

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE *OCOTEA*
CEANOTHIFOLIA (LAURACEAE)

Bolsista: Isadora da Silva Moita, CNPq

MANAUS

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

RELATÓRIO FINAL

PIB -E/0002/2012

ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE *OCOTEA*
CEANOTHIFOLIA (LAURACEAE)

Bolsista: Isadora da Silva Moita, CNPq

Orientador: Prof. Dr. Valdir Florêncio da Veiga Junior

MANAUS

2013

Todos os direitos deste relatório são reservados à Universidade Federal do Amazonas, ao Grupo de Pesquisa Q-Bioma (Química de Biomoléculas da Amazônia) aos seus autores. Parte deste relatório só poderá ser reproduzida para fins acadêmicos ou científicos.

Esta pesquisa, financiada pelo Conselho Nacional de Pesquisa – CNPq, através do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica da Universidade Federal do Amazonas, foi desenvolvida pelo Grupo de pesquisa Q-Bioma (Química de Biomoléculas da Amazônia) tendo como subprojeto Química de Lauraceae.

RESUMO

A família Lauraceae possui cerca de 2500 espécies distribuídas em 50 gêneros, sendo 16% dessas encontradas no Brasil. O gênero *Ocotea* é um dos maiores da família sendo quimicamente rico em: flavonoides com atividades biológicas, químicas e farmacológicas já descritas. Estudos preliminares, já relataram a atividade antioxidante de extratos de algumas espécies de *Ocotea*. A *Ocotea ceanothifolia* apresentou resultado positivo, o que sugere a presença de metabólitos secundários, como: alcaloides e flavonoides, pois estas substâncias possuem atividades antioxidante, biológicas e farmacológicas já relatadas. A espécie *Ocotea ceanothifolia* apresenta poucos estudos fitoquímicos descritos na literatura. Tendo em vista este contexto propôs-se este estudo que visou a caracterização do perfil químico e a avaliação da atividade biológica de extratos de folhas e galhos, contribuindo assim para o conhecimento da química das Lauraceae na imensa diversidade Amazônica. Os extratos etanólicos foram obtidos de folhas e galhos coletados na Reserva Florestal Ducke. Foram realizados testes qualitativos e quantitativos de atividade antioxidante frente ao radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) e o teste de atividade inibidora da enzima acetilcolinesterase. O extrato mais ativo foi o de galhos, com resultados positivos para todos os testes. Os extratos foram particionados, obtendo frações de média polaridade e, posteriormente, utilizando metodologias cromatográficas, como: Cromatografia em Coluna em fase normal (CCFN) e Cromatografia em Camada Delgada (CCD). As frações que apresentaram cristais foram recristalizadas, resultando no isolamento de um flavonoide a chalconarigenina-2-O-galactosídeo nas folhas, identificado por análises por espectrometria de massas e RMN de ^1H e ^{13}C , sendo esta uma substância inédita na família Lauraceae. Através de fracionamentos do extrato dos galhos obteve-se duas frações (G e F) com precipitados em forma de cristais que foram analisadas por espectrometria de massas, obtendo espectros com picos característicos da substância já isolada anteriormente nas folhas, sendo que a fração F apresentou-se mais pura. Pode-se considerar que o flavonoide chalconarigenina-2-O-galactosídeo é o constituinte majoritário de *Ocotea ceanothifolia*, pois este foi isolado tanto em folhas quanto em galhos. Este estudo foi de suma importância para o conhecimento da química dos produtos naturais da Amazônia, pois proporcionou o conhecimento do perfil de químico de *Ocotea ceanothifolia* que possui ainda poucos estudos relatados na literatura.

Palavras-chave: *Lauraceae*, flavonoides e atividade biológica.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	06
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	07 á 08
3. METODOLOGIA.....	09
3.1 Ensaio de atividade inibidora da enzima acetilcolinesterase.....	09
3.2 Análise da atividade antioxidante frente ao radical livre DPPH.....	09
3.3 Teste quantitativo e qualitativo de Fenóis Totais.....	09
3.4 Teste quantitativo e qualitativo de Flavonoides Totais.....	09
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	10 á 14
4.1 Estudo fitoquímico das folhas de <i>Ocotea ceanothifolia</i>	10 á 13
4.2 Estudo fitoquímico dos galhos de <i>Ocotea ceanothifolia</i>	13 á 15
5. CONCLUSÃO.....	16
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	17 á 29
7. CRONOGRAMA DE ATIVIDADES.....	20

1. INTRODUÇÃO

O Brasil destaca-se na identificação de novos produtos, devido à sua diversidade biológica existente nas suas florestas e na quantidade de espécies, tornando-o imenso no campo de pesquisa de novas substâncias (Pinto *et al.*, 2002). Dentre as famílias botânicas presentes, a Lauraceae é uma das mais importantes devido à grande quantidade de espécies ricas em substâncias bioativas (Barroso *et al.*, 2002).

As Lauraceae possuem distribuição pantropical sendo bem representadas na América, Ásia tropical, Austrália e Madagascar e pouco expressivas no sul da África. Possui cerca de 50 gêneros e 2500 espécies, sendo que no Brasil existem cerca de 400 espécies distribuídas em 25 gêneros, representando 16% da distribuição mundial. (Barroso *et al.*, 2002).

É caracterizada quimicamente por apresentar em suas diversas espécies substâncias como: terpenos, alcaloides, neolignanas, fenilpropanoides, ésteres e flavonoides (COSTA, 2000; BATISTA, 2010; BARRERA, 2009; FUNASAKI, 2009; GARCEZ, 2011). Um dos maiores gêneros é a *Ocotea*, possuindo cerca de 350 espécies, das quais 16 são encontradas no Brasil. Quimicamente, esse gênero é rico em flavonoides e alcaloides que possuem atividades biológicas e químicas (CHÁVEZ, GOTTLIEB & YOSHIDA, 1995).

Estudos preliminares demonstraram atividade antioxidante promissora e a presença de alcaloides e flavonoides de espécies de *Ocotea* coletadas no Amazonas (Yamaguchi, 2011). Diante desse contexto, este trabalho tem como objetivo geral estudar a composição química e avaliar as atividades químicas e biológicas de extrato de galhos e folhas de *Ocotea ceanothifolia*, isolar e identificar substâncias de média polaridade e avaliar a atividade antioxidante frente ao radical livre DPPH e a atividade inibidora da enzima acetilcolinesterase.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

As Lauraceae, segundo estudos botânicos, estão entre as famílias mais importantes do mundo. No Brasil são encontradas em sua maioria em florestas pluviais e em restingas e nos cerrados (SHEPHERD,2000; QUINET,2002).

As Lauráceas possuem uma considerável importância econômica, em virtude das diversas aplicações existentes, como no comércio de madeira, indústria e uso medicinal. As espécies mais utilizadas na indústria são: *Cinnamomum canphora* Presl., *Aniba rosaeodora* e *Lindera benzoin* (L.) Blume. Estas espécies são utilizadas na indústria de perfumaria e medicamentos, devido ao odor agradável encontrados nos óleos essenciais (MARQUES, 2001).

O gênero *Ocotea* é alvo de vários estudos científicos e tecnológicos, devido ao grande número de atividades biológicas, químicas e farmacológicas provenientes de metabolitos secundários como alcaloides, lignanas e flavonoides. O isolamento do alcaloide glaziovine obtido de extratos da casca e da folha de *Ocotea glaziovii*, resultou em uma patente no ano de 1975 (FERRARI, 1975).

Na química do gênero *Ocotea* já foi relatado o isolamento de alcaloides, terpenos, lignoides e flavonoides. Os exemplos de lignoides já isolados no gênero são: o lioniresinol isolado em *O. cymbarum* e *O. minarum* (GARCEZ, et al.,2005), lignanas furofurânicas isoladas nas folhas de *O. corymbosa* e diferentes neolignanas de *O. elegans*. Foram isolados um éster do ácido 4-O-E cafeoilquínico e terpenos em *O. corymbosa catharinensis* (FUNASAKI, 2009; BATISTA, et al.,2010).

Para as espécies do gênero já foram descritas algumas atividades biológicas como: antioxidante frente ao radical livre DPPH (GARCEZ,2011), acetilcolinesterásica (YAMAGUCHI,2012), antiinflamatória (COY, 2009), antibacteriana (SUBHASHI,2010) e atividades farmacológicas como: antibacteriana, antifúngica (SOUZA et al.,2004), antialérgica, antiviral (GARRETT,2012) atividade cardiovascular(BARBOSA,2007), entre outras.

Alguns estudos relatam no gênero *Ocotea* o isolamento de flavonoides como catequina, epicatequina, flavonol, diidroflavonol, flavonas glicosilados, além de um flavonoide baseado em dibenzeno-cicloheptatrieno (FUNASAKI, 2006).

Os flavonoides são metabólitos secundários que compõem uma ampla classe de substâncias fenólicas de origem natural, que a síntese não ocorre na espécie humana, e estas se diferem pelas suas estruturas e características particulares. Estes compostos possuem uma série de propriedades farmacológicas que os fazem atuarem sobre sistemas biológicos, com isso muitas dessas propriedades são benéficas para a saúde humana (BEHLING, 2004; MACHADO, 2008; LOPES, 2000).

Em *Ocotea*, a maioria dos flavonoides já isolados pertence a classe dos flavonóis e das flavononas, sendo em sua maioria derivados do flavonoide quercetina. Dentre estes flavonoides já isolados, as estruturas principais estão ilustradas na figura 1. Sendo estes flavonoides os seguintes: quercetina-7-O- β -D-glucopiranosideo (1), quercetina-3-O- β -D-glucosideo (2), rel-(2R, 3R)-diidroquercetina-3-O- α -L-raminosideo (3), quercetina (4), taxofilin (5), quercetin-3-O- β -D-galactosideo (6) (GARRETT,2012; GARCEZ,2005; RAGGI,2008).

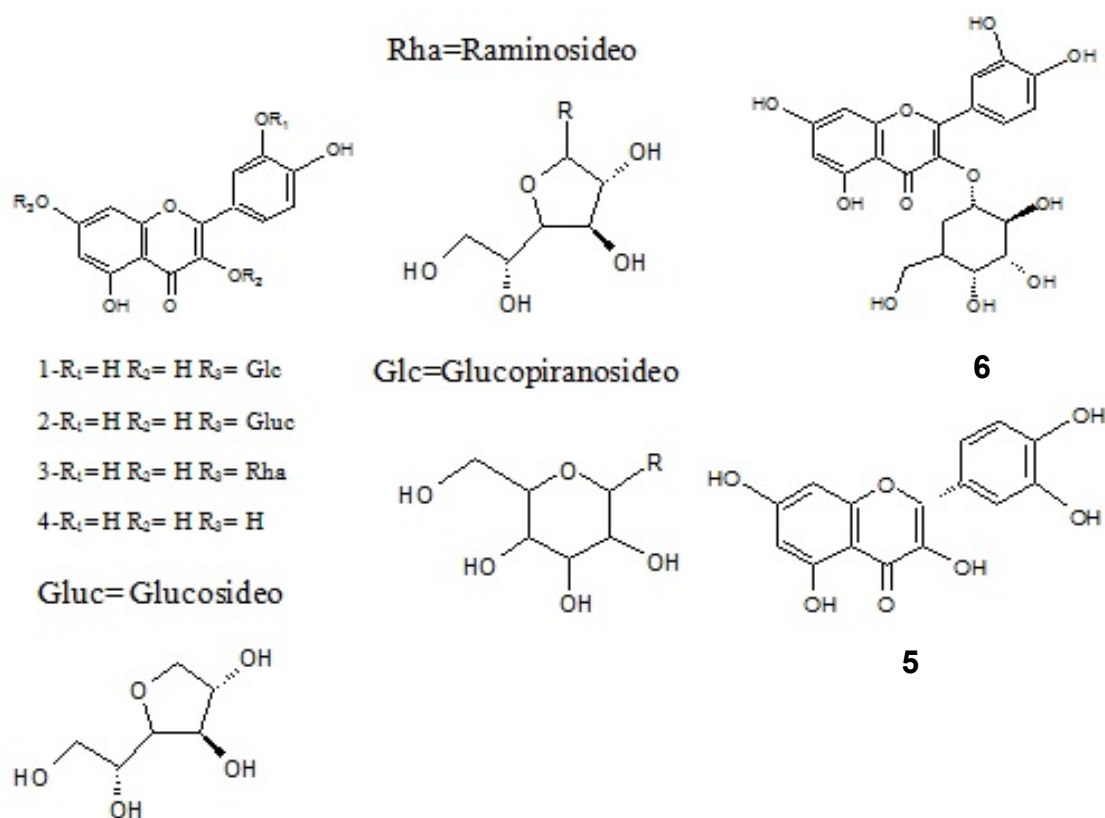
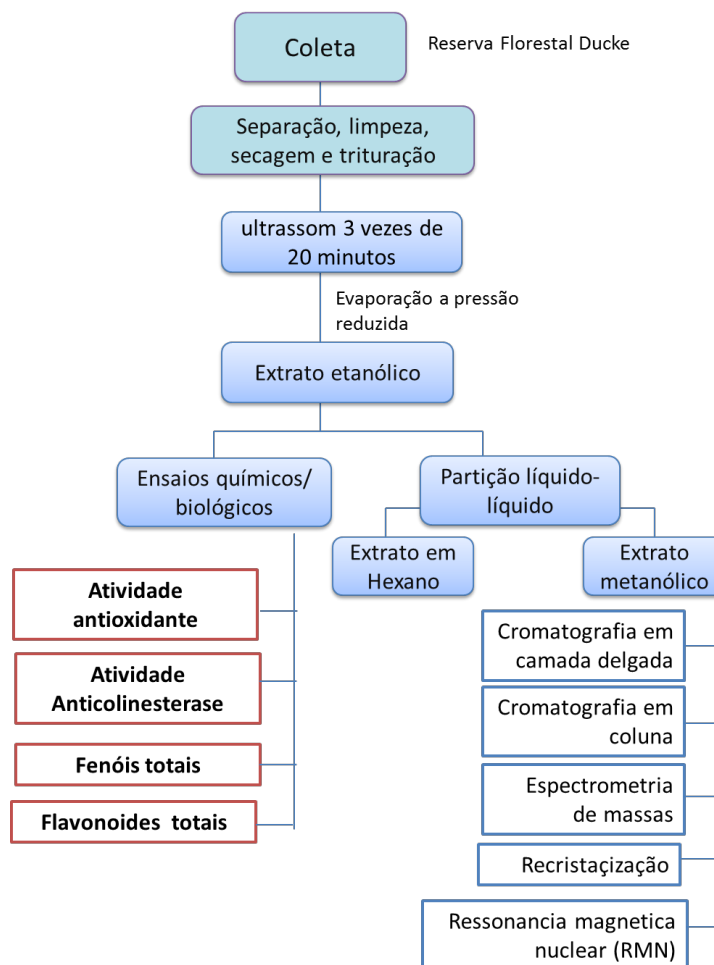


Figura 1. Flavonoides já isolados em *Ocotea*.

3. MÉTODOS UTILIZADOS



3.1 Ensaio de atividade inibidora da enzima acetilcolinesterase

A atividade inibitória de acetilcolinesterase (AChE) foi verificada segundo o método de Ellman (1961), modificado por Rhee *et al* (2001).

3.2 Análise da atividade antioxidante frente ao radical livre DPPH

A atividade antioxidante foi feita quantitativamente segundo Montenegro *et al.*(2006) e Soler-Rivas *et al.*(2000), e feita quantitativamente segundo Mensor (2001) com modificações.

3.3 Teste quantitativo e qualitativo de Fenóis Totais

O método quantitativo utilizado foi o de Folin-Ciocalteu segundo Singleton *et al* (1999).

3.4 Teste quantitativo e qualitativo de Flavonoides Totais

A determinação de flavonoides foi feita quantitativamente pelo método calorimétrico com Cloreto de Alumínio (Chang *et ai.*, 2002) adaptado para microplacas e qualitativamente em cromatoplaça utilizando-se NP-PEG como o reagente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estudo fitoquímico das folhas de *Ocotea ceanothifolia*

Os testes da atividade antioxidante frente ao radical livre DPPH qualitativo foram utilizados para guiar o biomonitoramento dos fracionamentos dos extratos etanólicos. A partir dos resultados obtidos nos testes qualitativos de DPPH e AChE, verificou-se que os testes não apresentaram relação direta, assim como no trabalho de YAMAGUCHI *et al.* (2012) em que os resultados obtidos no teste de DPPH não foram iguais aos resultados do teste de inibição da enzima acetilcolinesterase. Os resultados dos testes de DPPH e AChE estão contidos na tabela 1.

Tabela 1. Atividades qualitativa antioxidante e de inibição da Acetilcolinesterase dos extratos etanólicos e atividade antioxidante quantitativa (CE50 ± DP) dos extratos em etanol.

Amostra	AChE qualitativo	DPPH qualitativo	DDPH (µg/mL±DP)
Folhas	-	+	37,39±2,54
Galhos	+	+	21,24±0,58
Padrões	eserina	quercetina	7,63±0,04

Fez-se a partição líquido-líquido e obteve-se os extratos hexânicos e metanólicos de folhas. O extrato metanólico foi submetido a análise de espectrometria de massas, para analisar o perfil químico do extrato e a identificação das massas das substâncias responsáveis pela atividade antioxidante.

Na literatura já foram relatadas 4 substâncias com massas correspondentes a alguns picos obtidos no espectro de massas. Dentre essas substâncias duas correspondem a alcaloides e as outras duas correspondem a flavonoides. Os dados obtidos na literatura e do espectro de massas estão sumarizados na tabela 2.

Os dois alcaloides relatados foram isolados em espécies diferentes, mas de mesmo gênero. A cassiticina foi isolada em *Ocotea brachybotra* e a natenina foi isolada em *Ocotea macrophylla* e *Ocotea variabilis*. Os flavonoides relatados foram isolados em famílias diferentes, sendo a

quercetina-3-O- β -D-galactosídeo isolada em *Ocotea cymbrosa* (BATISTA,2010) e a chalconanagerina-2-O-galactosídeo foi isolada na família Nymphaeace (ZHU,2012). Esse flavonoide poder ser mais suscetível ao isolamento por ter apresentado uma intensidade máxima no espectro.

Tabela 2. Substâncias correspondentes aos picos obtidos no espectro de massas.

Massa (m/z)	Modo	Intensidade	Nome da Substância	Referência
325,26	POSITIVO	35%	cassitina	ZANIN, 2007
339,26	POSITIVO	54%	nantenina	ZANIN, 2007
433,15	NEGATIVO	100%	chalconanagerina-2-O-galactosídeo	ZHUN M, et al. (2012)
473,20	NEGATIVO	49%	quercetina-3-O- β -D-galactosídeo	RAGGI,2008

Iniciou-se o fracionamento do extrato metanólico por meio de uma Coluna Cromatográfica em fase normal (CCFN). O perfil cromatográfico das 14 frações obtidas a partir da CCFN foi analisado através da CCD e observou-se que 3 frações apresentaram somente uma mancha, sendo estas as que apresentaram cristais após a evaporação total do solvente.

As 3 frações que apresentaram cristais tiveram um rendimento significativo em relação as outras frações da coluna como expressado na tabela 2. A fração 8 apresentou o maior rendimento.

Frações	8	9-A	9-B	Total (%)
Rendimento (%)	15,56	10,02	9,08	34,66

Tabela 2. Rendimento das frações que apresentaram cristas da CCFN das folhas.

Após serem submetidas à recristalização, as frações foram analisadas por espectrometria de massas obtendo 3 espectros, em que o espectro da fração 8 apresentou um perfil mais puro, apresentando os seguintes picos: m/z 457,06 com uma intensidade de 100% no modo negativo, e m/z 433,17 no modo positivo com intensidade de 100%.

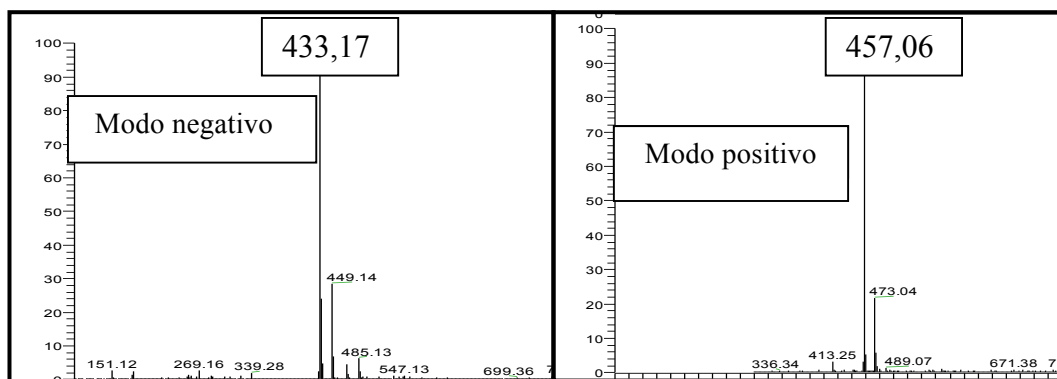


Figura 2. Espectro de Massas da fração 8.

A partir dos dados obtidos na espectrometria de massas, pode-se sugerir que estes dados correspondem à caracterização de um flavonoide glicosilado da subclasse das chalconas, tendo como nome chalconarigenin-2-O-galactoside, sendo esta relada pela primeira vez em *Ocotea* com estrutura da figura 3.

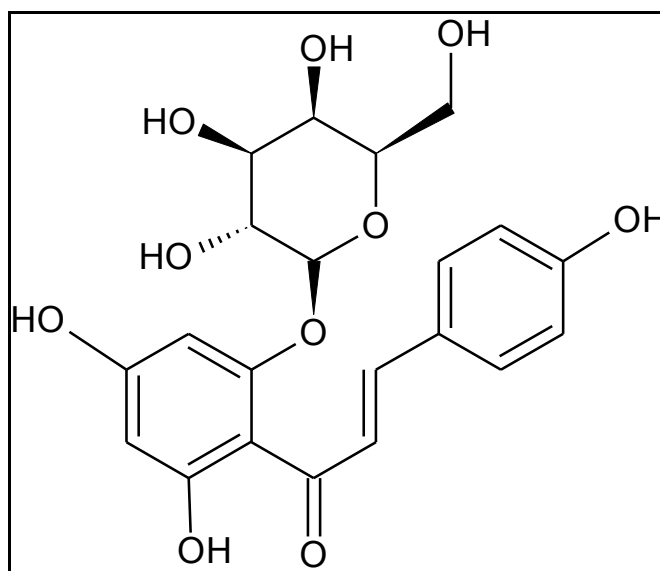


Figura 3. Molécula da chalconarigenina-2-O-galactosídeo

A chalconarigenina-2-O-galactosídeo já foi identificada pela primeira vez em pétalas de Lírio de água amarelo, membro da família Nymphaeace, no trabalho de Manlan Zhu (2012), que detectou este flavonoide através do HPLC com monitoração a 350 nm. Utilizou-se também espectrometria de massas para a identificação do mesmo, obtendo os seguintes resultados: m/z 457

no modo positivo, 273 (Y_0^+), m/z 433 modo negativo, e 271 (Y_0^-), correspondentes aos resultados no espectro de massas obtido da fração 8.

O teste qualitativo para flavonoides totais foi realizado com a substância isolada, utilizando o reagente NP-PEG (2-aminoetil difenilborinato + polietilenoglicol) que é um revelador específico para flavonoides, o resultado foi positivo e este facilitou a identificação da substância, uma vez que a classe desta já foi determinada.

A estrutura da molécula foi confirmada por meio RMN de ^1H e ^{13}C , onde foram encontrados sinais característicos de hidrogênio 1,2; 4,2; 3,5; 3,6; 4,6; 5,1; 5,9; 5,93; 4,1; 6,9; 5,8; 7,4, e sinais característicos de carbono 17,8; 70,5; 71,8; 72,1; 78,6; 83,9; 96,26; 97,4; 10,2; 102,5; 115,5; 116,4; 120,4; 128,6; 130,6; 159,5; 164,1; 165,5; 168,5; 196,1.

A chalconanarigenina-2-O-galactosídeo foi isolada pela primeira vez na família Lauraceae através deste estudo, e esta não possui relato na literatura de atividade biológica, química ou farmacológica, tendo em vista este contexto, pode-se ressaltar a importância de novos estudos relacionados a atividades que possam ser aplicadas na formulação de produtos bioativos.

4.2 Estudo fitoquímico dos galhos de *Ocotea ceanothifolia*

Obteve-se 500 g de galhos após o processamento do material, obtendo-se o extrato etanólico com rendimento de 13,62% para galhos. Assim como para o extrato das folhas, o teste qualitativo de DPPH foi realizado para o extrato dos galhos e este apresentou um resultado positivo.

Os resultados qualitativos dos testes de DPPH de folhas e galhos apresentaram uma relação direta, pois ambos forneceram resultado positivo. Dessa forma, esta espécie foi submetida a um estudo bioguiado, para a detecção das substâncias. O fracionamento do extrato etanólico foi iniciado com uma partição líquido-líquido, obtendo 4 extratos (Hexano (A), CHCl_3 (B), AcOET (C) e MeOH (D)).

Foram realizados com as frações obtidas da partição os testes qualitativos de: fenóis totais, flavonoides totais e DPPH. A partir desses testes foram selecionadas as frações B e C que apresentaram resultado positivo para flavonoides, para posteriormente serem fracionadas por técnicas cromatográficas.

Realizou-se uma CCFN com a amostra B e outra CCFN com a amostra C. Na CCFN da amostra B foram obtidas 14 frações e na CCFN da amostra C foram obtidas 16 frações. Os perfis cromatográficos de cada fração foi obtido através de CCD.

As frações da coluna da amostra B que apresentaram um perfil semelhante foram reunidas, com isso as 14 frações foram reduzidas para 8 frações e com estas foi feita a análise por CCD utilizando vanilina sulfúrica, FeCl_3 e NP-PEG como reveladores. Somente uma fração (H) apresentou resultado positivo para a presença de fenóis e flavonoides, para identificar as substâncias presentes nesta fração fez-se uma análise por espectrometria de massas.

As frações da coluna da amostra C que apresentaram um perfil cromatográfico semelhante foram reunidas, e obteve-se 11 frações, posteriormente fez-se uma análise por CCD utilizando como reveladores: vanilina sulfúrica, FeCl_3 e NP-PEG. Ao solubilizar a fração nomeada de F, pode-se observar a formação de um precipitado, com isso separou-se a parte líquida e o precipitado foi lavado com acetato de etila, o mesmo ocorreu com a fração G e o mesmo processo foi feito.

As frações F e G apresentaram um resultado positivo tanto para fenóis quanto para flavonoides com uma intensidade forte observada na CCD. A CCD da fração F foi feita com o precipitado (FP), parte líquida (FL) e a lavagem em AcOET (A) e a CCD da fração G foi feita com o precipitado (GP), parte líquida (GL) e a lavagem em AcOET (A).

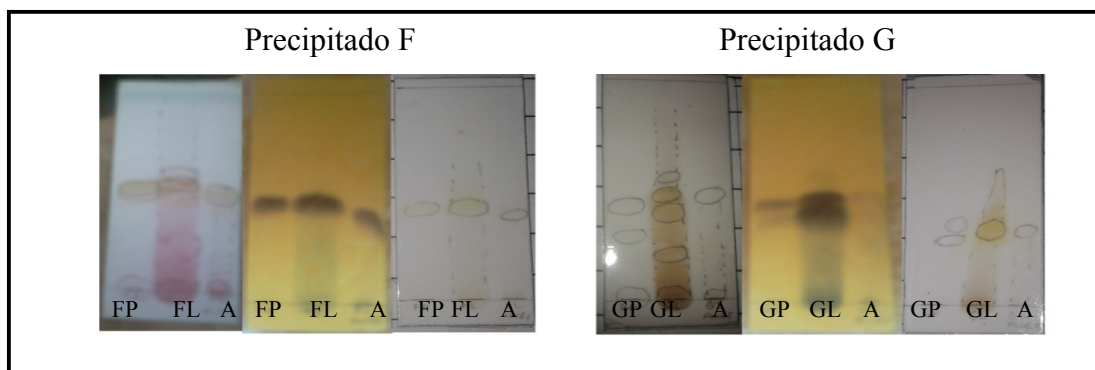


Figura 4. CCD da fração com precipitado, eluente AcOET/MeOH (9:1)

As frações FP e GP apresentaram somente uma mancha na CCD, isso caracteriza um perfil cromatográfico de uma substância possivelmente pura. Foi feita um CCD com o flavonoide

já isolado e o precipitado FP e apresentaram o mesmo RF tendo assim um indício de ser a mesma substância. Para confirmar a identificação foi realizada a análise por espectrometria de massas, obtendo o seguinte espectro de massas.

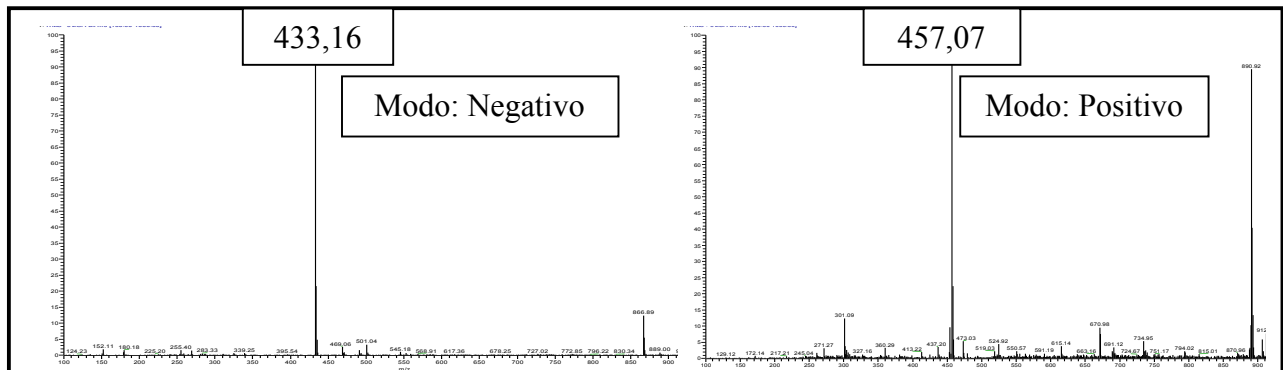


Figura 4. Espectro de Massas do precipitado (FP).

A partir dos dados obtidos no espectro da figura 4, pode-se identificar que a substância do precipitado FP pode ser a mesma isolada nas folhas, com isso pode-se ressaltar que este flavonoide pode ser objeto de estudo muito importante para conhecer o seu potencial ativo, pois o isolamento da chalconarigenin-2-O-galactoside apresentou-se simples com um grande rendimento, assim sendo possível a execução de uma grande quantidade de testes biológico, químicos e farmacológicos.

5. CONCLUSÃO

O teste qualitativo da atividade antioxidante frente ao radical livre DPPH, assim como o teste de inibição da enzima AChE dos extratos etanólicos de folhas e galhos, apresentaram resultados correspondentes a um relato na literatura. A partir do teste quantitativo de DPPH evidenciou-se um maior potencial antioxidante no extrato de galhos, podendo considerar este como o extrato mais ativo, com pronunciada inibição da enzima AChE.

A partir do fracionamento por CCFN do extrato metanólico das folhas obteve-se uma fração possivelmente pura, que após ser submetida à recristalização foi analisada por espectrometria de massas e por RMN de ^1H e ^{13}C . Por meio de comparação de dados da literatura. Foi identificado o flavonoide chalconarigenina-2-O-galactosídeo sendo este relatado pela primeira vez na família Lauraceae. Este flavonoide apresentou um isolamento fácil e de elevado rendimento, evidenciando o grande potencial desta substância para um estudo mais aprofundado de atividades específicas com a mesma.

Com o fracionamento por CCFN da amostra C dos galhos obteve-se duas frações (G e F) com cristais, sendo este indicio de substância possivelmente pura. As frações G e P foram analisadas por espectrometria de massas, obtendo espectros com picos característicos da substância já isolada anteriormente nas folhas, sendo que a fração F apresentou-se mais pura. Pode-se considerar que o flavonoide chalconarigenina-2-O-galactosídeo é constituente majoritário de *Ocotea ceanothifolia*, pois este foi isolado tanto em folhas e galhos.

Este estudo foi de suma importância para o conhecimento da química dos produtos naturais da Amazônia, pois este proporcionou o conhecimento sobre o perfil de químico de *Ocotea ceanothifolia* que possui ainda poucos estudos relatados na literatura.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAITELLO, J. B. Novas espécies de Lauraceae para a flora brasileira. *Acta Botânica Brasilica*. São Paulo, v.15, n.3, p. 445-450, Setembro/Dezembro 2001.
- BARROSO, G. M. Sistemática de Angiosperma do Brasil. São Paulo: EDUSP. v. 1, Ed .2,2002.
- BATISTA, Andrea Nastri de Luca et al., Aromatic compounds from three brazilian lauraceae species. *Química Nova*. São Paulo. v. 33, n. 2,p. 321-323, 2010.
- BRAZ FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. *Química Nova*. São Paulo. v. 33, n. 1, p. 229-239, 2010.
- CHAVEZ, J. P. ; GOTTLIEB, O. R. ; YOSHIDA, M. 10-Desmethyl-1-methyleudesmanes from *Ocotea corymbosa*. *Phytochemistry*. v. 39, n. 4, p. 849-852, 1995.
- COSTA, P R R. Sasafról e eugenol: estudo da reatividade química e uso em síntese de produtos naturais biológicos ativamente. *Química Nova*. São Paulo v. 23, n. 357-369.
- COY-BARRERA, Ericsson D. Et al., PAF-antagonistic bicyclo[3.2.1]octanoid neolignans from leaves of *Ocotea macrophylla* Kunth. (Lauraceae). *Phytochemistry*. v. 70, p. 1309–1314, 2009.
- EKLUND, H. *Bot. J. Linn. Soc.*, v. 132, p. 397, 2000.
- ELLMAN, G.L.,et al.A new and rapid colorimetric determination of Acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*. v. 7, p. 88-95, 1961.
- FUNASAKI,Mariko *et al.*, Neolignans and Sesquiterpenes from Leaves and Embryogenic Cultures of *Ocotea catharinensis* (Lauraceae). *Jornal of the Brazilian Chemical Society*. v. 20, n. 5, p. 853-859, 2009.
- GARCEZ, W. D., *et al.* Indole alkaloid and other constituents from *Ocotea minarum*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. v. 16, n. 6B,p. 1382-1386, 2005.
- GOTTLIEB, O.R Chemosystematics of the Lauraceae. *Phytochemistry*. v. 11, p.1537-1570, 1972.

HUANG D, OU B, Prior RL.. The chemistry behind antioxidant capacity assays. J. Agric and Food Chem. v. 53, p. 1841-1856, 2005.

LEHUÉDE, J., *et al.* Eur. Journal Medic Chemical .v. 34, p. 991, 1999.

MARQUES, C. A. Importância Econômica da Família Lauraceae. Floresta e Ambiente, Universidade Federal de Viçosa. Minas Gerais. v. 8, n.1,p. 195-206, janeiro/dezembro. 2001.

MATHIENSEN, L.,MALTERUD, K. E.,SUND, R. B. Free Radical Biol. Med. 22, 307, 1997

MENSOR, L. L. Screening of brazilian plant extract for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. Phytotherapy Research. v. 16, p. 127, 2001.

MONTENEGRO, L. H. M., *et al.* Terpenoids and evaluation of the antimalarial, larvicidal, antiradical and anticholinesterase potential od *Pouteria venosa* (Sapotaceae). Revista Brasileira de Farmacognosia. n. 16, p. 611-617. 2006.

MORAIS, L.C.S.L., *et al.* (+)-4'-O-Demethylepimagnoli A from *Ocotea duckei*. Fitoterapia. v. 69,p.91-92, 1998.

NODORI, R.O.; GUERRA, M.P. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: C.M.O. Simões *et al.* Farmacognosia da planta ao medicamento. Universidade UFRGS. Porto Alegre. Ed. da UFSC, ED. 5º, cap. 16, 2004.

PINTO, A. C., *et al.* Produtos Naturais: Atualidade, desafios e perspectivas. Química Nova. v. 25, n. 01, p. 45-61, 2002.

QUINET, A.; ANDREATA, R. H. P. Lauraceae *Jussieu* na Reserva Ecologica de Macae de Cima, municipio de Nova Friburgo. Rodriguésia, v. 5, n. 82, p. 59-121, 2002.

RHEE, I. K., *et al.* Screening for acetylcholinesterase inhibitors from from Amararyllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. Journal of chromatography. v. 915, n.1, p. 217-223, 2001.

RIBEIRO, J. E. L. S. *et al.* Flora da Reserva Ducke. Guia de Identificação das Plantas Vasculares de uma Floresta de Terra-Firme na Amazônia Central, INPA, DFID: Manaus, AM, Brasil, 1999.

SHEPHERD, G.J. Conhecimento de Diversidade de Plantas Terrestres do Brasil. Ed. Unicamp: São Paulo, p. 19,2000.

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

SOLER-RIVAS, C., ESPIN, J.C., WICHERS, H.J. An easy and fast test to compare total free radical scavenger capacity of foodstuffs. *Phytochemistry Analysis*. v. 11, p. 1–9, 2000.

SOUZA, G. C. *et al.* Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 90, p. 135-143, 2004.

TELES, M.M.R.S. Estudo fitoquímico de *Ocotea duckei* Vattimo (LAURACEAE). Dissertação de Doutorado.2012.

VEIGA, *et al.* Investigação de 20 espécies da família Lauraceae. *Acta Amazonica*, v. 42, p. 541-546, 2012.

ZHUN M, *et al.* (2012) Relationship between the Composition of Flavonoids and Flower Colors Variation in Tropical Water Lily (*Nymphaea*) Cultivars. *Plos one* 7(4): e34335. doi:10.1371/journal.

WAGNER, H.; BLADT, S.. *Plant drug analysis*.. New York:Springer Verlag, ed 2 p.318 1996

YAMAGUCHI, K. K. L. Estudos biológicos dos extratos e composição química dos óleos essenciais de espécies da família Lauraceae. Dissertação (Mestrado em Química de Produtos Naturais).Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus. p.144,2011.

ZANIN, Sandra Maria Warumby; LORDELLO,Ana Luísa Lavaca. Alcalóides aporfinoídes do gênero *Ocotea* (Lauraceae). *Química Nova*.São Paulo, v.30, n.1, p. 92-98, 2007.

ZSCHOCKE, S., *et al.* Stereostructure and anti-inflammatory activity of three diastereomers of ocobullenone from *Ocotea bullata*. *Phytochemistry*. v.54,p. 591-595, 2000.

7. CRONOGRAMA DE ATIVIDADES

