® 10231. Para as bactérias foi utilizado caldo BHI (brainheartinfusion) e para o fungo caldo Sabouraud. O teste de microdiluição foi realizado em placas de 96 poços de acordo com o protocolo M7-A6 do NCCLS (2004) adaptado. Em um tubo estéril, foram adicionados o óleo essencial e o caldo na proporção 1:1 e 15% de polisorbato 80. Foram realizadas diluições seriadas para obtenção das concentrações de 0,035 g/100 µL, 0,0175 g/100 µL; 0,00875 g/100 µL; 0,004375 g/100 µL; 0,0021875 g/100 µL. Em seguida, foram adicionados 10 µL da suspensão de micro-organismos inoculada em salina contendo aproximadamente 1×10^5 UFC/mL. As placas foram incubadas a 35 °C por 24 h. Para confirmação de microrganismos viáveis em concentrações não inibitórias, foram utilizados 15 µL do corante TCC (2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio) a 1% e aguardado 30 min em estufa a 35 °C.

4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A viabilidade celular foi analisada por estatística descritiva, sendo que a barra representa a média $\pm$ o erro padrão da média de 3 experimentos diferentes realizados em quadruplicata. ANOVA de uma via e pós teste de Tukey. Foi considerado significativo $p < 0,05$. A concentração que inibe em 50% a viabilidade celular (IC_{50}) foi calculada usando programa GraphPad Prisma, versão 7.00 para Windows (GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com), pela aplicação do teste de normalidade.

Para o teste inseticida, as médias de tratamento da toxicidade por vapor foram comparadas usando análise de variância de dois fatores (ANOVA) e separadas pela diferença honesta significativa de Tukey (HSD). Os valores de IC_{50} e IC_{90} foram calculados usando a análise Probit. As análises foram realizadas no SAS® 9.3 e no JMP® 10.0.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 ESTUDOS ANATÔMICOS

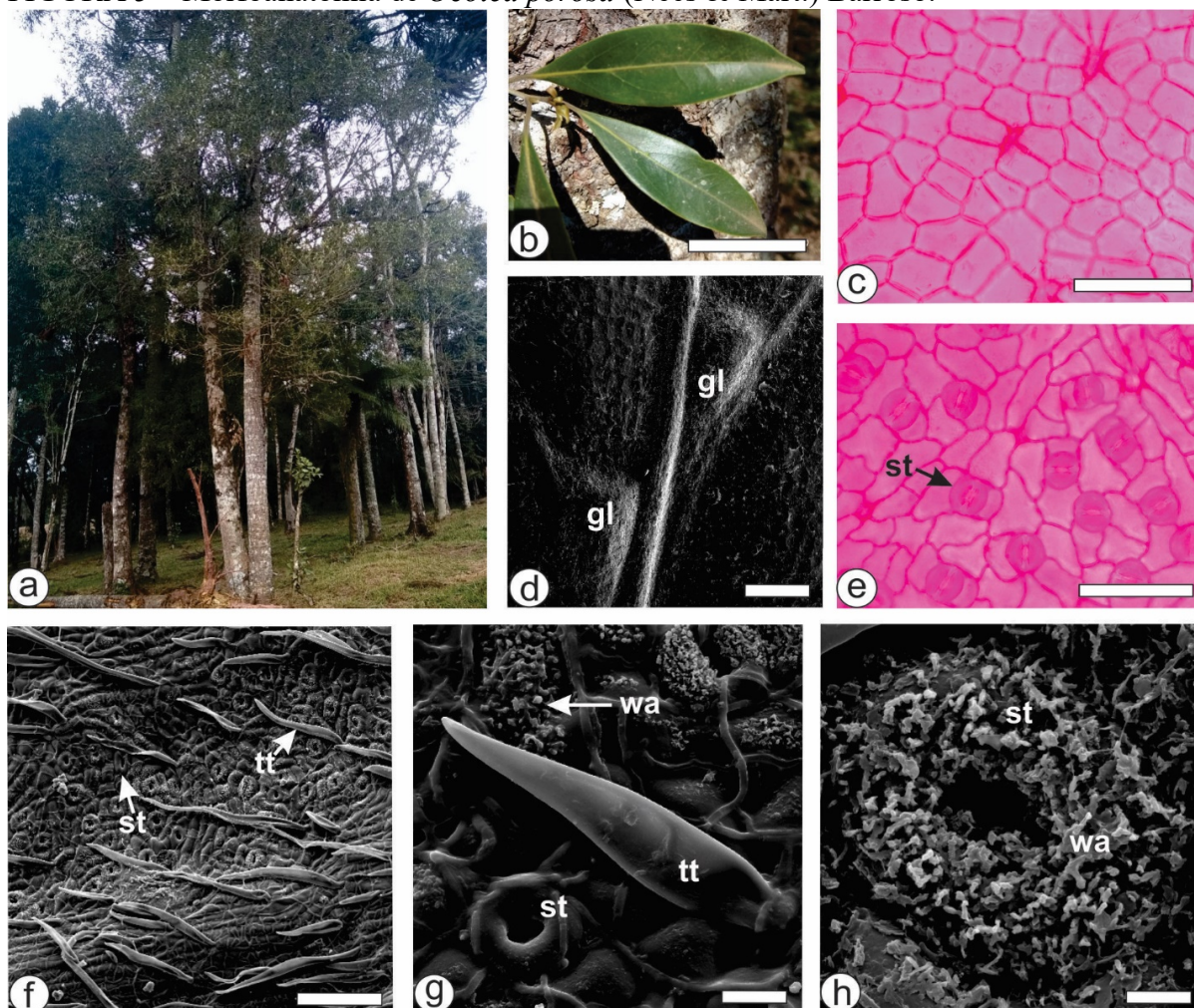
Ocotea porosa (Nees & Mart.) Barroso (Fig. 5a, b) apresenta domácias nas folhas, frequentemente localizadas na junção da nervura mediana com as veias secundárias (Fig. 5d). Esta característica foi encontrada em várias espécies de *Ocotea*, como *Ocotea urbaniana* Mez, *Ocotea pulchella* (Nees & Mart.) Mez, *Ocotea tristis* (Nees & Mart.) Mez, *Ocotea catharinensis* Mez (SANTOS et al., 1995).

Em vista frontal, a epiderme foliar revela paredes anticlinais retas na face adaxial e onduladas na face abaxial (Figs. 5c, e). Essa característica foi encontrada em *Ocotea puberula* (Rich.) Nees (FARAGO et al., 2005). Entretanto, *O. indecora* (Schott) Mez apresentou paredes anticlinais sinuosas em ambas as faces (GONÇALVES et al., 2018), enquanto *O. gardneri* (Meisn.) Mez. evidenciou paredes anticlinais retas (COUTINHO et al., 2006). Esta característica mostra-se importante para distinguir as espécies de *Ocotea*.

Ceras epicuticulares foram encontradas na epiderme, especialmente nos estômatos (Fig. 5g, h). Os estômatos são do tipo paracítico e anomocítico (Fig. 5e) e as folhas são hipoestomáticas, como também relatadas para várias outras espécies de *Ocotea* (TOLEDO et al., 2000; FARAGO et al., 2005; COUTINHO et al., 2006; GONÇALVES et al., 2018). Os estômatos medem 29 µm de comprimento e 23 µm de largura, em média e o índice de estômatos é 16,43 na face abaxial.

Ocotea porosa mostra tricomas tectores unicelulares simples em ambas as superfícies, sendo raros na face adaxial (Fig. 5f, g). Tricomas semelhantes foram relatados para *O. puberula* (FARAGO et al., 2005), *O. indecora* (GONÇALVES et al., 2018). Apesar de essa característica ser comum em espécies de Lauraceae (GONÇALVES et al., 2018), *O. gardneri* apresentou folhas glabras (COUTINHO et al., 2006).

FIGURA 5 – Morfoanatomia de *Ocotea porosa* (Nees & Mart.) Barroso.



[c, e: Microscopia de luz; d, f, g, h: FESEM]. a. Planta no hábito. b. Folhas. c-h. Folha vista da superfície (c. Adaxial, e-h. Abaxial). [gl - domácia de glândulas, st - estômatos, nt - tricoma tector, wa - ceras epicuticulares]. Barra: a = 35 cm; b = 4 cm d = 1 mm; f = 100 μ m, c, e = 50 μ m; g = 20 μ m; h = 5 μ m; = 2 μ m.

Fonte: Autor, 2018.

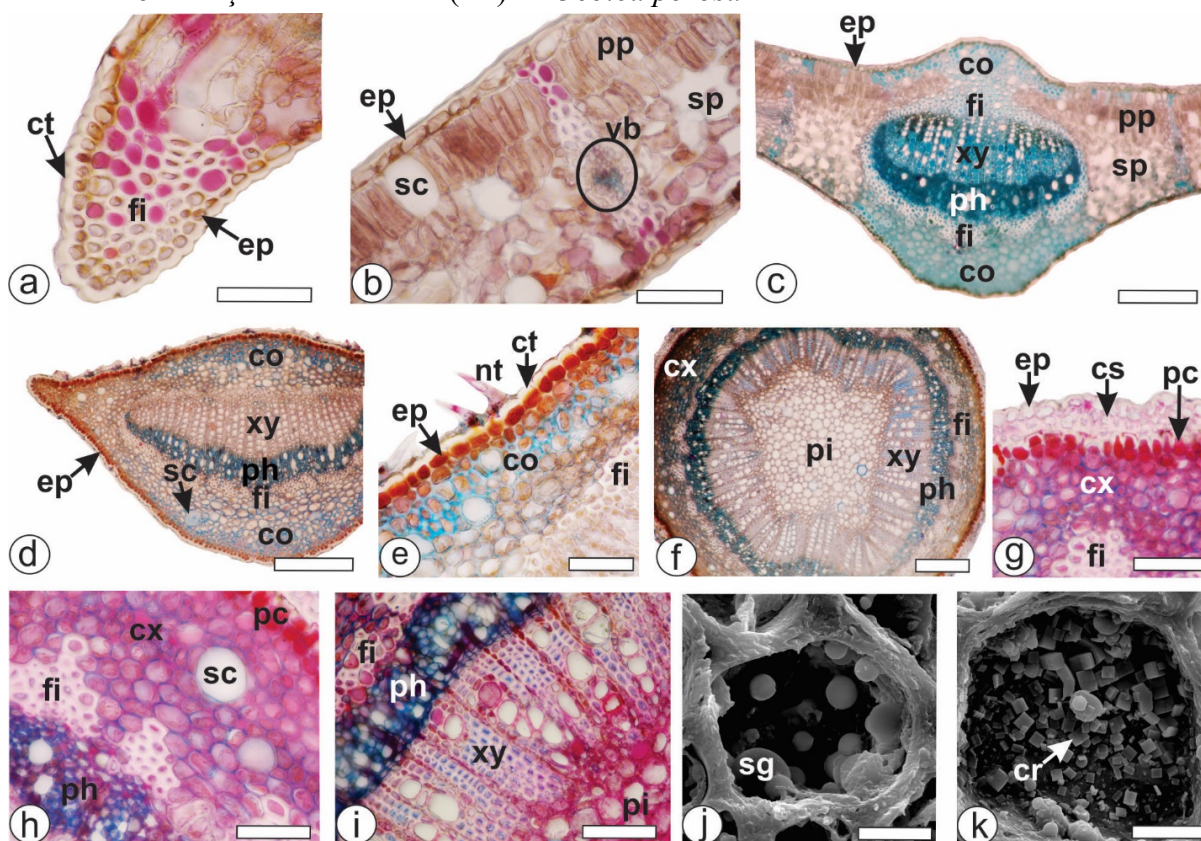
Em seção transversal, a epiderme foliar é unisseriada (Fig. 6a, b) e coberta por uma cutícula fina e lisa que reagiu com Sudam III. As

Células secretoras com forma de esférica a oblonga (Fig. 6b) e células epidérmicas contêm compostos fenólicos que reagiram positivamente nos testes histoquímicos. A folha é dorsiventral e é formada por 2 camadas de parênquima paliádico e 5-6 camadas de parênquima esponjoso (Fig. 6b, c). Os feixes vasculares colaterais de pequeno porte atravessam a região do mesofilo e são circundados por bainha esclerenquimatosa que apresenta extensões que alcançam ambas as faces da epiderme (Fig. 6b). O mesofilo dorsiventral é frequente na família Lauraceae (METCALFE E CHALK, 1972). Entretanto, mesofilo isobilateral foi encontrado em *O. gardneri* (COUTINHO et al., 2006).

A borda da lâmina é ligeiramente curva. A epiderme possui células de formato irregular e recobertas por cutícula espessa. Abaixo da epiderme são encontradas muitas camadas de células esclerenquimáticas (Fig. 6a). Essas mesmas características foram observadas em *O. gardneri* (COUTINHO et al., 2006).

Cavidades secretoras com conteúdo lipofílico amarelo-claro reagiram com o Sudan III no teste histoquímico (Fig. 6a). Essas são encontradas no mesofilo, especialmente na face adaxial, bem como na nervura central. Células secretoras foram amplamente relatadas para espécies de *Ocotea* (TOLEDO et al., 2000; FARAGO et al., 2005; COUTINHO et al., 2006; GONÇALVES et al., 2018).

FIGURA 6 - Secções transversais (TS) de *Ocotea porosa* – Folha e caule.



[a-i: Microscopia de luz; j, k: FESEM]. a. TS da borda da folha; b. TS da lâmina; c. TS da nervura central e da lâmina; d e e. TS do pecíolo; f-k. TS do caule. [co - colênquima, cr - cristais, cs - camada subepidérmica, ct - cutícula, cx - córtex, ep - epiderme, fi - fibras, nt - tricoma tector, pc - compostos fenólicos, sc - células secretoras, sg - grãos amido, ph - floema, pp - parênquima paliádico, pi - medula, sp - parênquima esponjoso, vb - feixe vascular, xy - xilema]. Barra: c, d, f = 200 µm; a, b, e, g, h, i = 50 µm; k = 10 µm; j = 5 µm.

Fonte: Autor, 2018.

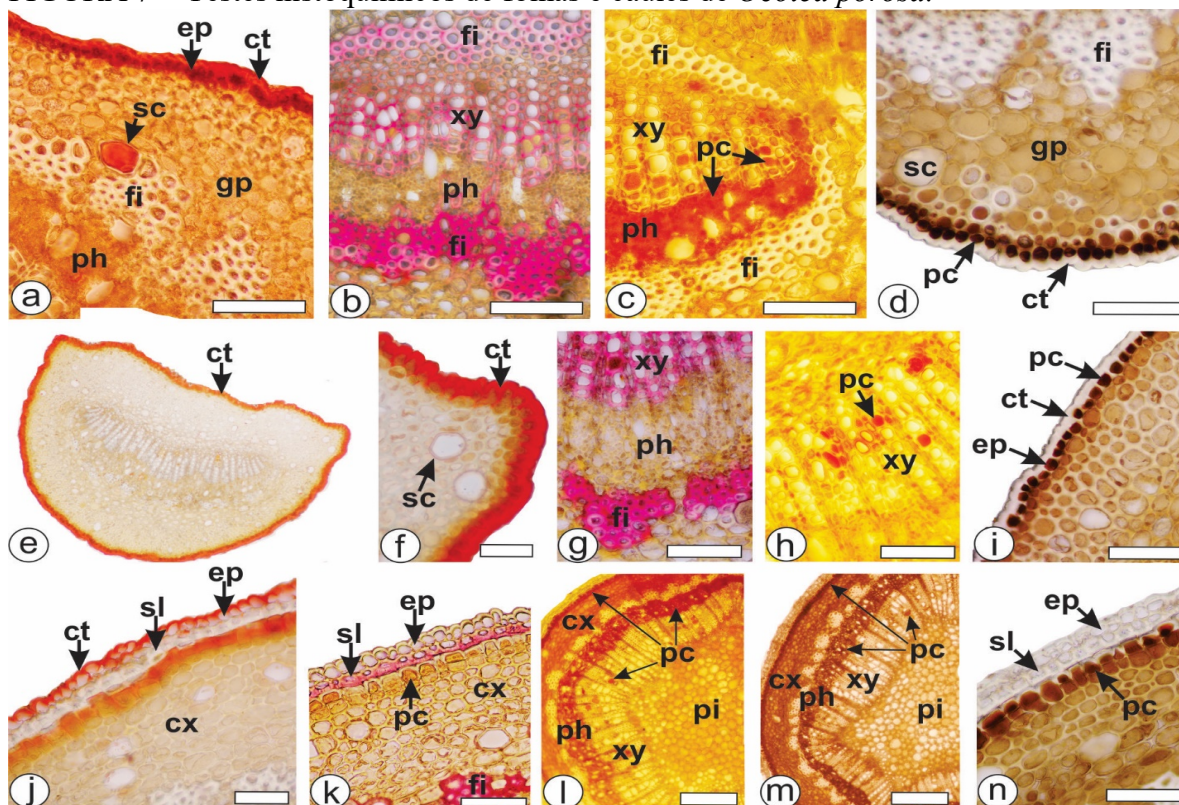
Em secção transversal da folha, a nervura central é biconvexa (Fig. 6c). Essa característica foi observada em *O. odorifera* (Vell.) Rohwer (TOLEDO et al., 2000), *O. puberula* (FARAGO et al., 2005), *O. indecora* (GONÇALVES et al., 2018) e *O. gardneri*

(COUTINHO et al., 2006). A epiderme unisseriada é formada por células com diferentes formas e tamanhos contendo compostos fenólicos que reagiram com o cloreto férrico (Fig. 7d) e é coberta por uma cutícula espessa evidenciada pelo Sudan III nos testes histoquímicos (Fig. 7a). Abaixo da epiderme, várias camadas de colênquima anular são encontradas. Colênquima anular foi encontrado em *O. odorifera* (TOLEDO et al., 2000), enquanto o tipo angular foi encontrado em *O. puberula* (FARAGO et al., 2005).

O sistema vascular da nervura central é representado por um feixe vascular colateral em arco aberto que é circundado por uma bainha contínua de fibras esclerenquimatosas (Fig. 6c) que reagiu com o floroglucinol/HCl (Fig. 7b). Compostos fenólicos foram encontrados em algumas células do xilema e em várias células do floema. Esses compostos foram evidenciados nos testes histoquímicos utilizando dicromato de potássio (Fig. 7c). Idioblastos contendo compostos fenólicos também foram encontrados na nervura central de *O. odorifera* (TOLEDO et al., 2000) e *O. puberula* (FARAGO et al., 2005).

O pecíolo, em secção transversal, varia de biconvexo com duas extensões laterais na região distal (Fig. 6d), plano-convexo na região medial (Fig. 7e) a cilíndrico na região proximal. O mesmo padrão foi observado em *O. diospyrifolia* (Meinz) Mez., *O. pulchella* (Nees & Mart.) e *O. tristis* (Ness & Mart.) Mez. também apresentou formato cilíndrico na região proximal. No entanto, a forma biconvexa com duas extensões laterais ocorreu nas regiões mediana e distal de *O. pulchella*, enquanto a forma plana-convexa foi encontrada nas mesmas porções de *O. tristis* (SANTOS E OLIVEIRA, 1995). Considerando os diferentes formatos do pecíolo, essa característica pode ser usada na diferenciação das espécies de *Ocotea*, como observado nas espécies de *Passiflora* (WOSCH et al., 2015), *Mikania* (ALMEIDA et al., 2017) e *Baccharis* (BOBEK et al., 2016).

A epiderme é coberta por cutícula espessa, evidenciada pela reação com Sudan III (Figs. 6e, f) e mostra numerosos tricomas tectores (Fig. 6e). Subjacente à epiderme, várias camadas de colênquima anular são observadas em ambas as faces (Fig. 6d, e). Algumas células secretoras estão distribuídas no pecíolo (Fig. 7f). *Ocotea gardneri* evidenciou tricomas tectores similares apenas no pecíolo (COUTINHO, 2006). O sistema vascular é semelhante à nervura central, tendo o xilema e as fibras reagido com a floroglucina clorídrica (Fig. 7g), e os compostos fenólicos localizados no xilema e na epiderme, evidenciados pelo dicromato de potássio (Fig. 7h) e cloreto férrico (Figura 7i), respectivamente.

FIGURA 7 - Testes histoquímicos de folhas e caules de *Ocotea porosa*.

[a, e, f, j: Sudan III; b, g, k: floroglucinol/HCl; d, i, m, n: cloreto férrico 2%; c, h, l: solução de dicromato de potássio (10%). Secção transversal. a-d: nervura central; e-i: pecíolo; j-n: caule [ct, cutícula cx, córtex; en, endoderme; ep, epiderme; fi: fibras, gp, parênquima fundamental; pc, compostos fenólicos ph, floema pi, medula; sc: cavidade secretora; sl, camada esclerenquimática; xy, xilema]. Barras: e = 200 μ m, l, m = 100 μ m, a-d, f-k = 50 μ m.

Fonte: Autor, 2018.

Em estrutura secundária incipiente e em secção transversal, o caule é circular (Fig. 6f). A epiderme é unisseriada e coberta por uma cutícula delgada que reagiu positivamente à pesquisa com Sudam III (Fig. 7j). Subjacente à epiderme, uma camada de células esclerenquimáticas (Fig. 6g, 7j) que reagiram com floroglucina clorídrica (Fig. 7k) e uma camada de células contendo compostos fenólicos (Fig. 6g, h) que reagiram com dicromato de potássio (Fig. 7m) e cloreto férrico (Fig. 7n) também foi observada.

O parênquima cortical apresenta 10-12 camadas (Figs. 6h, 7j-n). Os idioblastos secretores também estão presentes no córtex (Figs. 6h, 7j). O sistema vascular evidencia floema voltado para a periferia e o xilema voltado para a medula, e entre esses, o câmbio é observado (Figs. 6i, 7l, m). Grupamentos de fibras perivasculares estão apostos ao floema (Figs. 6g, h, i, 7k, l, m). Fibras perivasculares e xilema reagiram com floroglucinol/HCl e coraram em rosa, evidenciando lignificação nas paredes (Fig. 6k).

A medula é constituída por células parenquimáticas de paredes delgadas. Grãos de amido (Fig. 6j) e cristais são encontrados (Fig. 6k) na região medular.

6.2 EXTRAÇÃO E TEOR DO ÓLEO ESSENCIAL (EO)

O OE de *O. porosa* apresentou coloração amarelo-clara (Figura 8), odor forte e característico. A coloração amarelo-clara é comum a diversas espécies de *Ocotea* (TAKAKU et al., 2007).

FIGURA 8 - Óleo essencial de *Ocotea porosa* extraído por meio de hidrodestilação.



Fonte: Autor 2017

O rendimento do OE de *O. porosa* foi $1,03\% \pm 0,7$. As espécies *O. caudata* (Nees) Mez, *O. cujumarum* Mart. e *O. caniculata* que foram coletadas na Floresta Nacional de Caxiuanã, Amazonas, Brasil, apresentaram em média um rendimento de 0,8% (DA SILVA et al., 2017b). No presente estudo, folhas foram usadas para extração. O estudo anatômico evidenciou várias cavidades secretoras (Fig. 6b, 7a, 7f) que armazenam o OE na lâmina foliar e pecíolo.

6.3 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS

A composição química do OE extraído de folhas de *O. porosa* foi obtida através de CG-EM e está sumarizada na Tabela 1. A figura 09 mostra o cromatograma onde o número indicado para i composto está em correspondência com a tabela 1. Comparando os grupos químicos, o OE de *O. porosa* possui 38,19% de monoterpenoides hidrocarbonetos, 1,02% de monoterpenoides oxigenados, 35,21% de sesquiterpenoides hidrocarbonetos e 18,20% de sesquiterpenoides oxigenados. Alta concentração de sesquiterpenoides também foi encontrada em espécies de *Ocotea*, a exemplo de *O. gomezii* W.C.Burger e *O. morae* Gómez-Laur (CHAVERRI et al., 2011).

A tabela 1 demonstra os componentes encontrados no óleo essencial de *Ocotea porosa*.

TABELA 1 - Composição química do óleo essencial de *Ocotea porosa*.

(continua)

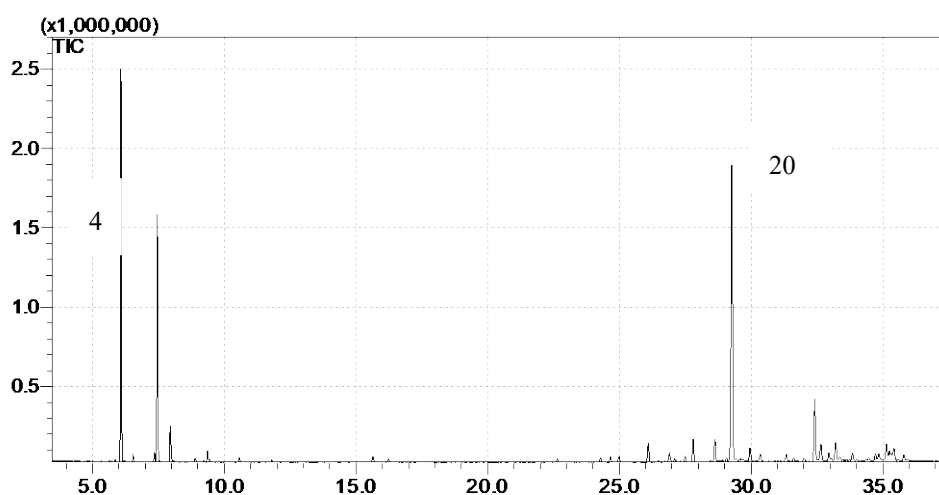
Nº	T _r	AI ¹	AI Adms ²	Composto químico	[] %
1	6,080	933	932	α-Pineno	19,71
2	6,544	947	946	Canfeno	0,48
3	7,354	973	969	Sabineno	0,60
4	7,464	976	974	β-Pineno	13,86
5	7,954	991	988	Mirceno	2,07
6	8,908	1017	1014	α -Terpineno	0,25
7	9,368	1028	1024	Limoneno	0,78
8	9,459	1031	1026	Eucaliptol	0,24
9	10,581	1059	1054	γ -Terpineno	0,36
10	15,640	1177	1174	Terpinen-4-ol	0,43
11	16,248	1191	1186	α -Terpineol	0,35
12	24,286	1376	1374	α -Copaeno	0,34
13	24,661	1385	1387	β -Bourboleno	0,53
14	24,994	1392	1389	β -Elemeno	0,51
15	26,100	1419	1417	(E)-Cariofileno	1,70
16	26,905	1439	1440	Aromadendreno	0,86
17	27,491	1453	1452	α -Humuleno	0,57
18	27,799	1461	1458	Allo-aromadendreno	1,98
19	28,626	1481	1484	Germacreno D	1,88
20	29,266	1497	1500	Biciclogermacreno	24,62
21	29,959	1515	1513	γ -Cadineno	1,17
22	30,346	1525	1522	δ -Cadineno	0,66
23	31,331	1550	1548	Elemol	0,74
24	31,620	1558	1559	Germacreno B	0,39
25	32,415	1578	1577	Espatulenol	5,34
26	32,650	1584	1590	Globulol	2,09
27	32,951	1592	1592	Viridiflorol	0,99
28	33,207	1599	1600	Guaiol	1,95
29	33,846	1616	1618	1,10-di-epi-cubenol	0,95
30	34,470	1633	1630	γ -Eudesmol	0,42
31	34,716	1640	1639	Epóxido de allo aromadendreno	0,72
32	35,136	1651	1649	β -Eudesmol	1,77
33	35,251	1654	1652	α -Eudesmol	1,09
34	35,418	1659	1656	Valerianol	1,40
35	35,797	1669	1670	Bulnesol	0,75
Classe de compostos					%
Monoterpenos Hidrocarbonetos					38,12
Monoterpenos oxigenados					1,02

TABELA 1 - Composição química do óleo essencial de *Ocotea porosa*.

(conclusão)	
Sesquiterpenos Hidrocarbonetos	35,21
Sesquiterpenos oxigenados	18,20
Total	92,54

Tr: Tempo de retenção dos compostos calculado em comparação n-alcenos na coluna HP-5MS. [] %: abundância dos componentes do óleo essencial. ¹Índice de retenção calculado. ²Índice de retenção da literatura. Foram identificados os compostos de concentração > 0.2%. São destacados em negrito os compostos majoritários.

Fonte: autor, 2018.

FIGURA 9 - Cromatograma do óleo essencial de *Ocotea porosa*.

Fonte: autor, 2018.

Por meio de CG-EM foi possível identificar 92,54% dos componentes voláteis do OE, sendo 35 compostos e dentre os majoritários foi encontrado 24,62% de biciclogermacreno (7), 19,71% de α -pineno (8) e 13,86% de β -pineno (9). Os respectivos espectros de massa desses compostos estão ilustrados nas Figuras 11, 12 e 13.

Weyesthal et al. (1994) verificou uma composição química distinta para o óleo essencial de *O. porosa* extraído da madeira. Esses autores encontraram como principais componentes do OE o acetato de carquejila (2,1%), α -copaeno (5,6%), γ -pineno (3,5%) e δ -cadineno (3,1%), cremoligenol (8,4%), β -eudesmol (8,4%), valerianol (5%), α -bisabolol (3,6%) and β -bisabolol (2,9%). Diferentemente, Reynolds e Kite (1995) analisaram o OE extraído de cascas de *O. porosa* e encontraram como compostos majoritários α -copaeno (6,25%), δ -cadineno (3,28%), β -eudesmol (6,86%), valerianol (7,55%) and α -bisabolol (3,33%).

No presente estudo, a diferença encontrada na composição química do OE de *O. porosa* em relação aos dados da literatura ocorreu devido ao fato de que o OE foi obtido de folhas e não da madeira. Adicionalmente, não apenas as composições dos OEs, mas também as quantidades dos compostos variam ao longo da vida da planta. Isso está relacionado aos ritmos circadianos, condições sazonais e influências ambientais que afetam o desenvolvimento das espécies (BUDEL et al., 2018b).

Takakua et al. (2007) analisaram os componentes voláteis de folhas de várias espécies de *Ocotea* provenientes da Costa Rica, são elas *O. floribunda* (Sw.) Mez, *O. holdridgeana* W.C.Burger, *O. meziana* C.K.Allen, *O. sinuata* (Mez) Rohwer, *O. tonduzii* Standl, *O. valerioana* (Standl.) WCBurge, *O. veraguensis* (Meisn.) Mez e *O. whitei* Woodson. Os compostos voláteis mais comuns entre essas espécies foram α -pineno, β -pineno, β -cariofileno e germacreno D. No presente estudo, α -pinene e β -pinene estiveram presentes em alta concentração.

Brito (2009) descreve a presença de α -pineno, β -pineno, β -elemeno, β -cariofileno, α -humuleno, germacreno D, γ -cadineno, δ -cadineno e α -cadinol no OE de folhas de espécies de *Ocotea*. No presente estudo, com exceção de β -elemeno, γ -cadineno e α -cadinol, os demais também foram encontrados em *O. porosa*.

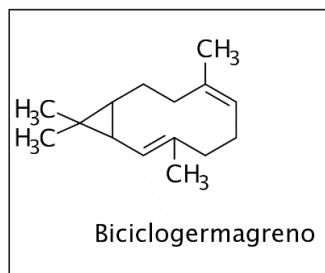
Considerando a região, o tipo de solo, a estação do ano, altura da planta, clima, métodos utilizados para secagem do material vegetal e o processo de extração, os óleos essenciais podem apresentar variações em sua composição (BROOKER; KLEINIG, 2006; BARBOSA et al., 2016).

Considerando as atividades biológicas, a composição química do OE é extremamente importante e deve ser avaliada (BARBOSA et al., 2016). No presente estudo, o biciclogermacreno, composto mais abundante no OE de *O. porosa* apresentou ação larvicida nos vetores da malária, da dengue, da encefalite japonesa (GOVINDARAJAN; BENELLI, 2016) e ação fungicida (SILVA et al., 2017).

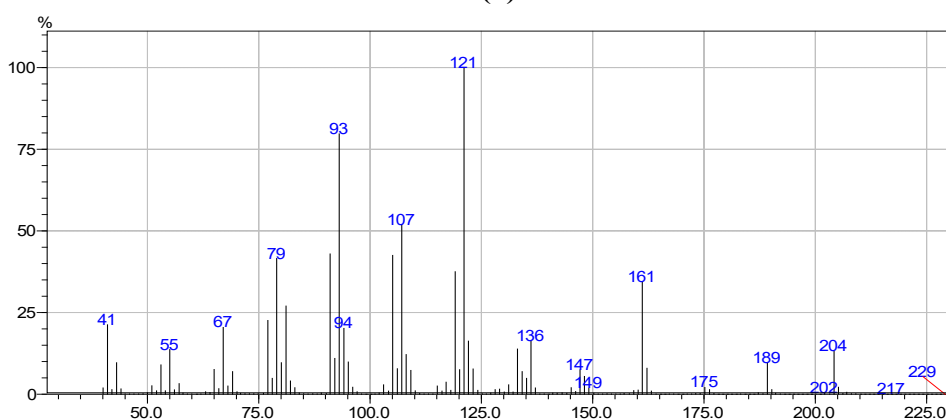
Os compostos voláteis α -pineno e β -pineno também foram encontrados em alta concentração no presente estudo e têm sido avaliados quanto as atividades biológicas. Ambos os compostos apresentaram atividades antibacteriana, antiviral, antifúngica, hipotensiva (KOZIOŁ et al., 2014). α -Pineno apresentou atividades anti-inflamatória, hipoglicemiante (ÖZBEK; YILMAZ, 2017), antimalárica (RODRIGUES et al., 2015), antinociceptiva (AYDIM et al., 2008) e gastroprotetora (PINHEIRO et al., 2015), enquanto β -pineno mostrou

atividade antidepressiva (GÚZMAN-GUTIÉRREZ et al., 2015) e antiviral (ASTANI; SCHNITZLER, 2014).

FIGURA 10 - Espectro de massas do biciclogermacreno presente no óleo essencial de *Ocotea porosa*.

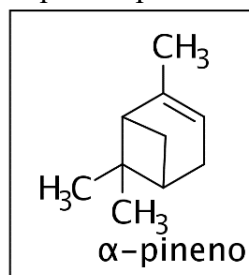


(7)

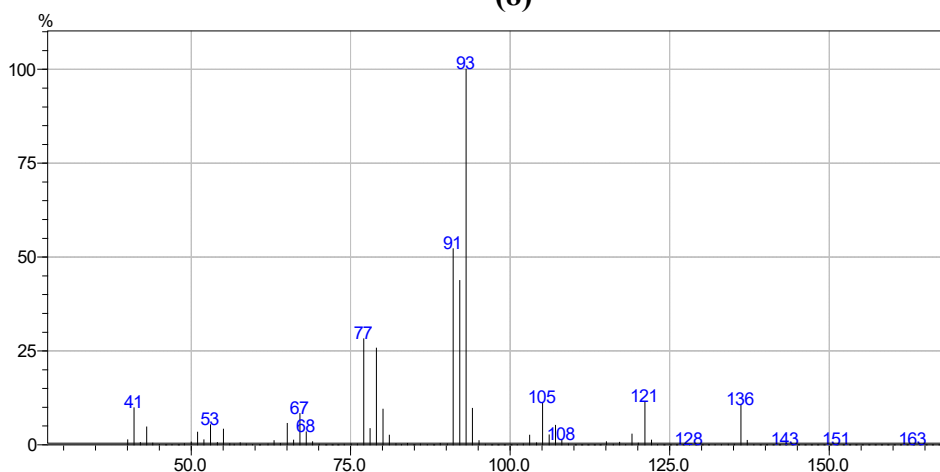


Fonte: Autor, 2018

FIGURA 11 - Espectro de massas do α -pineno presente no óleo essencial de *O. porosa*

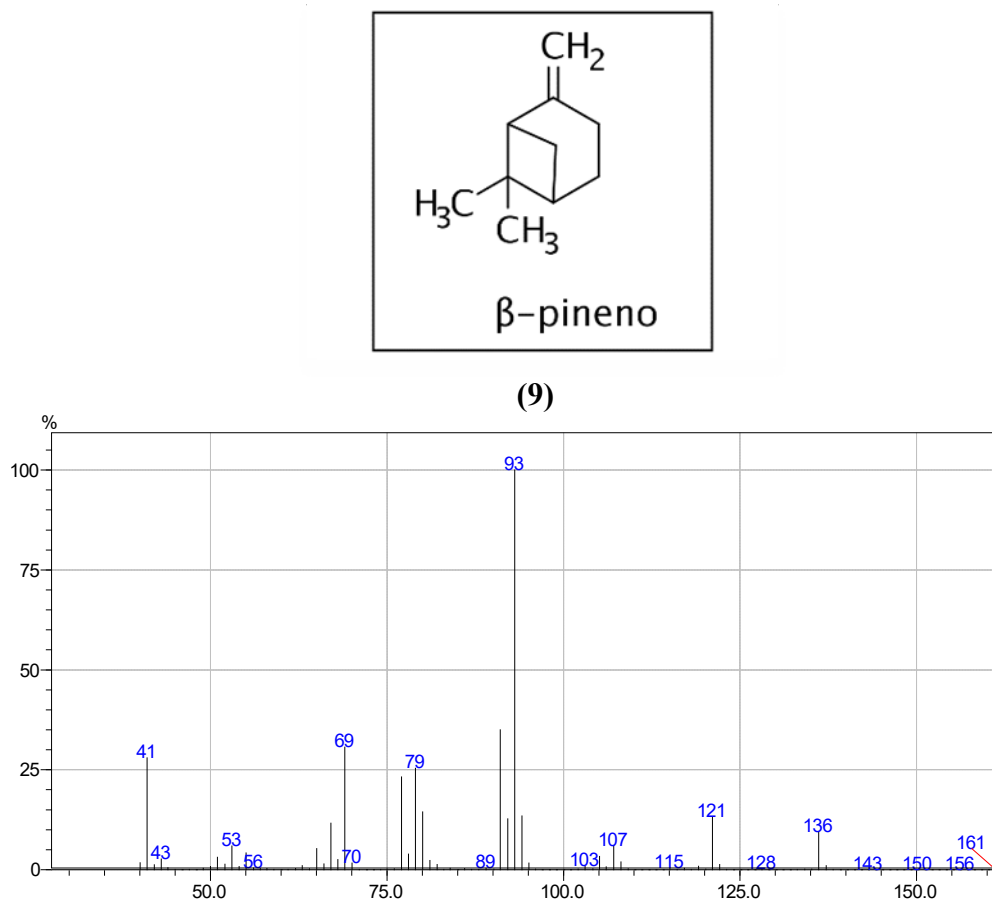


(8)



Fonte: autor, 2018.

FIGURA 12 - Espectro de massas do β -pineno presente no óleo essencial de *O. porosa*



Fonte: autor, 2018.

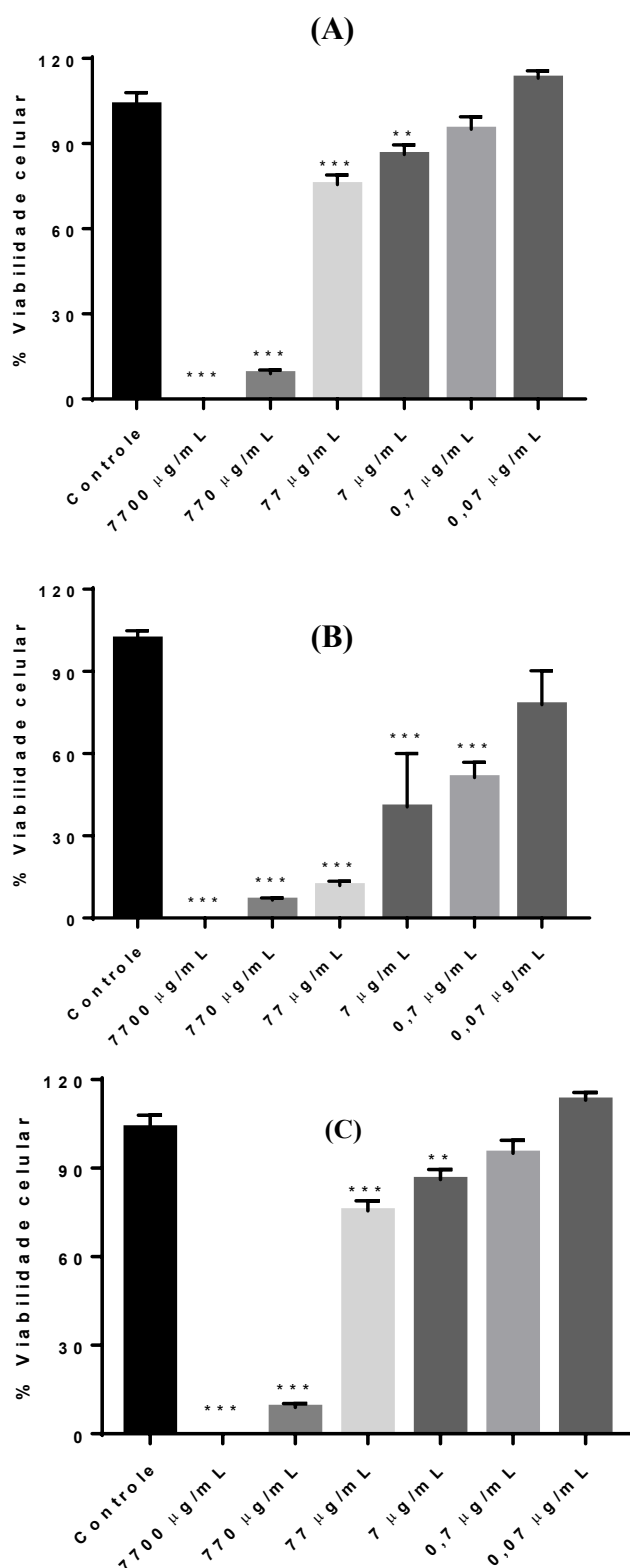
6.4 AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS

6.4.1 Citotoxicidade

6.4.1.1 Determinação da citotoxicidade e IC_{50} do óleo essencial de *Ocotea porosa*.

Neste estudo avaliou-se a citotoxicidade do OE extraído de *O. porosa* em cultura de células de fibroblasto murino (McCoy, ATCC® CRL-1696), melanoma murino (B16F10, Banco de Células do Rio de Janeiro, código 0342) e adenocarcinoma de mama humano (MCF7, Banco de células do Rio de Janeiro, 0162). A citotoxicidade do OE de *Ocotea porosa* em linhagem celular de fibroblasto e melanoma murino e carcinoma de mama humano estão demonstrados no gráfico 1.

GRÁFICO 1 - Viabilidade celular após 72 h de exposição à diferentes concentrações do óleo essencial de *Ocotea porosa* pelo método do MTT. A – McCoy, B – B16F10, C – MCF-7. Cada barra representa a média $\pm$ o erro padrão da média de 3 experimentos diferentes realizados em quadruplicata. ANOVA de uma via e pós teste de Tukey. Foi considerado significativo $p < 0,05$. * $p < 0,05$, *** $P < 0,001$.



Pôde-se perceber que em relação ao controle (células encubadas apenas com o meio de cultivo celular) o OE foi capaz de reduzir a viabilidade das células em todas as linhagens testadas até a concentração de 0,7 µg/mL para as linhagens McCoy e B16 F10 e 7 µg/mL para a linhagem MCF-7.

Utilizando os resultados de viabilidade celular obtidos por meio do ensaio de citotoxicidade da figura 14, foi calculado o valor de IC₅₀ para o OE de *O. porosa* para três as linhagens celulares, como demonstrado na tabela 2:

TABELA 2 - Valores de IC₅₀ para as linhagens celulares incubadas com o OE de *Ocotea porosa* e os índices de seletividade (IS) das linhagens tumorais (B16F10 e MCF-7) em relação à linhagem não tumoral (McCoy).

Linhagem	IC ₅₀ (µg/mL)	IS
McCoy	9,23	-
B16F10	8,82	1,05
MCF-7	185,4	0,05

Fonte: Autor, 2018.

Várias pesquisas têm mostrado uma atividade supressiva dos OEs contra o câncer, tanto *in vitro* como *in vivo* (BHUYAN et al., 2017).

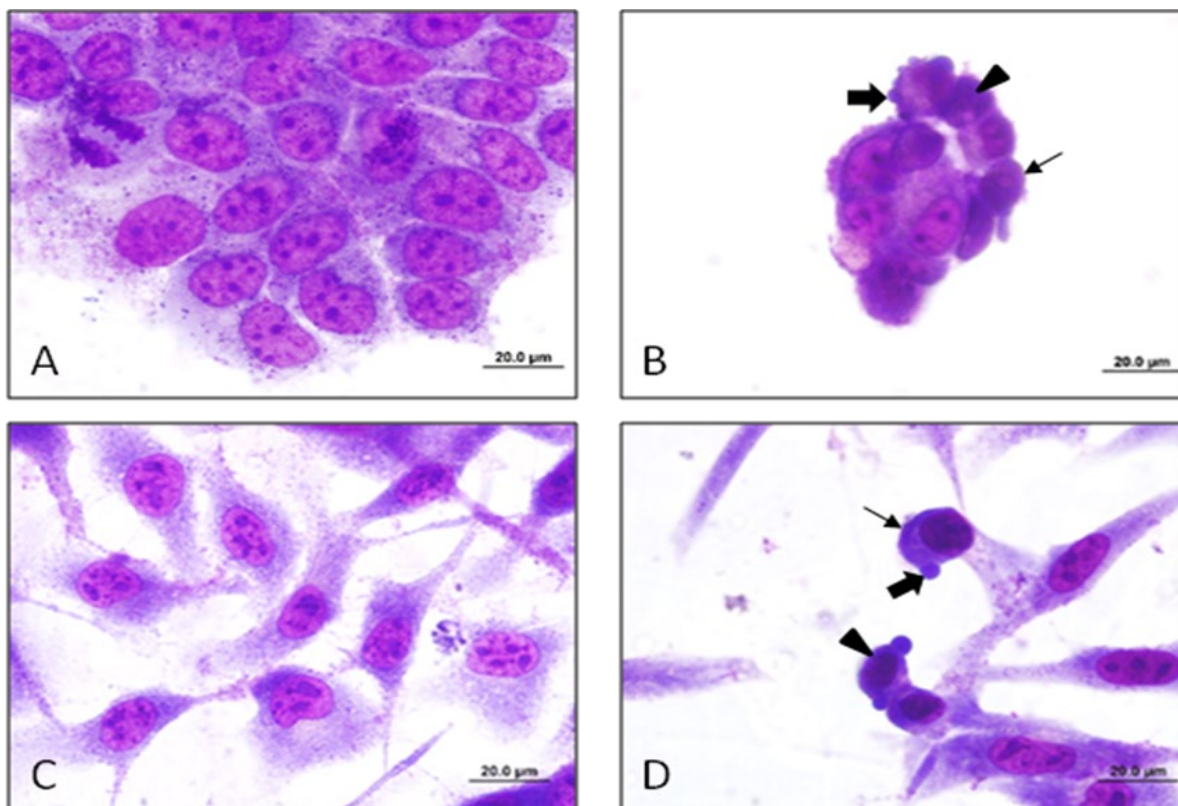
Concentrações crescentes do OE de *O. porosa* foram adicionadas às culturas celulares em placas de 96 poços por um período de 72 h. O óleo essencial foi capaz de reduzir a viabilidade celular de todas as linhagens testadas (Figura 1). Através da interpolação das concentrações utilizadas no ensaio de citotoxicidade, foi possível determinar IC₅₀ do óleo essencial para as linhagens testadas.

A razão entre a IC₅₀ da linhagem não tumoral (McCoy) em as IC₅₀ das linhagens tumorais nos permitiu determinar o índice de seletividade (IS) (tabela 1). Ayesh, Abed e Faris (2014) sugerem que para um composto ser considerado de baixa toxicidade e com boas chances de ser uma nova droga anticâncer, deve apresentar um IS superior a 2. Os resultados da tabela 1 mostram IS inferiores a 1, entretanto, esses valores podem melhorar após fracionamento e isolamento de compostos. O IC₅₀ significativamente baixo para a linhagem B16F10 sugere que o OE de *O. porosa* apresenta um grande potencial para bioprospecção de novos componentes com potencial para o desenvolvimento de novos produtos anticâncer.

Estudos com as espécies *O. caudata* (Nees) Mez, *O. cujumary* Mart., e *O. caniculata* (Rich.) apresentaram valores de IC₅₀ de biciclogermacreno, α-pineno e β-pineno contra células MCF-7 foram de 19,0, 30,7 e 80,2 µg/mL, respectivamente, esses componentes

sugerem uma boa ação citotóxica contra o carcinoma cervical (HeLa), leucemia (HL-60), carcinoma do cólon (HCT), adenocarcinoma de mama (SKBr) e melanoma (A2058) (SILVA et al., 2017a).

FIGURA 13 - Alterações morfológicas encontradas em linhagens celulares.



Linhagens celulares incubadas com 77 µg/mL do óleo essencial de *O. porosa* por 24 h. A: linhagem de adenocarcinoma de mama humano (MCF7) controle (incubada apenas com meio de cultura). B: MCF7 tratada com óleo de *O. porosa*. C: Linhagens celulares de melanoma murino (B16F10) controle (incubadas apenas com meio de cultura). D: B16F10 tratada com óleo de *O. porosa*. É possível perceber alterações morfológicas importantes como condensação de cromatina (▲), arredondamento celular (↑) e formação de *blebs* (▴). Aumento de 1000x, coloração de May Grunwald-Giemsa.

Fonte: autor, 2018.

6.4.2 Análise Morfológica

O OE de *O. porosa* apresentou citotoxicidade para as linhagens utilizadas no estudo. O óleo induziu nas linhagens uma série de alterações morfológicas importantes como condensação de cromatina, arredondamento celular e formação de *blebs* (Figura 14). Efeitos adversos resultantes da interferência nos processos essenciais para a sobrevivência, proliferação e função celular é denominado citotoxicidade. Esses efeitos podem envolver diferentes fatores que mantêm a integridade celular, como alterações na permeabilidade da membrana e do citoesqueleto, metabolismo celular, síntese ou degradação de produtos

celulares ou liberação de constituintes celulares ou produtos, regulação de íons e na divisão celular, o que podem desencadear um processo de morte celular (ESTEVEZ-PEDRO, 2013).

Estão dentre os processos de morte celular, a necrose, apoptose, autofagia, citostase e cornificação (KROEMER ET AL, 2009). As alterações morfológicas observadas nas células após o tratamento com o OE de *O. porosa* foram características de um processo de morte celular por apoptose (formação de blebs, condensação de cromatina e arredondamento celular) (MEER et al, 2010). Apesar disso, a confirmação da ocorrência de apoptose só poderia ser feita após a utilização de técnicas mais específicas como externalização de fosfatidilserina e mensuração de caspases.

6.4.3 Atividade Antioxidante.

A atividade antioxidante do OE de *O. porosa* foi avaliada por meio dos métodos do fosfomolibdênio e do 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH).

6.4.3.1 Método da redução do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH)

A tabela 3 apresenta a atividade antioxidante relativa (AA%) do OE de *O. porosa* em relação ao padrão ácido gálico que foi usado como substância de referência, em diferentes concentrações para o ensaio experimental, considerando que sua atividade antioxidante foi de 100%.

TABELA 3 - Média e desvio padrão das porcentagens de atividade antioxidante pelo método do DPPH• em diferentes concentrações, no tempo 30 min.

	AA%				
	0,5 mg/mL	5 mg/mL	10 mg/mL	15 mg/mL	20 mg/mL
Óleo essencial	43,67± 6,07	42,26± 1,59	43,39± 1,75	51,34± 0,99	45,99± 2,34
Ácido gálico	88,61± 0,76	87,97± 1,38	89,31± 0,24	95,15± 0,36	89,03± 0,21

Fonte: Autor, 2018.

O padrão ácido gálico apresentou uma capacidade antioxidante bem maior do que do OE de *O. porosa*.

O radical DPPH, quando sofre redução formando difenil-picril-hidrazina, apresenta coloração amarela. Essa capacidade de redução do DPPH se relaciona a sua capacidade específica de receber um hidrogênio da amostra, ou seja, esse método avalia o poder redutor

do antioxidante (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006). Através da redução do radical livre DPPH, ocorre a mudança da coloração violeta original, para uma coloração amarelada.

Em forma geral, os OEs, não contêm numerosos compostos aromáticos que possuem mais de uma hidroxila, portanto, não são capazes de reduzir de forma significativa o radical livre DPPH pelos seus compostos voláteis insaturados (DÖLL-BOSCARDIN et al., 2015).

Considerando espécies de *Ocotea*, a atividade antioxidante utilizando o método do DPPH foi observada em *O. bullata* (Burch.) E. Meyer in Drege (PICKING, 2017), *O. odorifera* (GONTIJO et al., 2017), *O. bofo* Kunth (GUERRINI et al., 2006, FUNASAKI, 2006) e em *O. acutifolia*, *O. indecora*, *O. puberula* e *O. silvestre* (RAMBO, 2014).

6.4.3.2 Determinação da atividade antioxidante pela formação do complexo fosfomolibdênio

A análise da atividade antioxidante do OE de *O. porosa* por meio da formação do complexo fosfomolibdênio foi realizada (Tabela 4), evidenciando atividade antioxidante de $1,989 \pm 0,16$. O valor atingido pelo OE é maior do que o determinado para o ácido gálico para esse método ($1,1636 \pm 0,16$).

TABELA 4 - Determinação da atividade antioxidante pela formação do complexo fosfomolibdênio

Atividade antioxidante		
Ácido ascórbico	Ácido Gálico	Óleo essencial
60,64±0,16	103,61±0,16	53,76±0,16

Fonte: Autor, 2019.

O ensaio de redução do complexo fosfomolibdênico utilizado para avaliar a capacidade antioxidante total de OEs e de outras substâncias, a partir da redução do molibdênio (VI) para molibdênio (V) com a formação de um complexo fosfato-Mo⁺⁵ em pH ácido, apresenta coloração verde (PRIETTO; PINEDA; AGUILAR, 1999).

Comparando os dois métodos utilizados na pesquisa da atividade antioxidante, o OE de *O. porosa* inclui muitos voláteis com estruturas químicas insaturadas que podem promover a redução do complexo fosfomolibdênico. Entretanto, apresenta poucos compostos com hidroxilas ácidas ou de natureza fenólica que dificultam a redução do radical livre DPPH (DÖLL-BOSCARDIN et al., 2015).

O. bicolor Vattimo-Gil evidenciou atividade antioxidante, com destaque da fração hexânica pelo método de formação do complexo fosfomolibdênio com resultados de 52,33% (DAMACENO, 2017).

6.4.4 Atividade Inseticida

O OE de *O. porosa* foi exposto ao teste de toxicidade contra duas cepas de percevejo (resistente a Inseticida 'Bayonne' e suscetível 'Ft. Dix') usando três métodos de entrega, ou seja, tópico, residual e fumigante. O OE de *O. porosa* (100 µg/inseto) produziu 13,3% de mortalidade em Ft. Dix estirpe que poderia chegar a 23,3%, 7 dias após o tratamento em FT. Dix, enquanto nenhuma mortalidade foi registrada na linhagem de Bayonne. O OE de *O. porosa* não foi tóxico para percevejos no teste de atividade fumigante (250 µg/125 mL de ar) e residuais (100 µg/cm²).

Utilizando os mesmos métodos, o EO de *Baccharis sphenophylla* Dusén ex Malme produziu 66,67 ± 3,33% de mortalidade na cepa resistente à inseticida 'Bayonne', enquanto produziu 83,33 ± 3,33% de mortalidade na cepa suscetível 'Ft.Dix', 24 h depois do tratamento (BUDEL et al., 2018), enquanto o OE de *Schinus molle* L. produziu 100,0 ± 0,00% (Ft. Dix) e 90,0 ± 5,77% (Bayonne) de mortalidade, 24 h após o tratamento (MACHADO et al., 2019).

6.4.5 Atividade Antimicrobiana

Durante o ensaio não foram encontradas concentrações do OE que inibissem o desenvolvimento das espécies microbianas *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923, *Escherichia coli* ATCC® 25922 e do fungo *Candida albicans* ATCC® 10231, analisadas.

TABELA 5 - Referente à atividade antimicrobiana por microdiluição.

Microorganismo	0,035g/100µL	0,0175g/100µL	0,00875g/100µL	0,004375g/100µL	0,0021875g/100µL
<i>Staphylococcus aureus</i>	NI	NI	NI	NI	NI
<i>Escherichia coli</i>	NI	NI	NI	NI	NI
<i>Candida albicans</i>	NI	NI	NI	NI	NI

(NI): não houve inibição do crescimento bacteriano; (IT): inibição total do crescimento bacteriano.

Fonte: O autor, 2019.

7 CONCLUSÃO

Nesse estudo foram encontradas características anatômicas que auxiliam na identificação de *O. porosa* (Nees & Mart.) Barroso, como folhas hipostomáticas, estômatos paracíticos e tricomas tectores, nervura central e pecíolo biconvexos com um feixe vascular colateral em arco aberto, caule com camada esclerenquimática e areia cristalina formada por oxalato de cálcio; compostos fenólicos encontrados na epiderme, floema e xilema da nervura central, pecíolo e caule.

O OE apresentou um teor médio de $1,03\% \pm 0,7\%$ e, quando analisado por CG/MS, evidenciou como compostos majoritários, o biciclogermacreno (24,62%), α -pineno (19,71%) e β -pineno (13,86%).

Quanto à citotoxicidade avaliada pelo método do MTT, o OE de *O. porosa* mostrou-se citotóxico para as linhagens celulares fibroblasto murino (McCoy, ATCC® CRL-1696) IC_{50} igual a 9,23, melanoma murino (B16F10) IC_{50} igual a 8,82 e adenocarcinoma de mama humano (MCF7) IC_{50} igual a 185,4. No entanto, não evidenciou seletividade contra as células tumorais em estudo.

Quanto a análise antioxidante, o OE de *O. porosa* apresentou reduzida atividade, pelo método DPPH, enquanto que pelo método do fosfomolibidênio o OE evidenciou um potencial antioxidante maior do que o ácido gálico.

O EO de *O. porosa* não se mostrou tóxico para bed bugs como fumigante, nem ativo em aplicações tópicas e residuais. Nenhuma mortalidade foi observada em ambas as cepas, Bayonne e Ft. Estirpe Dix decorrente do uso do OE de *O. porosa*.

Durante o ensaio não foram encontradas concentrações do OE que inibissem o desenvolvimento das espécies microbianas.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography / Mass Spectrometry**. Carol Stream IL: Allured Publishing, 4 th, 2007.
- ALMEIDA, V. P. de. et al. **Comparative morphoanatomical analysis of *Mikania* species**. Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 27, p. 9-19, 2017.
- AMATO, C. M.; **Ecologia de populações de *Ocotea porosa* (Nees) Barroso em áreas submetidas a diferentes graus de perturbação**. Setor de Ciências Biológicas, [s. l.], p. 57, 2008.
- AMIRI, H. **Essential Oils Composition and Antioxidant Properties of Three *Thymus* Species**. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2012.
- ASTANI, A.; SCHNITZLER, P. **Antiviral activity of monoterpenes beta-pinene and limonene against herpes simplex virus in vitro**. Iranian Journal of Microbiology, v. 6, n. 3, p. 149–155, 2014.
- ATANASOV, A. G. et al. **Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review**. Biotechnology Advances. v. 33, p. 1582–1614, 2015.
- BARBOSA, L. C. A.; FILOMENO C. A.; Teixeira, R. R. **Chemical variability and biological activities of *Eucalyptus* spp. essential oils**. Molecules. v. 21, p. 1671-1686, 2016.
- BERLYN, G. P.; MIKSCHE, J. P. **Botanical microtechnique and cytochemistry**. Eames: Iowa State University, p. 326, 1976.
- BHUYAN, D. J.; SAKOFF, J.; BOND, D. R.; et al. **In vitro anticancer properties of selected *Eucalyptus* species**. In Vitro Cellular and Developmental Biology, v. 53, p. 604-615, 2017.
- BLASS, B. E. **Basic principles of drug discovery and development**. Philadelphia (PA): Elsevier; 2015.
- BOBEK, Vanessa B. et al. **Comparative analytical micrographs of “vassouras” (*Baccharis*, Asteraceae)**. Revista Brasileira de Farmacognosia, [s.l.], v. 26, n. 6, p.665-672, nov. 2016

BRANDÃO, H. N. et al. **Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas.** Química Nova, v. 33, p. 1359-1369, 2010.

BRASIL. **MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE.** PORTARIA MMA Nº 443, DE 17 DE DEZEMBRO DE 2014. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/>>. Acesso em: 15 set. 2018.

BRITO, A. F. R. **Análise de variação sazonal e das atividades antifúngica e antimicrobiana em óleos essenciais de *Ocotea porosa* (Nees) Barroso e *Nectandra megapotamica* (Spreng.).** Dissertação – UFPR, Curitiba, PR, p. 123, 2009.

BROOKER, M. I. H.; KLEINIG, D. A. **Field guide to *Eucalyptus*.** Vol. 1. South-Eastern Australia, 3rd ed. Bloomings, Melbourne. 2006.

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

BRUNI R. et al. **Chemical composition and biological activities of ishipingo essential oil, a traditional ecuadorian spice from *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. (Lauraceae) flower calices.** Food Chemistry, n. 85 p. 415-421. 2004

BUCHBAHUR, K. H.; BOHUSCH, G. **Biological Activities of Essential Oils: An update. In: Handbook of Essential Oils: Science, Technology and Applications,** 2. Ed. Boca Raton: CRC Press, 2016.

BUDEL, J. M. et al. **Foliar anatomy and microscopy of six Brazilian species of *Baccharis* (Asteraceae).** Microscopy Research And Technique, [s.l.], v. 81, n. 8, p.832-842, 27 abr. 2018.

BUDEL, Jane et al. **Essential Oils of Five *Baccharis* Species: Investigations on the Chemical Composition and Biological Activities.** Molecules, [s.l.], v. 23, n. 10, p.2620-2639, 12 out. 2018.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies Florestais Brasileiras: Recomendações Silviculturais, Potencialidades e Uso da Madeira.** EMBRAPA- CNPF, Brasília. 1994.

CHAVEERACH, A.; SUDMOON, R.; TANEE, T. **Interdisciplinary researches for potential developments of drugs and natural products.** Asian Pacific Journal Of Tropical Biomedicine, [s.l.], v. 7, n. 4, p.378-384, abr. 2017.

CHAVERRI, C.; DIAZ, C.; CICCIO, J. F. **Chemical Analysis of Essential Oils from *Ocotea gomezii* W.C. Burger and *Ocotea morae* Gómez-Laur. (Lauraceae) Collected at “Reserva Biológica Alberto M. Brenes” in Costa Rica and their Cytotoxic Activity on Tumor Cell Lines.** Journal of the Brazilian Chemical Society, v. 22, n. 4, p. 741- 745, 2011.

CAVALCANTE, G.M. et al. **Potencialidade inseticida de extratos aquosos de essências florestais sobre mosca-branca.** Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v.41, n.1, p.9-14, 2006.

COE-TEIXEIRA, B. **Lauráceas do gênero *Ocotea* do estado de São Paulo.** Rodriguésia, v. 32, n. 52, p. 55 – 190, 1980.

COUTINHO, D. F. et al. Morfo-anatomia foliar de *Ocotea gardneri* (Meisn.) Mez (Lauraceae-Lauroideae). **Revista Brasileira Farmacognosia**, v.16, n. 4, p. 178-184, 2006b

COUTINHO, D. F. et al. Morphoanatomical study of the leaves of *Ocotea duckei* Vattimo (Lauraceae-Lauroideae). **Revista Brasileira Farmacognosia**, v.16, n. 4, p. 537-544, 2006a.

CORRÊA, M. P.; PENNA, L. A. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas.** V. 4, Rio de Janeiro: IBDF,. p. 237-247. 1969

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. **Biodiversidade: Um componente essencial na descoberta de fármacos.** In: CECHINEL-FILHO, V.; YUNES, R. A. Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia. 5. ed. UNIVALI, 2016.

CRAGG, G. M.; PEZZUTO, J. M. **Natural Products as a Vital Source for the Discovery of Cancer Chemotherapeutic and Chemopreventive Agents.** Medical Principles And Practice, [s.l.], v. 25, n. 2, p.41-59, 17 dez. 2015.

DA SILVA, J. et al. **Chemical Diversity, Biological Activity, and Genetic Aspects of Three *Ocotea* Species from the Amazon.** International Journal Of Molecular Sciences, [s.l.], v. 18, n. 5, p.1081-1095, MDPI AG. 18 maio 2017.

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

DAVID, B.; WOLFENDER, J.; DIAS, D. A. **The pharmaceutical industry and natural products: historical status and new trends.** *Phytochemistry Reviews*. v. 14, p. 299–315, 2015.

DÖLL-BOSCARDIN, P. M. et al. **Antioxidant, antimicrobial and pediculicidal activities of *Eucalyptus benthamii* essential oil.** *Latin American Journal of Pharmacy*, v. 34, n. 9, p. 1823-1829, 2015.

DUARTE-ALMEIDA, J. et al. **Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH.** *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 26, n. 2, p. 446-452, 2006.

DUTRA, R. C. et al. **Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives.** *Pharmacological Research*, [s.l.], v. 112, p.4-29, out. 2016.

ESTEVES-PEDRO, N. M. **Avaliação in vitro da toxicidade de óleos essenciais da flora Latino-americana candidatos ao uso em cosméticos.** Dissertação (Mestrado em Produção e Controle Farmacêuticos) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

FARAGO, P. V. et al. **Análise morfoanatômica de folhas de *Ocotea puberula* (Rich.) Nees, Lauraceae.** *Revista brasileira de farmacognosia*. 2005, vol.15, n.3, pp.250-255.

FLORÃO, A. et al. **Essential oils from *Baccharis* species (Asteraceae) have anti-inflammatory effects for human cells.** *Journal of Essential Oil Research*.2012; 24, 561–570.

FOSTER, A. S. **Practical plant anatomy.** 2. ed. Princeton: D. Van Nostrand, 1949. 228 p.

FUNASAKI, M. **Estruturas, atividade biológica e biossíntese de metabólitos secundários de *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae).** Universidade de São Paulo. Instituto de Química, n. 111, p. 4510, 2006.

GABE, M. **Techniques Histologiques.** Masson & Cie, Paris. 1968.

GONÇALVES, R. A. et al. **Anatomical characters and chemical profile of leaves of three species in Lauraceae family.** Revista Brasileira de Farmacognosia, [s.l.], v. 28, n. 1, p.1-8, jan. 2018.

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

GOVINDARAJAN, M.; BENELLI, G. **Eco-friendly larvicides from Indian plants: Effectiveness of lavandulyl acetate and bicyclogermacrene on malaria, dengue and Japanese encephalitis mosquito vectors.** Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 133, p. 395–402, 2016.

GUERRINI, A. et al. **Composition of the Volatile Fraction of *Ocotea bofo* Kunth (Lauraceae). Calyces by GC-MS and NMR Fingerprinting and Its antimicrobial and antioxidant Activity.** Journal of Agriculture and Food Chemistry. v. 54 n. 20 p. 7778-7788. 2006

GUIMARÃES, A. G. et al. **Atividade farmacológica de monoterpenos. In Farmacognosia: Coletânea Científica; UFOP: Ouro Preto, Brazil, pp. 219–250, 2012.**

GUZMÁN-GUTIÉRREZ, S. L. et al. **Linalool and β -pinene exert their antidepressant-like activity through the monoaminergic pathway.** Life Sciences, v. 128, p. 24–29, 2015.

HENRIQUE, A. T.; SIMÕES-PIRES, C. A.; APEL, M. A. **Óleos essenciais: importância e perspectivas terapêuticas.** In: YUNES, R.A.; CECHIMEL FILHO, V. (orgs.). Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia. 3. ed. Itajaí: Universidade do Vale do Itajaí, p. 227-266. 2012.

HIM, A. et al. **Antinociceptive activity of alpha-pinene and fenchone.** Pharmacology online, [s. l.], v. 3, p. 363–369, 2008.

IUCN 2018. **Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da IUCN.** Versão 2018-2. <http://www.iucnredlist.org>

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique.** New York: MacGraw Hill Book, p. 523, 1940.

KRAUS, J.E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. EDUR, Rio de Janeiro, 1997. 198 pp.

KROEMER, G. et al. **Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death**. Cell Death & Differentiation, v. 16, n. 1, p. 3-11, 2009.

KUMAR P, SHARMA B, BAKSHI N. **Biological activity of alkaloids from Solanum deucamara L**. Natural Product Research. 23: 19-23. 2009.

LAHLOU, M. **The success of natural products in drug discovery**. Pharmacology & Pharmacology, v. 4, p. 17-31, 2013.

LEE, D. et al. **Paraptosis in the anti-cancer arsenal of natural products**. Pharmacology & Therapeutics, v. 162, p. 120–133, 2016.

LI, X.; WANG, W.; LUO, M. **Solvent-free microwave extraction of essential oil from Dryopteris fragrans and evaluation of antioxidant activity**. Food Chemistry, v. 133, p. 427-444, 2012.

MAACK, R. **Geografia física do Estado do Paraná**. 3.ed. Curitiba, Imprensa Oficial, 2002. 440p.

MACIEL, M. A. M. et al. **Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares**. Química Nova, São Paulo, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MARQUES, C. A. **Importância econômica da Família Lauraceae Lindl**. Floresta e Ambiente, v. 8, n. 1, p. 195–206, 2001. Disponível em: <http://www.floram.org/files/v8núnico/v8nunicoa25.pdf>

MARTINS, E. M. et al. **Development and characterization of microsatellite loci for Ocotea species (Lauraceae) threatened with extinction**. Genetics and Molecular Research, [s. l.], v. 13, n. 3, p. 5138–5142, 2014.

MEER, F. J. VAN DER. **Apoptosis and necrosis induced changes in light attenuation measured by optical coherence tomography**. Lasers Medicine Science, v. 25, p.259–267. 2010.

METCALFE, C. R.; CHALK, L. **Anatomy of the Dicotyledones: leaves, stem and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses**. Oxford: Clarendon Press, v.2. 1972.

MIGUEL, M. G. **Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: a short review**. *Molecules*, v. 15, p. 9252-9287, 2010.

MORAES, M. M.; CAMARA, C. A. G.; SILVA, M. M. C. **Comparative toxicity of essential oil and blends of selected terpenes of *Ocotea* species from Pernambuco, Brazil, against *Tetranychus urticae* Koch**. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, [s.l.], v. 89, n. 3, p.1417-1429, 31 jul. 2017.

MOSMANN, T. **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays**. *Journal of Immunological Methods*, v. 65, p. 55–63, dez. 1983.

NATH, B. S.; KUMAR, R. P. S. **Ecotoxicol**. *Environ. Saf.* 1999, 42, 157.

O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; MCCULLY, M. E. **Polychromatic staining of plant cell walls by Toluidine Blue O**. *Protoplasma*, v. 59, p. 368-373, 1964.

PEREIRA, C. B. et al. **Essential oil. Toxicol**. *In Vitro*, 42, 214–221. 2017.

PERERA, R. M.; BARDEESY, N. **Cancer: when de antioxidants are bad**. *Nature*, v. 475, ed. 43, 2011.

PFERSCHY-WENZIG, E. M.; BAUER, R. **The relevance of pharmacognosy in pharmacological research on herbal medicinal products**. *Epilepsy & Behavior*. v. 52, p. 344–362, 2015.

PICKING, D. **The Global Regulatory Framework for Medicinal Plants**. *Pharmacognosy*, [s.l.], p.663-675, 2017.

PINHEIRO Md. et al. **Efeito gastroprotetor do alfa-pineno e sua correlação com a atividade antiulcerogênica de óleos essenciais obtidos de espécies de *Hyptis***. *Phcog. Mag*; 11: 123-30. 2015.

PINTO JUNIOR, A.R. et al. **The study of behavioral response and control effecti venesso fthe *Sitophilus zeamais* L. (Coleoptera: Curculionidae) and different concentrations of**

essential oils. In: INTERNATIONAL WORKING CONFERENCE ON STORED PRODUCT PROTECTION, ABRAPÓS, 2006. 9: 829-824.

PRIETO, J. A. et al . **constituyentes químicos, actividad insecticida y antifúngica de los aceites esenciales de hojas de dos especies colombianas del género *Ocotea* (LAURACEAE).** Revista Colombiana de Química., Bogotá , v. 39, n. 2, p. 199-209, 2010 .

QUINET, A.; ANDREATA, R. H. P. **Lauraceae Jussieu na Reserva Ecológica de Macaé de Cima, Município de Nova Friburgo, Rio de Janeiro, Brasil.** Rodriguésia, [s.l.], v. 53, n. 82, p.59-121, jan. 2002.

RAMBO, M. A. **Óleos voláteis de espécies de ocotea nativas do rio grande do sul : composição química e atividade antioxidante, anti- inflamatória e antifúngica.** Universidade Federal do Rio grande do Sul, [s. l.], p. 1–122, 2014.

RAUT, J. S; KARUPPAYIL, S. M. **A status review on the medicinal properties of essential oils.** Industrial Crops And Products, [s.l.], v. 62, p.250-264, dez. 2014.

REYNOLDS, T. K, G. **Volatile Constituents of Brazilian *Phoebe porosa*.** Journal of Essential Oil Research, v. 7 p. 415-418. 1995.

RODERJAN, C.V.; GALVÃO, F.; KUNIYOSHI, Y.S.; SANTOS, E.P. **Caractérisation des unités phytogéographiques dans l'Etat du Paraná, Brésil, et leur état de conservation.** Biogeographica, 77: 129-140. 2001.

ROESER, K. R. **Die nadel der schwarzkiefer-massenprodukt und kunstwerk der natur.** Mikrokosmos, v.61, p.33-36, 1962.

ROHWER JG. **Prodromous einer monographie der Gattung Aublet (Lauraceae), sensu lato.** Mitt Allg Bot Hamburg 20: 3-278. The Plant list; 1986. Disponível em <http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Lauraceae/Ocotea/>. Acesso em 09 Ago. 2018.

RUFATTO, L. C. et al. ***Mikania laevigata*: Chemical characterization and selective cytotoxic activity of extracts on tumor cell lines.** Phytomedicine, v. 20, ed. 10,15 de julho de 2013, p. 883–889.

SANTOS, M.; Oliveira, P. L. **Aspectos anatômicos da lâmina foliar de *Ocotea porosa* (Nees et Mart. ex Nees) J. Angely (Lauraceae).** Ínsula, 1988. 18: 3-22.

SANTOS, M.; ALMEIDA, S. L. **Contribuição ao estudo morfológico e anatômico das domácias em espécies de *Ocotea Aubl.* (Lauraceae) da região sul do Brasil.** 1995.

SASS, J. E. **Botanical microtechnique.** 2. ed. Ames: Iowa State College, 391 p. 1951.

SAULLE, Carolina Ceriani et al. **Anatomy and volatile oil chemistry of *Eucalyptus saligna* cultivated in South Brazil.** Revista Brasileira de Farmacognosia, [s.l.], v. 28, n. 2, p.125-134, mar. 2018.

SAWAMURA, M. **Citrus Essential Oils: Flavor and Fragrance,** John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, 2010.

SCHEER, M. B.; BLUM, C. T. **Arboreal diversity of the Atlantic Forest of Southern Brazil: from the beach ridges to the Paraná river.** In: Grillo, O. & Venora, G. (eds.). The dynamical processes of biodiversity – Case studies of evolution and spatial distribution. InTech. InTech. Pp. 109-134. 2011.

SILVA, Joyce da et al. Chemical Diversity, Biological Activity, and Genetic Aspects of Three *Ocotea* Species from the Amazon. **International Journal Of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 18, n. 5, p.1081-1095, 18 maio 2017. MDPI AG.

SIMEONE, M. L. F. KALIL FILHO, A. N. **Composição Química do Fruto de Imbuia (*Ocotea porosa*) Nativa do Município de Colombo, PR.** Pesquisa Florestal Brasileira, [s. l.], n. 58, p. 29–34, 2010.

SOLETTI, A. G. **Efeitos da sazonalidade sobre a composição química, potencial antimicrobiano, citotóxico e mutagênico dos óleos essenciais e frações diclorometano e acetato de etila de *piperamplum* e *pipercernuum*.** Universidade do Vale do Itajaí, 2015.

SOUZA, G. S. et al. **Crescimento, teor de óleo essencial e conteúdo de cumarina de plantas jovens de guaco (*Mikania glomerata* Sprengel) cultivadas sob malhas coloridas.** Biotemas, v. 24, ed. 3, setembro de 2011, p. 1-11.

TAVARES, W.S., CRUZ, I., PETACCI, F., ASSIS, J.S.L., FREITAS, S.S., ZANUNCIO, J.C., SERRÃO, J.E. **Potential use of Asteraceae extracts to control *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and selectivity to their parasitoids *Trichogramma pretiosum***

(Hymenoptera: Trichogrammatidae) and *Telenomusremus* (Hymenoptera: Scelionidae). **Industrial Crops and Products**. 2009, v.30, n.3, p.384–388.

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*, [s.l.], v. 35, n. 8, p.525-532, ago. 2007.

THE PLANT LIST. Disponível em: www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Lauraceae/Ocotea/. Acesso em 09 Ago. 2018.

TOLEDO, M. G. T. **Estudo botânico e fitoquímico de *Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer. (Lauraceae) da região metropolitana de Curitiba**. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Paraná – UFPR, Curitiba, 110p. 2000.

VAN DER WERFF H. **A key to the genera of Lauraceae in the New World**. *Ann Missouri Bot Garg* 78: 377-387. 1991.

VANDERLINDE, F. A. et al. **Anti-inflammatory and opioid-like activities in methanol extract of *Mikania lindleyana*, sucuriçu**. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 22, ed. 1, janeiro/fevereiro de 2012, p. 150-156.

VATTIMO-GIL, I. **Contribuição ao conhecimento da distribuição geográfica das Lauraceae VII**. *Rodriguésia*, Rio de Janeiro, v. 32, n. 54, p. 351-367, set. 1980.

YAMAGUCHI, T.; TAKAMURA, H.; MATOBA, T.; TERAQ, J. H. P. L. C. **Method for evaluation of the free radical-scavenging activity of foods by using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl**. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. v. 62, p. 1201–1204, 1998.

WEYERSTAHL, P. et al. **Volatile Constituents of Brazilian Phoebe Oil**. *Flavor and Fragrance Journal* v. 9 n. 4 p. 179-186. 1994.

WOSCH, L.; IMIG, D. C.; CERVI, A. C.; et al. **Comparative study of *Passiflora* taxa leaves: I. A morpho-anatomic profile**. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 25, n. 4, p. 328- 343, 2015.