



**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS**



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA  
GERAL/BIOPROSPECÇÃO**

**MILENA MENEZES CORREA PEDERIVA**

**COMPARAÇÃO QUÍMICA E BIOLÓGICA DE EXTRATOS OBTIDOS  
DE *Ocotea minarum* NOS ANOS DE 2017 E 2018**

**v. 1**

**Dourados**

**2019**

COMPARAÇÃO QUÍMICA E BIOLÓGICA DE EXTRATOS OBTIDOS DE *Ocotea minarum* NOS ANOS  
DE 2017 E 2018

Dissertação apresentada à Universidade Federal da Grande Dourados  
para obtenção do título de Mestre em Biologia Geral/Bioprospecção.

Área de concentração: Biologia Geral/Bioprospecção

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Anelise Samara Nazari Formagio

Dourados

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

P371c Pederiva, Milena Menezes Correa  
Comparação química e biológica de extratos obtidos de *Ocotea minarum* nos anos de 2017 e 2018 [recurso eletrônico] / Milena Menezes Correa Pederiva. -- 2019.  
Arquivo em formato pdf.

Orientador: Anelise Samara Nazari Formagio.  
Dissertação (Mestrado em Biologia Geral/Bioprospecção)-Universidade Federal da Grande Dourados, 2019.

Disponível no Repositório Institucional da UFGD em:  
<https://portal.ufgd.edu.br/setor/biblioteca/repositorio>

1. Canela-vassoura. 2. Lauraceae. 3. Inflamação. 4. Lipoperoxidação. 5. Flavonoides. I. Formagio, Anelise Samara Nazari. II. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).


©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.


"COMPARAÇÃO QUÍMICA E BIOLÓGICA DE EXTRATOS OBTIDOS DE *Ocotea  
minarum* NOS ANOS DE 2017 E 2018"


POR

**MILENA MENEZES CORRÊA PEDERIVA**

DISSERTAÇÃO APRESENTADA À UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE  
DOURADOS (UFGD), COMO PARTE DOS REQUISITOS EXIGIDOS PARA  
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM BIOLOGIA GERAL - ÁREA DE  
CONCENTRAÇÃO: "BIOPROSPECÇÃO".

  
PROF.<sup>a</sup> DR.<sup>a</sup> ANELISE SAMARA NAZARI FORMAGIO  
ORIENTADORA – UFGD

  
PROF. DR. JONAS DA SILVA MOTA  
MEMBRO TITULAR – UEMS

  
PROF.<sup>a</sup> DR.<sup>a</sup> SUZANA MEIRA RIBEIRO  
MEMBRO TITULAR – UFGD

Aprovada em 08 de março de 2019.

## AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos ao nosso Senhor Jesus Cristo e Nossa Senhora Aparecida a quem consagrei toda minha caminhada, por ser meu refúgio e minha fortaleza, por me guiar e iluminar frente aos obstáculos e derramar tantas bênçãos em minha vida. Os sonhos dele, são maiores que os meus.

Agradeço imensamente aos meus pais Antônio Carlos e Ione por acreditarem em mim desde o início da minha vida acadêmica, por me ensinarem a ter humildade e generosidade acima de tudo e nunca desistir dos meus sonhos. Ao meu irmão Vinicius, por me fazer sorrir nos momentos difíceis, e perceber o quão eu sou especial. Que você cresça nos caminhos de Deus.

Ao meu esposo Thiago Pederiva por toda compreensão, carinho e amor, sem o seu apoio e companheirismo eu jamais chegaria até aqui. Obrigada por tudo que fez por mim e ainda faz. Obrigada por fazer parte da minha vida. Você é muito especial para mim. Agradeço a Deus todos os dias, por sua presença em minha vida.

Aos meus professores da graduação que sempre me apoiaram, me ensinaram a ser forte, nos momentos onde pensamos em desistir, levantar após uma queda. Obrigada pelas palavras que tive o privilégio de ouvir no último dia de aula. Levarei vocês sempre em meu coração. Deus me fez escolher a profissão certa.

À minha orientadora Anelise por confiar em mim desde o início quando a procurei, pela paciência, apoio e por seus proveitosos ensinamentos. Obrigada por toda contribuição pessoal e profissional.

Aos familiares Menezes e Pederiva. Aos meus Avôs Letícia, Florêncio, Nadir e Heraclides, sem vocês ao meu lado eu nada seria, obrigada pelo abraço carinhoso de vocês.

Aos colegas de laboratório Carla, Kamila, Pedro, Rafael e Sidney meus sinceros agradecimentos, pela acolhida, risos e auxílio nos testes biológicos e químicos. Aos demais externos que me auxiliariam de alguma forma, que não fazem parte do nosso grupo de pesquisa. Obrigada.

Meu agradecimento a todos que direta e indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste estudo.

## RESUMO

PEDERIVA, M. M. C. **Comparação química e biológica de extratos obtidos de *Ocotea minarum* nos anos de 2017 e 2018.** 2019. 57.f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, 2019.

O objetivo deste estudo foi investigar e comparar o potencial antioxidante, anti-inflamatório e antinociceptivo de *Ocotea minarum* nos anos de 2017 e 2018, bem como o isolamento dos principais compostos. O extrato metanólico de 2017 (MEOM-2017) e 2018 (MEOM-2018) foram obtidos a partir das folhas de *O. minarum*, coletadas, identificadas e maceradas a frio com metanol. O teor de constituintes foi mensurado para fenóis totais e flavonoides. A atividade antioxidante dos extratos foi avaliada pelos ensaios de DPPH e  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico *in vitro*, utilizando-se o butilhidroxitolueno (BHT) como controle positivo. O MEOM-2017 e MEOM-2018 foram avaliados nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg, e os compostos quercetina-7-O- $\beta$ -D-glucopyranosídeo (OM-1) e genisteína (OM-2) nas doses de 100 mg/kg, para os modelos de edema de pata, pleurisia e antinocicepção, induzido por carragenina em camundongos. O anti-inflamatório dexametasona foi utilizado como controle positivo. Os flavonoides OM-1 e OM-2, foram identificados a partir da fração de acetato de etila do extrato obtido em 2018. O MEOM-2018 apresentou maior concentração de fenóis totais e flavonoides quando comparado a MEOM-2017, demonstrando deste modo maior potencial antioxidante nos ensaios testados. Nos modelos de inflamação, ambos extratos e compostos apresentaram atividade antiedematogênica, inibição da migração leucocitária e antinociceptiva, com destaque para MEOM-2018 e OM-2. Os modelos de inflamação aguda permitem investigar os componentes vasculares e celulares da resposta inflamatória. O destaque para MEOM-2018 pode ser explicado pela concentração de metabolitos secundários, em decorrência a fatores ambientais, como o aumento de temperatura e diminuição de umidade relativa. O estudo relata pela primeira vez a ação anti-inflamatória e antinociceptiva em modelo animal das folhas de *O. minarum*, com a presença de flavonoides, sustentando em parte o uso popular como anti-inflamatório, contribuindo com estudos do gênero.

**Palavras-chave:** Canela-vassoura, Lauraceae, inflamação, lipoperoxidação, sequestro de radicais, flavonoides.

## ABSTRACT

PEDERIVA, M. M. C. **Chemical and biological comparison of extracts obtained from *Ocotea minarum* in the years 2017 and 2018.** 2019. 57f. Master (MSc) – Faculty of Biological and Environmental Sciences, Federal University of Grande Dourados, Dourados, 2019.

The objective of this study was to investigate and compare the antioxidant, anti-inflammatory and antinociceptive potential of *Ocotea minarum* in the years 2017 and 2018, as well as the isolation of the main compounds. The methanolic extract of 2017 (MEOM-2017) and 2018 (MEOM-2018) were obtained from *O. minarum* leaves, collected, identified and cold-macerated with methanol. The content of constituents was measured for total phenols and flavonoids. The antioxidant activity of the extracts was evaluated by the DPPH and  $\beta$ -carotene/linoleic acid assays *in vitro*, using butylhydroxytoluene (BHT) as a positive control. The MEOM-2017 and MEOM-2018 were evaluated at doses of 30, 100 and 300 mg/kg, and the compounds quercetin-7-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (OM-1) and genistein (OM-2) of 100 mg/kg, for carrageenan-induced paw edema, pleurisy and antinociception models in mice. The anti-inflammatory dexamethasone was used as a positive control. The flavonoids OM-1 and OM-2, were identified from the ethyl acetate fraction of the extract obtained in 2018. The MEOM-2018 showed a higher concentration of total phenols and flavonoids when compared to MEOM-2017, thus demonstrating a higher antioxidant potential in the tested trials. In the inflammation models, both extracts and compounds showed anti-nematode activity, inhibition of leukocyte and antinociceptive migration, especially MEOM-2018 and OM-2. Acute inflammation models allow investigation of the vascular and cellular components of the inflammatory response. The highlight for MEOM-2018 can be explained by the concentration of secondary metabolites, due to environmental factors, such as temperature increase and relative humidity decrease. The study reports for the first time the anti-inflammatory and antinociceptive action in the animal model of the leaves of *O. minarum*, with the presence of flavonoids, partially supporting the popular use as anti-inflammatory, contributing with studies of the genus.

**Keywords:** Canela-vassoura, Lauraceae, inflammation, lipoperoxidation, radical sequestration, flavonoids.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Folhas e galhos de *Ocotea minarum* ..... 8
- Figura 2.** Representação esquemática das atividades realizadas no estudo ..... 13



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b>	Compostos isolados e atividades biológicas do gênero <i>Ocotea</i> no período de 1964-2018 .....	3
<b>Tabela 2.</b>	Compostos isolados e atividades biológicas de <i>O. minarum</i> .....	9

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

AIEs	Anti-inflamatórios esteroidais
AINEs	Anti-inflamatórios não esteroidais
ABTS	Ácido 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolino-6 sulfônico)
BHT	Butilhidroxitolueno
CIM	Concentração inibitória mínima
COXs	Ciclooxygenases
COX-1	Ciclooxygenase-1
COX-2	Ciclooxygenase-2
Cg	Carragenina
DEX	Dexametasona
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
EPR	Ressonância paramagnética eletrônica
FRAP	Poder redutor de íons férricos
IL-2	Interleucina 2
IL-6	Interleucina 6
LOX	Lipooxygenase
MEOM-2017	Extrato metanólico de <i>Ocotea minarum</i> - 2017
MEOM-2018	Extrato metanólico de <i>Ocotea minarum</i> - 2018
NO	Óxido nítrico
NK	Natural killer
ORAC	Capacidade de eliminação de radicais peroxil
PBS	Salina tamponada com fosfato

TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
UFGD	Universidade Federal da Grande Dourados

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	2
2.1	Gênero <i>Ocotea</i> .....	2
2.2	<i>Ocotea minarum</i> (Nees & Mart.) Mez .....	8
2.3	Inflamação .....	9
2.4	Mediadores envolvidos no processo inflamatório .....	10
2.5	Mecanismos de ação das drogas anti-inflamatórias .....	11
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	13
3.1	Objetivo geral .....	13
3.2	Objetivos específicos .....	13
<b>4</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	14
<b>5</b>	<b>MANUSCRITO</b> Chemical and biological comparison of extracts obtained from <i>Ocotea minarum</i> in the years 2017 and 2018.....	22
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO GERAL</b> .....	47

## 1. INTRODUÇÃO

O nosso grupo de pesquisa desenvolve estudos sobre o potencial químico e biológico de plantas presentes em regiões de Cerrado e Mata Atlântica do estado de Mato Grosso do Sul. Das diversas famílias presentes na região, destaca-se a Lauraceae por sua ampla distribuição e pelo número de gêneros, dentre eles *Ocotea*, que na medicina popular são utilizadas para o tratamento de infecções, inflamações, abscessos, entre outras. Espécies desse gênero relatam atividades como anti-inflamatória, antitumoral, antiparasitária e antioxidante (Garcez et al., 2011; Ogundajo et al., 2018; Yamaguchi et al., 2012), com destaque para compostos pertencentes a classe dos alcaloides e flavonoides (Conceição et al., 2017; Lopez et al., 1996; Vechietti et al., 1981). Dentre as espécies relatadas em Dourados – MS, *Ocotea minarum*, conhecida como canela-vassoura, demonstra a presença de alcaloides nas folhas (Vechietti et al., 1979), não sendo relatada atividades biológicas. Neste contexto, observa-se a necessidade de estudos químicos e biológicos que comprovem o uso popular do gênero como anti-inflamatório a qual a espécie está inserida, e a presença dos principais constituintes responsáveis pela atividade, visando o estudo químico e biológico para dois anos consecutivos, em decorrência da relevância de se estabelecer e comprovar que há diferença na concentração de metabólitos secundários devido a influências ambientais a qual a espécie é exposta.

As plantas possuem um complexo sistema de defesa para ultrapassar tensões abióticas e bióticas, são capazes de sintetizar uma grande variedade de metabólitos secundários que constituem mecanismos de sobrevivência e proteção da espécie em meio a situações ameaçadoras, desenvolvendo ações importantes na adaptação da planta ao meio ambiente, além de serem fontes significativas de drogas (Rao e Ravishankar, 2002; Zaynab et al., 2018). A presença/teor de metabólitos secundários presentes no vegetal, podem ser influenciados por fatores bióticos como processos fisiológicos, bioquímicos e evolutivos da espécie e fatores abióticos, como época de coleta, radiação ultravioleta, disponibilidade hídrica, poluição atmosférica, dentre outros (Gobbo-Neto e Lopes, 2006; Gouvea et al., 2012). Estes metabólitos são os responsáveis pelas atividades biológicas, e a busca de um controle de qualidade em relação aos compostos, são de extrema relevância, visto que, suas concentrações podem diminuir diante de determinadas exposições da espécie, diminuindo assim a ação terapêutica.

Devido a utilização de inúmeras espécies pertencentes a *Ocotea* para o tratamento de inflamações, os efeitos colaterais e custos que os anti-inflamatórios não-esteroidais e esteroidais disponíveis no mercado possuem, enfatiza-se a pesquisa por novas drogas oriundas

de fontes naturais, como as plantas presentes em regiões de cerrado brasileiro, demonstrando a imensa biodiversidade que nosso país possui. Além disso, o Sistema Único de Saúde (SUS) detêm de uma lista de espécies de plantas medicinais a serem comprovadas cientificamente quanto a seus potenciais biológicos, afim de realçar os estudos nessa área e ampliar a utilização de medicamentos fitoterápicos disponibilizados a população.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Gênero *Ocotea***

O gênero *Ocotea* foi descrito por Aublet (1775) a partir de material vegetal coletado na Guiana Francesa. É representado por árvores e arbustos de grande variedade morfológica, possuindo aproximadamente 350 espécies, sendo no Brasil estimado que haja entre 120 a 160 espécies, destacando 12 reportadas no estado de Mato Grosso do Sul (Baitello, 2001; Brotto et al., 2013). As espécies de *Ocotea* têm ampla utilização na medicina popular para o tratamento de infecções, inflamações, abscessos, picadas de cobras, dores menstruais, dores nos nervos (neuralgia) e dores de cabeça (De Camargo et al., 2013; Rodrigues et al., 2014; Moraes et al., 2017). Até o presente momento foram descritos compostos pertencentes a diferentes classes de metabólitos secundários, tais como flavonoides, alcaloides e terpenos, bem como potenciais biológicos de espécies pertencentes a *Ocotea* (**Tabela 1**).

**Tabela 1.** Compostos isolados e atividades biológicas do gênero *Ocotea* no período de 1964-2018

Espécie/Parte utilizada	Compostos isolados	Atividade biológica	Referências
<i>O. acutifolia</i> (folhas e cascas)	<b>Alcaloides:</b> talilminina, dicentrina, ocoteína, ocoteína N-óxido, leucoxina e norocoxilonina, (+) -talicosimidina e (+) – neolitsina, morfina. <b>Flavonoide:</b> 3- <i>O</i> - $\alpha$ -L-ramnopiranosilkaempferol	Atividade antimutagênica e recombinogenicidade (SMART) dos alcaloides. Citotoxicidade <i>in vitro</i> (cultura de células) dos compostos isolados. Atividade genotóxica (SMART).	Guterres et al., 2012 Guterres et al., 2013 Garcez et al., 2011
<i>O. acyphilla</i> (folhas e cascas)	<b>Terpenóides:</b> cadaleno e esqualeno <b>Fenilpropanóide:</b> dillapiole <b>Flavonoide:</b> vitexin-2''- <i>O</i> -rhamnosideo <b>Neolignana:</b> ferrearina-B, ferrearin-C, canelina A, S-metoxi-guianina.	Atividade acaricida <i>in vitro</i> (testes de imersão).	Baralle et al., 1972 Romoff et al., 1984 Conceição et al., 2017
<i>O. acutangula</i> (folhas)	<b>Alcaloides:</b> (S) - (-) – pallidine, (S) - (-) - <i>O</i> -methylpallidine, 14-di-hidromorfinanienona, (S) - (-) pallidine e (S) - (-) - <i>O</i> -metilpallidine.		Vecchietti et al., 1981
<i>O. atirrensis</i> (cascas)	<b>Alcaloides:</b> (+/-) – norarmepavina e benzilisoquinolina.		Lopez et al., 1995
<i>O. bullata</i> (folhas e cascas)	<b>Neolignanas:</b> ocobullenone e <i>iso</i> -ocobullenone.	Atividade anti-inflamatória (inibição da COX e LOX). Impressão digital de DNA. Antioxidante (ABTS, quelante de metais, eliminação de ânion superperóxido, eliminação de radicais hidroxila, DPPH, FRAP); Antidiabética ( $\alpha$ -amilase, $\alpha$ -glucosidase). Citotoxicidade (cultivo de células).	Sehlapelo et al., 1993 Drewes et al., 1995 Zschocke et al., 2000 Madubanya et al., 2006 Ogundajo et al., 2018
<i>O. brenesii</i> (folhas)	<b>Alcaloides:</b> (+) - isocorina, (-) - 3-hidroxinuciferina e 3-hidroxi-6a, 7-desidronuciferina (-).		Lopez et al., 1996
<i>O. brachybotra</i> (folhas)	<b>Alcaloides:</b> (+/-) - glaziovina, dicentrina, ocopodina, cassyntheticine, predicentrina, leucoxina, sinacutina e palidina, sinacutina, pilidina, ocobotrina e 14-		Vecchietti et al., 1976 Vecchietti et al., 1977

	espisinomenina.	
<i>O. ceanothifolia</i> (galhos e folhas)		Atividade antioxidante (DPPH); anticolinesterásica (cromatoplaça em camada delgada)
		Yamaguchi et al., 2012
<i>O. cymosa</i> (hastes e cascas)	<b>Neolignanas:</b> 2'-oxo-8.1'-lignans cymosalignans A, B e C; 8.O.6'- neolignan; ococmosina; dormoctilenona C; 3,4,5,3',5'-pentamethoxy-1'-allyl- 8.O.4'- neolignan; 3,4,5,3'-tetramethoxy- 1'-allyl-8.O.4'-neolignan; didymochlaenone B; virologin B; ocobullenone; unusual 2'-oxo-8.1' – lignan; 8.O.6'-neolignan; dihydrobenzofuranoid.	Atividade antimalárica ( <i>Plasmodium falciparum</i> ), inseticida ( <i>Aedes aegypti</i> ) e antiproliferativa (células de câncer de ovário) dos compostos isolados.
		Rakotondraibe et al., 2015
<i>O. cymbarum</i> (cascas)	<b>Fenilpropanóide:</b> apiol. <b>Éter fenílico:</b> dilapiol 4-hydroxy-2,3,5- trimethoxy allylbenzene, apioliglicol e lyoniresinol.	
		Andrei et al., 1988
<i>O. caesia</i> (cascas)	<b>Alcaloides:</b> (-) - zenkerina, (+) - laureliptina, (-) – pulchina, (+) – isoboldina e (+) - 1-hidroxi 2, 9- dimetoximoraporfina.	
		Vilegas et al., 1989
<i>O. corymbosa</i> (frutos não maduros)	<b>Monoterpenos:</b> carvacrol e cis-3- hidroxi-p-mentol-1-en-6-ona. <b>Sesquiterpenos:</b> 10-desmetil-1-metil- eudesmane.	
		Chavez et al., 1995
<i>O. catharinensis</i> (cascas)	<b>Neolignanas:</b> canelina-C e 5'- metoxicanelina-C, -5-alil-5,7- dimetoxi- 3-metil-2-piperonil-2,3,5,6-tetra-hidro-6- oxobenzofurano e -3a-alil-5,7-dimetoxi- 3-metil-2-piperonil-2,3,3a, 6-tetra-hidro- 6-oxobenzofurano, tetraidrofurânica veraguensina.	
		Haraguchi et al., 1983



	<p><b>Epímeros:</b> 1-alil-4,8-di-hidroxi-3,5-dimetoxi-7-metil-6- piperonil-biciclo (3.2.1) oct-2-enes e rel- L-alil-3,8-di-hidroxi-5-metoxi-7-metil-6-piperonil-4-oxobiciclo (3.2.1) oct-2-eno.</p> <p><b>Flavonoide:</b> afzelin.</p>		
<i>O. caudata</i> (folhas)	<p><b>Fitoesterol:</b> <math>\beta</math>-sitosterol.</p> <p><b>Fenóis:</b> etil 2- (4-hidroxifenil) acetato e ácido 2- (4-hidroxifenil) acético.</p> <p><b>Sesquiterpenos:</b> ácido cóxico e éster metílico de ácido cóxico.</p> <p><b>Flavonoides:</b> quercetina, 7,4 '-dimetoxi-3' hidroxiflavona e afzelin.</p> <p><b>Alcaloides:</b> thalictuberine e 3-O-desmetil-litalictuberina, (+) – reticulina, (+) – pallidina, (-) - trans-4-hidroxi-N-metilprolina, (+) - 3-hidroxinornuciferina, (+) -3 methoxynordomesticina, (+) – nordomedinina, (+) – isoboldina e (+) – boldina.</p> <p><b>Flavonoides:</b> astragalin e isoquercitrina.</p>		Archila e Suárez, 2018
<i>O. duckei</i> (cascas, cálice e folhas)	<p><b>Alcaloides:</b> reticulina, coclaurina e N acetilnorjuzifina, laureliptina.</p> <p><b>Lignanas:</b> yangambin, epiyangambin e episesartemin, 4'-O-demethylepiyangambin, sesartemin, episesartemin, 4''-O-demethylepimagnolin A, syringaresinol.</p>	<p>Reticulina testada nos ensaios de toxicidade aguda, teste de catalepsia, efeitos na hipermotilidade induzida por anfetaminas, open field, efeito no tempo de sono induzido pelo pentobarbital e teste rotarod.</p> <p>Potencial mutagênico (teste de ames).</p>	<p>Morais et al., 1998</p> <p>Morais et al., 1999</p> <p>Barbosa-Filho et al., 1999</p> <p>Da Silva et al., 2002</p> <p>Dias et al., 2003</p> <p>Marques et al., 2003</p>
<i>O. discolor</i> (cascas)	<p><b>Alcaloides:</b> ocoxilonina, ocoteina, dicentrina e 1,2- metilendioxi-3,10,11-trimetoxiaporfina.</p>		Albarracín et al., 2017
<i>O. eucoxylon</i> (galhos e folhas)		<p>Atividade antioxidante (DPPH); anticolinesterásica (cromatoplaça em camada delgada).</p>	Yamaguchi et al., 2012

<i>O. foetens</i> (folhas)		Atividade antioxidante (ORAC e EPR).	Tavares et al., 2010
<i>O. goinezii</i> (cascas)	<b>Alcaloides de aporfina:</b> desidroglaucina e (+) - pré-cocina.		Lopez et al., 1995
<i>O. glaziovii</i> (folhas)	<b>Alcaloide:</b> 3,5-dihidroxi-6 metoxaporfina, glaziovina.		Gilbert et al., 1964
<i>O. holdridgeiana</i> (folhas)	<b>Alcaloides:</b> isocitorina, O, O-dimetilcoriatuberina, 3-metoxinuciferina e 3 -hidroxinuciferina. <b>Flavonoides:</b> quercetina e catequina.		Castro e Ruiz, 1994
<i>O. heterochroma</i> (frutos)	<b>Neolignana:</b> -2-Hidroxi-5,1', 3'-trimetoxi-3,4-metilenodioxi-7,3', 8,1' -neolignana; 2-Acetoxi-5,1', 3'-trimetoxi-3,4-metilenodioxi-7,3', 8,1' neolignana.		Cuca et al., 2009.
<i>O. lancifolia</i> (cascas de caule e folhas)	<b>Sesquiterpenos:</b> substâncias como ácido ( <i>rel</i> ) -4 $\beta$ , 5 $\beta$ , 7 $\beta$ -eremofil-9-en-12-oico, ácido ( <i>rel</i> ) -4 $\beta$ , 5 $\beta$ , 7 $\beta$ -eremofil-1 (10) -en-12-oico, ácido ( <i>rel</i> ) -4 $\beta$ , 5 $\beta$ , 7 $\beta$ -eremofil-1 (10) -en-2-oxo-12-oico, ( <i>rel</i> ) -4 $\beta$ , 5 $\beta$ , 7 $\beta$ -eremofil-9-en-12,8 $\alpha$ -olido, ( <i>rel</i> ) -4 $\beta$ , 5 $\beta$ , 7 $\beta$ -eremofil-9-en-12,8 $\beta$ -olido e ácido ( <i>rel</i> ) -4 $\beta$ , 5 $\beta$ , 7 $\beta$ -eremofilan-9 $\alpha$ , 10 $\alpha$ -epóxi-12-oico, 4 $\beta$ , 5 $\beta$ , 7 $\beta$ -eremofil-11-en-10 $\alpha$ -ol e espatulenol. <b>Flavonoides:</b> quercetina-3-O-ramnosídeo e quercetina-3-O-glicosídeo.	Atividade antioxidante (DPPH e ABTS). Atividade antiprotozoal ( <i>Trypanosoma cruzi</i> e <i>Leishmania</i> ).	Fournet et al., 2007 De Camargo et al., 2013 Da Silva et al., 2017
<i>O. macrophylla</i> (folhas e cascas)	<b>Alcaloides:</b> (S) -3-metoxinordomesticina, (S) -N-etoxicarbonil-3-metoxi-nordomesticina, (S) -N-formil-3-metoxi-nordomesticina e (S) -N-metoxicarbonil-3-metoxi-nordomesticina, desidronantenina.	Atividade anti-inflamatória <i>in vitro</i> (inibição COX e LOX) e agregação plaquetária.	Franca et al., 1975 Barrera et al., 2009 Pabon e Cuca, 2010 Barrera e Suárez, 2009
<i>O. macropoda</i>	<b>Alcaloides:</b> dicentrina desidrodicentrina, ocopodina, desidroocopodina, ococriptina, oconovina.		Cava et al., 1968

<i>O. macrocarpa</i> (raízes)	Butanolide, secobutanolides, linderanolide B, isolinderanolide.	Atividade antiproliferativa (câncer de ovário) dos compostos isolados.	Liu et al., 2015
<i>O. meiziana</i> (cascas)	<b>Alcaloides:</b> (+) – nandigerina.		Lopez et al., 1995
<i>O. minor</i> (galhos e folhas)		Atividade antioxidante (DPPH); anticolinesterásica (cromatoplaça em camada delgada).	Yamaguchi et al., 2012
<i>O. nigrescens</i> (galhos e folhas)		Atividade antioxidante (DPPH); anticolinesterásica (cromatoplaça em camada delgada).	Yamaguchi et al., 2012
<i>O. nonata</i> (folhas)	<b>Flavonoides:</b> isoquercitrina, afzelin.	Atividade anti-inflamatória (inibição NO) dos compostos isolados.	Costa et al., 2015
<i>O. odorifera</i> (folhas, caule e cascas)	<b>Compostos fenólicos:</b> apigenina 7-O-rutinoside, catequina monomérica, apigenina 6-C-pentoside-8-C-hexido, apigenina 6-C-hexoside-8-C-pentoside, apigenina 6,8-di-C-glucosídeo.	Atividade antioxidante (DPPH, $\beta$ -caroteno e peroxidação lipídica). Antibacteriana (placas de orifício e CIM). Antimutagênica (teste de ames) e antígenotóxica. Atividade antimicrobiana (técnica de difusão em ágar e microdiluição em caldo).	Cansian et al., 2010 Gontijo et al., 2017 Rogatto et al., 2014
<i>O. porosa</i> (cascas)	<b>Neolignanais:</b> porosina, porosina-B e licarina-B.		Dias et al., 1986
<i>O. puberula</i> (folhas, caule, raízes e frutos)	<b>Alcaloides:</b> boldina, leucoxina, dicentrina, isodomesticina e thalicminina.	Atividade antinociceptiva (induzida por formalina e ácido acético).	Zanin et al., 2011 Montrucchio et al., 2012
<i>O. splendens</i> (galhos e folhas)		Atividade antioxidante (DPPH); anticolinesterásica (cromatoplaça em camada delgada).	Yamaguchi et al., 2012
<i>O. vellosiana</i> (frutos não maduros)	<b>Flavonoides:</b> talgliosídeo, p-hidroxibenzoil-rutinosídeo e asparagline.		Garcez et al., 1995
<i>O. variabilis</i>	<b>Alcaloides:</b> (+) - glaxiovina, (+) - apoglaziovina, e (+) – nantenina.		Cava et al., 1972

## 2.2 *Ocotea minarum* (Nees & Mart.) Mez

*Ocotea minarum*, Lauraceae, subfamília Lauroideae, tribo Perseeae e subtribo Laurinae, é conhecida popularmente como canelinha e/ou canela-vassoura (**Figura 2**), abundante no território brasileiro e nativa do bioma cerrado, com ocorrência nos estados de Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, São Paulo, Paraná e Goiás (Moraes, 2005). Há relatos da utilização popular de suas cascas para o tratamento de candidíase (Rodrigues et al., 2014).

Estudos químicos para todas as partes da planta como folhas, frutos e cascas reportaram o isolamento de alcaloides, cumarinas, flavonoides, terpenos, esteroides e lignanas, e atividade biológica foi relatada apenas para as cascas (**Tabela 2**).



**Figura 1.** Folhas e galhos *O. minarum* (Fonte: Neotropical plants)

**Tabela 2.** Compostos isolados e atividade biológica de *O. minarum*

Parte utilizada	Compostos isolados	Atividade biológica	Referência
Folhas	<b>Alcaloides:</b> leucoxilonina, dicentrina, ocotina, leucoxina, ocopodina, predicentina, dicentrinona, talina, ocominarina, n- leucoxilonina, iso-oconovina, 4-hidroxicentrina, ocominarona.		Vecchiatti et al., 1979
Frutos	<b>Alcaloide:</b> triptofol-5-O- $\beta$ -D-glucopiranosídeo. <b>Cumarina:</b> escopoletina. <b>Flavonoides:</b> taxifolina, quercetina-7-O- $\beta$ -D-glucopiranosídeo, eriodictilo-3'-O- $\beta$ -D-glicopiranosídeo, naringenina- 7-O-p-D-glucopiranosídeo.		Garcez et al., 2005
Cerne	<b>Lignana:</b> lioniresinol. <b>Alquilfenóis:</b> 5- propilresorcinol e 3- (1,4-di-hidroxipentil) -5-metoxifenol. <b>Esteróides:</b> 3-O- $\beta$ -D-glucopiranosil estigmasterol e estigmasta-4,22-dien-3-ona.		Garcez et al., 2005
Cascas de caule	<b>Sesquiterpenos:</b> ácido lanceólico, $\beta$ -sitosterol.		Garcez et al., 2005
Cascas		Antifúngica <i>in vitro</i> ( <i>Candida</i> )	Rodrigues et al., 2014

### 2.3 Inflamação

A inflamação é decorrente da exposição à microrganismos patogênicos, lesão/trauma e agentes químicos e/ou irritantes. A função do processo inflamatório se resume em destruir ou isolar de forma rápida e eficaz a origem do dano, removendo o tecido lesionado e restaurando a homeostase do mesmo (Ashley et al., 2012). A resposta inflamatória se caracteriza como um processo biológico complexo que envolve a participação de vários tipos celulares, substâncias solúveis e elementos vasculares, sendo a primeira resposta do organismo frente a dano tecidual. No decorrer da inflamação diversos conjuntos bioquímicos são ativados como a cascata da coagulação e o sistema complemento, com função de auxiliar no desfecho do processo. Na inflamação aguda, os leucócitos migram para o tecido lesionado e há predominância de componentes da resposta imune inata (macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e Natural Killer - NK), com predomínio de neutrófilos e macrófagos (Cruvinel et al., 2010).

Os sinais cardinais da inflamação: dor, calor (elevação da temperatura local), rubor (aumento da quantidade de sangue circulante), edema (tumor) e perda da função, se originam devido a ativação de diferentes tipos celulares e a produção de elevadas quantidades de citocinas e mediadores pró-inflamatórios, que aumentam a permeabilidade vascular, extravasando fluido para o local lesionado (Tracy, 2006).

#### **2.4 Mediadores envolvidos no processo inflamatório**

Após uma lesão ou trauma, a resposta imune inata é imediatamente ativada, ocorrendo vasoconstrição instantânea seguida da dilatação dos vasos sanguíneos. A resposta inflamatória imediata envolve a participação de aminas vasoativas, que agem basicamente sob a vasculatura, tendo ação sob os neurônios sensoriais responsáveis pela sensação de dor (Dray, 1995; Rankin, 2004). Os mediadores inflamatórios liberados, ao serem ativados são capazes de sensibilizar fibras nociceptivas periféricas através da interação com os canais iônicos, propiciando uma exacerbada sensibilização à dor, denominado hiperalgesia. Dentre esses mediadores estão as prostaglandinas, leucotrienos, bradicinina, citocinas, histamina e serotonina (Vanegas, 2004; Coutaux et al., 2005; De Toni et al., 2015).

O sinergismo entre as prostaglandinas, leucotrienos, bradicinina, serotonina e histamina provocam ação edematogênica. A formação do edema é decorrente do aumento da permeabilidade vascular de vênulas e capilares, que ocasionam fluxo transvascular de plasma (fluido rico em proteínas) dos compartimentos intravasculares para o interstício. (Sherwood e Toliver-Kinsky, 2004; De Toni et al., 2015).

As prostaglandinas causam vasodilatação e são sintetizadas por vários tipos celulares, possuem diversos efeitos biológicos, dependente de sua característica. Esses mediadores também recrutam leucócitos para o local inflamado e influenciam a angiogênese. Os leucotrienos são liberados pelos mastócitos e basófilos, possuindo ação semelhante a histamina, assim como as prostaglandinas, também são encontrados no exsudato inflamatório. No endotélio vascular, ocasionam o processo de agregação e adesão leucocitária, além de serem potentes mediadores quimiotáticos (Lee et al., 2003; Rankin, 2004).

A histamina é armazenada em sua grande maioria nos grânulos dos mastócitos, possuindo ação vasodilatadora potente, imediata e de curta duração, agindo como essencial mediador no aumento da permeabilidade vascular. A serotonina é encontrada nos grânulos plaquetários, sendo liberada no momento da agregação plaquetária, como

forma de regulação funcional das plaquetas. É responsável pela vasodilatação e atua como neurotransmissor no sistema nervoso central com funções de percepção de dor, ciclos de sono e regulação da pressão arterial, envolvendo-se na fisiopatologia de diversas doenças como enxaqueca, depressão e ansiedade (Jonnakuty e Gragnoli, 2008).

As citocinas, liberadas pelos macrófagos e neutrófilos (células da fase inicial) agem nas células endoteliais presentes nos vasos sanguíneos locais, ocasionando vasodilatação, gerando aumento do fluxo sanguíneo local, levando aos sinais cardinais de calor e vermelhidão, também são capazes de recrutar leucócitos circulantes, como monócitos e linfócitos. A migração celular para o local inflamado, bem como a exsudação plasmática, é responsável pelos sinais de inchaço e dor. O processo inflamatório é interrompido quando o tecido lesionado está sob controle, neste momento, os macrófagos fagocitam os detritos celulares se liberam citocinas para reparação tecidual, enquanto as citocinas anti-inflamatórias substituem de forma gradativa os mediadores inflamatórios, afim de inibir sua secreção e ação (Noack e Kolopp- Sarda, 2018).

## **2.5 Mecanismos de ação das drogas anti-inflamatórias**

A busca de substâncias químicas de combate a inflamação e alívio da dor, são solicitadas desde a antiguidade. Os AINEs (Anti-inflamatórios não esteroidais) tiveram seu mecanismo de ação relatados em 1971, sendo medicamentos largamente prescritos e liberados para venda sem necessidade de receita médica, onde atuam na inibição da oxidação do ácido araquidônico, a partir da inibição das ciclooxigenases (COXs), enzimas envolvidas diretamente na síntese de prostaglandinas. A COX-1 é uma enzima constitutiva presente em vários tipos celulares, desempenhando funções fisiológicas, afim de manter a homeostasia, em parte a COX-2 é expressa na maioria das células e induzida a partir da exposição a estímulos inflamatórios. Nas última décadas, o interesse tem sido desenvolver AINEs de maior seletividade para COX-2 comparado com a COX-1 (Sandilands e Bateman, 2016; Knych, 2017).

Os AINEs são distribuídos conforme seu grupamento químico, podendo ser classificados em inibidores não-seletivos da COX, aqueles que inibem ambas as enzimas de maneira reversível e não-seletiva, ex. paracetamol, meloxicam, indometacina e ibuprofeno, e inibidores seletivos da COX-2, que se ligam seletivamente a esta enzima ocasionando sua inibição, ex. nimesulida, etorocoxib e rofecoxib. A variedade química destes medicamentos ocasionam variações em suas características

farmacocinéticas, enquanto que seus efeitos adversos são consequentes da inibição da COX-1, dentre os primeiros efeitos colaterais estão o comprometimento renal, gastrite e disfunção plaquetária (Da Silva et al., 2014).

Os Anti-inflamatórios esteroidais (AIEs) ou corticoesteroides possuem ação de analgesia e anti-inflamatória com redução de edema, além da prevenção de hiperalgesia através da inibição da fosfolipase A2 e da COX, atuam praticamente em todos os tecidos e órgãos, e por esse motivo compreendem inúmeros efeitos adversos. De maneira geral, agem na redução da síntese de prostaglandinas e citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-2 e TNF- $\alpha$ ), compreendendo efeitos imunossupressores e anti-inflamatórios, sendo capazes de inibir manifestações iniciais e tardias do processo inflamatório. Dentre os fármacos da classe estão: hidrocortisona e cortisona (curta duração), prednisolona e predsona (média duração) e medicamentos de ação prolongada como a dexametasona e betametasona (Anti et al., 2008; Bavaresco et al., 2005; Silva e Pereira, 2016).

Portanto, estes medicamentos detêm de efeitos adversos em decorrência de sua toxicidade sob diversos sistemas, dentre estes destaca-se os gastrointestinais, que podem ir desde desconfortos abdominais até erosões nas mucosas, levando a sangramento e perfuração, podendo levar ao óbito. Além disso, induzem ou agravam a hipertensão arterial, provocam insuficiência renal, síndrome nefrótica e outras formas de doença renal. Os efeitos hematológicos conhecidos incluem: agranulocitose, neutropenia, anemia hemolítica ou aplástica (Luz et al., 2006). Todos os efeitos sistêmicos citados, enfatizam a busca de novas drogas para o tratamento de processos inflamatórios que detenham de mínimos ou ausentes efeitos colaterais.

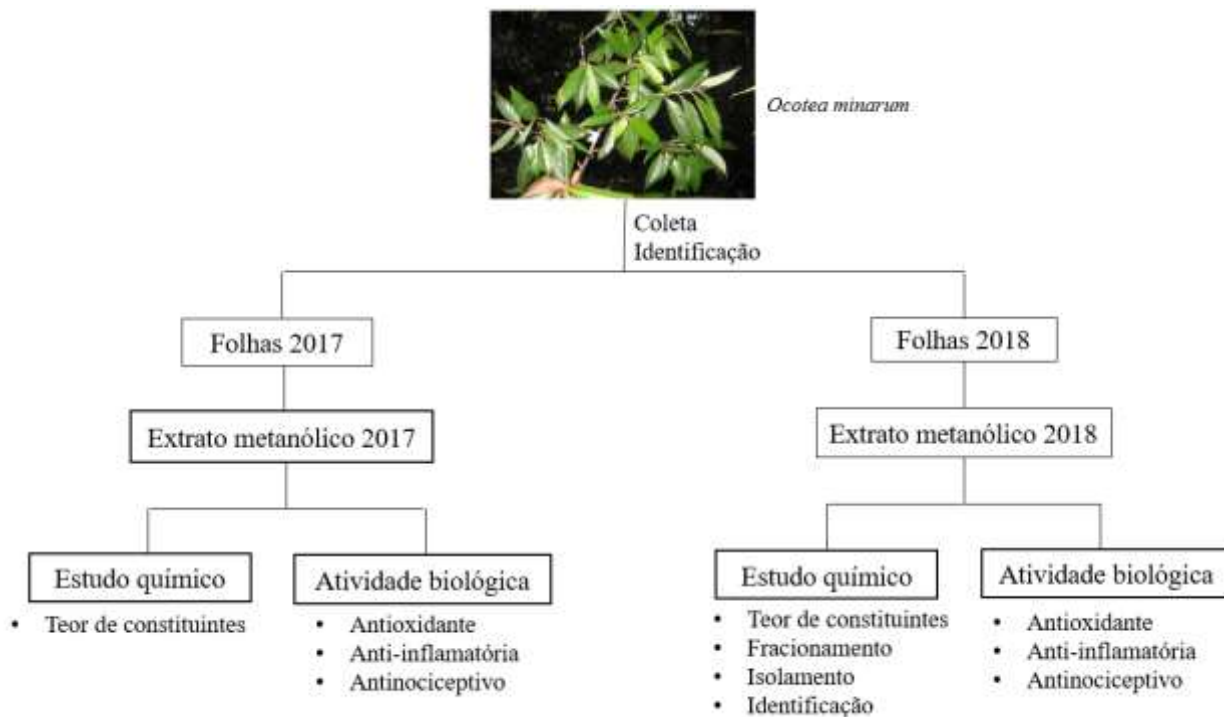


### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

- Avaliar as atividades antioxidante, anti-inflamatória, antinociceptiva e estudo químico das folhas de *O. minarum* coletadas em maio de 2017 e 2018.

#### 3.2 Objetivos Específicos



**Figura 2.** Representação esquemática das atividades realizadas no estudo

#### 4. REFERÊNCIAS

AUBLET, J.B.C.F. *Histoire des plantes de la Guiane Française*. v. 2. Paris: Didot Jeune, 1775.

ALBARRACÍN, L.T. et al. Alcaloides aporfínicos con actividad antituberculosa aislados de *Ocotea discolor* Kunth (Lauraceae). **Revista Colombiana de Química**. v. 46, n. 3, p. 22-27, 2017.

ANDREI, C.C. et al. Allylphenols from *Ocotea cymbarum*. **Phytochemistry**. v. 27, n. 12, p. 3992-3993, 1998.

ANTI, S.M.A. et al. Antiinflamatórios hormonais: Glicocorticóides. **Einsten**. v. 6, 2008.

ARCHILA, E.G.; SUÁREZ, L.E.C. Phytochemical study of leaves of *Ocotea caudate* from Colombia. **Natural Product Research**. v. 32, n. 2, p. 195-201, 2018.

ASHLEY, N.T. et al. Inflammation: mechanisms, costs, and natural variation. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**. v. 43, p. 385-406, 2012.

BAITELLO, J.B. Novas espécies de Lauraceae para a Flora brasileira. **Acta Botanica Brasilica**. v. 15, n. 3, p. 445-450, 2001.

BALLABENI, V. et al. Antiplatelet and antithrombotic activities of essential oil from wild *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. (Lauraceae) calices from Amazonian Ecuador. **Pharmacological Research**. v. 55, p. 23-30, 2007.

BARALLE, F. et al. Thalictiminine from *Ocotea puberula*. **Phytochemistry**. v. 12, p. 948-949, 1973.

BARBOSA-FILHO, J.M. et al. *Ocotea duckei*: exceptional source of yangambin and other furofuran lignans. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. v. 71, n. 2, p. 231-238, 1999.

BARREIROS A.L.B.; DAVID J.M. Estresse Oxidativo: relação entre geração de

- espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**. v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.
- BARRERA, E.D. et al. PAF-antagonistic bicycle [3.2.1] octanoid neolignans from leaves of *Ocotea macrophylla* Kunth. (Lauraceae). **Phytochemistry**. v. 70, p. 1309-1314, 2009.
- BARRERA, E.D.C.; SUÁREZ, L.E.C. Aporphine alkaloids from leaves of *Ocotea macrophylla* (Kunth) (Lauraceae) from Colombia. **Biochemical Systematics and Ecology**. v. 37, p. 522-524, 2009.
- BAVARESCO, L. et al. Glicocorticoides: usos clássicos e emprego no tratamento do câncer. **Infarma**. v. 17, n. 7, p. 58-60, 2005.
- CANSIAN, R. L. et al. Atividade antioxidante e antimicrobiana de extratos de canela-sassafrás (*Ocotea odorifera* (VELL.) ROWHER). **Perspectiva**. v. 34, n. 127, p. 123-133, 2010.
- CASTRO, O.; RUIZ, I. Aporphine alkaloids and flavonoids from *Ocotea holdridgeana*
- CAVA, M.P.; et al. *Ocotea* alkaloids: the characterization and structures of four new aporphine bases. **Tetrahedron Letters**. v. 20, p. 2435-2442, 1968.
- CAVA, M.P. et al. *Ocotea* alkaloids: variabiline, a novel aminoaporphine. **Tetrahedron Letters**. v. 46, p. 4647-4649, 1972.
- COUTAUX, A. et al. Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. **Joint Bone Spine**. v. 72, p. 359-371, 2005.
- CHAVEZ, J.P. et al. 10-Desmethyl-1-Methyl-Eudesmanes from *Ocotea corymbosa*. **Phytochemistry**. v. 39, n. 4, p. 849-852, 1995.
- CONCEIÇÃO, R.S. et al. *In vitro* acaricide activity of *Ocotea aciphylla* (Nees) Mez. (Lauraceae) extracts and identification of the compounds from the active fractions. **Ticks and Tick-borne Diseases**. v. 8, p. 275-282, 2017.

COSTA, I.F.B. et al. Antimycobacterial and nitric oxide production inhibitory activities of *Ocotea notata* from Brazilian restinga. **The Scientific World Journal**. p. 01-09, 2015.

CUCA, L.E. et al. A bicyclo [3.2.1]octanoid neolignan and toxicity of the ethanol extract from the fruit of *Ocotea heterochroma*. **Chemistry of Natural Compounds**. v. 45, n. 2, 2009.

CRUVINEL, W.M. et al. Sistema Imunitário –Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**. v. 50, n. 4, p. 434-461, 2010.

CSEKE, L.J. et al. **Natural products from plants**. Boca Raton: Taylor & Francis Group. 2006.

DA SILVA, I.G. et al. Coclaurine from *Ocotea duckei*. **Biochemical Systematics and Ecology**. v. 30, p. 881-883, 2002.

DA SILVA, J.M. et al. Anti-inflamatórios não-esteróides e suas propriedades gerais. **Revista Científica do ITPAC**. v. 7, n.4, 2014.

DA SILVA, J.K. et al. Chemical diversity, biological activity, and genetic aspects of three *Ocotea* species from the Amazon. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 18, n. 5, 2017.

DE CAMARGO, M.J. et al. Sesquiterpenos de *Ocotea lancifolia* (Lauraceae). **Química Nova**. v. 36, n. 7, p. 1008-1013, 2013.

DELPRETE, P.G.; JARDIM, J.G. Systematics, taxonomy and floristics of Brazilian Rubiaceae: an overview about the current status and future challenges. **Rodriguésia**. v. 63, n.1, p. 101-128, 2012.

DE TONI, L.G. et al. Inflammatory mediators involved in the paw edema and hyperalgesia induced by Batroxase, a metalloproteinase isolated from *Bothrops atrox*

- snake venom. **International Immunopharmacology**. v. 28, n. 1, p. 199-207, 2015.
- DIAS, C.S. et al. Isolamento e identificação de novos alcaloides de *Ocotea duckei* Vattimo (Lauraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 13, p. 62-63, 2003.
- DIAS, D.A.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O.R. Further neolignans from *Ocotea porosa*. **Phytochemistry**. v. 25, p. 2613-2616, 1986.
- DRAY, A. Inflammatory mediators of pain. **British Journal of Anaesthesia**, v. 75, p. 125-131, 1995.
- DREWES, S.E. et al. *Iso-ocobullenone* and a neolignan ketone from *Ocotea bullata* bark. **Phytochemistry**. v. 38, n. 6, p. 1505-1508, 1995.
- FOURNET, A. et al. Phytochemical and antiprotozoal activity of *Ocotea lancifolia*. 2007. **Fitoterapia**. v. 78, n. 5, p. 382-384, 2007.
- FRANCA, N.C. et al. Benzylisoquinolines from *Ocotea* species. **Phytochemistry**. v. 14, p. 1671-1672, 1975.
- GARCEZ, F.R. et al. Cytotoxic aporphine alkaloids from *Ocotea acutifolia*. **Planta Medica**. v. 77, p. 383-387, 2011.
- GARCEZ, W.S. et al. Benzylisoquinoline alkaloids and flavonols from *Ocotea vellosiana*. **Phytochemistry**. v. 39, n. 4, p. 815-816, 1995.
- GARCEZ, W.S. et al. Indole alkaloid and other constituents from *Ocotea minarum*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v. 16, n. 6, p. 1382-1386, 2005.
- GILBERT, B. et al. The Aporphine and isoquinolinedienone alkaloids of *Ocotea glaziovii*. **Journal of the American Chemical Society**. v. 86, n. 4, p. 694-696, 1964.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas Medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**. v. 30, n. 2, p. 374-381. 2007.
- GONTIJO, D.C. et al. Identification of phenolic compounds and biologically related activities from *Ocotea odorifera* aqueous extract leaves. **Food chemistry**. v. 230, p.

618-626, 2017.

GOUVEA, D.R. et al. Seasonal variation of the major secondary metabolites present in the extract of *Eremanthus mattogrossensis* Less (Asteraceae: Vernonieae) leaves.

**Química nova.** v. 35, n. 11, p. 2139-2145, 2012.

GUTERRES, Z.R. et al. Atividade genotóxica de extratos etanólicos de plantas do gênero *Ocotea*. **Revista Brasileira de Biociências.** v. 10, n. 2, p. 157-163, 2012.

GUTERRES, Z.R. et al. Mutagenicity and recombinogenicity of *Ocotea acutifolia* (Lauraceae) aporphinoid alkaloids. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis.** v. 757, p. 91-96, 2013.

HARAGUCHI, M. et al. Neolignans from *Ocotea catharinensis*. **Phytochemistry.** v. 22, p. 561-563, 1983.

JUNIOR, M.F.; VIEIRA, A.O.S. Espécies arbóreo-arbustivas da família Rubiaceae Juss. na bacia do rio Tibagi, PR, Brasil. **Hoehnea.** v. 42, n.2, p. 289-336, 2015.

KYNICH, H.K. Nonsteroidal anti-inflammatory drug use in horses. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice.** v. 16, p. 1-15, 2017.

LIU, Y. et al. Antiproliferative compounds from *Ocotea macrocarpa* from the Madagascar dry forest. **Tetrahedron Letters.** v. 56, p. 3630-3632, 2015.

LOPEZ, J.A. et al. Aporphine alkaloids of selected species of *Nectandra* and *Ocotea*. **Planta Medica.** v. 61, n. 6, 1995.

LOPEZ, J.A. et al. Aporphine alkaloids of *Ocotea brenesii*. **International Journal of Pharmacognosy.** v. 34, p. 145-147, 1996.

MADUBANYA, L.A. et al. DNA fingerprinting and anti-inflammatory activity of *Ocotea bullata* bark from different locations. **South African Journal of Botany.** v. 71, n. 1, p. 38-44, 2006.

MARQUES, R.C.P. et al. Evaluation of the mutagenic potential of yangambin and of

the hydroalcoholic extract of *Ocotea duckei* by the Ames test. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**. v. 10, p. 117-120. 2003.

MONTRUCCHIO, D.P. Antinociceptive effects of a chloroform extract and the alkaloid dicentrine isolated from fruits of *Ocotea puberula*. **Planta Medica**. v. 78, p. 1543-1548, 2012.

MORAIS, L.C.S.L. et al. Central depressant effects of reticuline extracted from *Ocotea duckei* in rats and mice. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 62, p. 57-6, 1998.

MORAIS, L.C.S.L. et al. Further lignans from *Ocotea duckei*. **Pharmaceutical biology**. v. 37, n. 2, p. 144-147, 1999.

MORAES, M.M. et al. 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**. v. 89, n. 3, 1417-1429, 2017.

MORAES, P.L.R. Sinopse das Lauráceas nos Estados de Goiás e Tocantins, Brasil. **Biotaneotropica**. v. 5, n. 2, p. 1-18, 2005.

OGUNDAJO, A.L. et al. Medicinal properties of *Ocotea bullata* stem bark extracts: phytochemical constituents, antioxidant and anti-inflammatory activity, cytotoxicity and inhibition of carbohydrate-metabolizing enzymes. **Journal of Integrative Medicine**. v. 16, n. 2, p. 132-140, 2018.

PABON, L.C.; CUCA L.E. Aporphine alkaloids from *Ocotea macrophylla* (Lauraceae). **Química Nova**. v. 33, n. 4, p. 875-879, 2010.

QUINET, A. et al. Lauraceae in flora do Brasil

RODRIGUES, A.B. et al. Bioprospecting of *Ocotea minarum* (Laurales: Lauraceae) by ethanolic extract in control of strains of gender *Candida*. **BMC Proceedings**. v. 8, p. 1-2, 2014.

RAKOTONDRAIBE, L.H. et al. Neolignans and other metabolites from *Ocotea cymosa* from the Madagascar rain forest and their biological activities. **Journal of Natural Products**. v. 78, n. 3, p. 431-440, 2015.

RANKIN, J.A. Biological Mediators of Acute Inflammation. **AACN Clinical Issues**. v. 15, n. 1, p. 3-17, 2004.

RAO, S.R.; RAVISHANKAR, G.A. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. **Biotechnology Advances**. v. 20, p. 101-153. 2002.

ROGATTO, J.M. et al. CARACTERIZAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE *Ocotea odorifera* (VELLOZO) ROHWER. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**. v. 12, n. 1, p. 886-894, 2014.

ROMOFF, P. et al. Neoligans from *Ocotea aciphylla*. **Phytochemistry**. v. 23, n. 9, p. 2101-2104, 1984.

SANDILANDS, E.A.; BATEMAN, D.N. Non-steroidal antiinflammatory drugs. **Medicine**. v. 44, p. 185-186, 2016.

SEHLAPELO, B.M et al. Ocobullenone: a bicyclo[3.2.1] octanoide neoligan from *Ocotea bullata*. **Phytochemistry**. v. 32, n. 5, p. 1352-1353, 1993.

SCHNEIDER, C.D.; DE OLIVEIRA, A.R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**. v. 10, n. 4, p. 308-313, 2004.

SHERWOOD, E.R.; TOLIVER-KNISKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**. v. 18, p. 385-405, 2004.

TAVARES, L. et al. Antioxidant Capacity of Macaronesian Traditional Medicinal Plants. **Molecules**. v. 15, p. 2576-2592, 2010.

TRACY, R.P. The five cardinal signs of inflammation: calor, dolor, rubor, tumor and



penuria. **Journal of Gerontology: Medical Sciences**. v. 61A, n. 10, p. 1051-1052, 2006.

VANEGAS, H. To the descending pain-control system in rats, inflammation-induced primary and secondary hyperalgesia are two different things. **Neuroscience Letters**. v. 361, p. 225-228, 2004.

VECCHIETTI, V. et al. Alkaloids of *Ocotea acutangula*. **Journal of the Chemical Society**. v. 1, p. 578-581, 1981.

VECCHIETTI, V.; CASAGRANDE, C.; FERRARI G. Alkaloids of *Ocotea brachybotra*. **Farmaco Science**. v. 32, n. 11, p. 767-769, 1977.

VECCHIETTI, V. et al. New aporphine alkaloids of *Ocotea minarum*. **Farmaco Science**. v. 34, n. 10, p. 829-840, 1979.

VECCHIETTI, V. et al. Ocobotrine and 14-episinomenine new trans-morphinan alkaloids of *Ocotea brachybotra*. **Tetrahedron Letters**. n. 19, p. 1631-1634, 1976.

VELO, G. P. et al. Distribution of prostaglandins in inflammatory exudate. **The Journal of Pathology**. v. 111, p. 149-158, 1973.

VILEGAS, J.H.Y. et al. Aporphine alkaloids from *Ocotea caesia*. **Phytochemistry**. v. 28, n. 12, p. 3577-3578, 1989.

YAMAGUCHI, K.K.L. et al. Investigação do potencial antioxidante e anticolinesterásico de 20 espécies da família Lauraceae. **Acta Amazonica**. v. 42, n. 4, p. 541-546, 2012.

ZANIN, S.M.W. et al. Mudanças de *Ocotea puberula* (Lauraceae): identificação e monitoramento de alcaloides aporfínicos. **Química Nova**. v. 34, n. 5, p. 743-747, 2011.

ZHANG, X. et al. Nitric oxide is involved in abscisic acid-induced photosynthesis and antioxidant system of tall fescue seedlings response to low-light stress. **Environmental**

**and Experimental Botany**. v. 155, p. 226-238, 2018.

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

**Chemical and biological comparison of extracts obtained from *Ocotea minarum* in the years 2017 and 2018**

Milena Menezes Corrêa Pederiva<sup>1</sup>, Carla Roberta Ferreira Volobuff<sup>2</sup>, Zefa Valdevina Pereira<sup>1</sup>, Candida Aparecida Leite Kassuya<sup>2</sup> e Anelise Samara Nazari Formagio<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup>Faculty of Biological and Environmental Sciences, Federal University of Grande Dourados UFGD, Mato Grosso do Sul State, Brazil

<sup>2</sup>Faculty of Health Sciences, Federal University of Grande Dourados UFGD, Mato Grosso do Sul State, Brazil

To whom correspondence should be addressed to Anelise Formagio in Biological and Environmental Sciences, Federal University of Grande Dourados, Dourados, MS, Brazil. E-mail: [aneliseformagio@ufgd.edu.br](mailto:aneliseformagio@ufgd.edu.br); [aneliseformagio@gmail.com](mailto:aneliseformagio@gmail.com)

## ABSTRACT

The objective of this study was to investigate and compare the antioxidant, antiinflammatory and antinociceptive potential of methanol extracts obtained from the leaves of *Ocotea minarum* in the years 2017 and 2018, as well as the isolation of the main compounds. The contents of the constituents were evaluated for total phenols and flavonoids. The antioxidant activity of the extracts was measured by the DPPH and  $\beta$ -carotene/linoleic acid assays *in vitro*, using butyl-hydroxytoluene (BHT) as a positive control. The MEOM-2017 and MEOM-2018 were evaluated at doses of 30, 100 and 300 mg/kg, and quercetin-7-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (OM-1) and genistein (OM-2) for 100 mg/kg, for carrageenan-induced models of edema, pleurisy and paw antinociception in mice. The anti-inflammatory dexamethasone was used as a positive control. The flavonoids OM-1 and OM-2, were identified from the ethyl acetate fraction of the extract obtained in 2018. The MEOM-2018 showed a higher concentration of total phenomena and flavonoids when compared to MEOM-2017, thus demonstrating a higher antioxidant potential in the tested trials. In the inflammation models, both extracts and compounds showed anti-nematode activity, inhibition of leukocyte and antinociceptive migration, especially MEOM-2018 and OM-2. Acute inflammation models allow investigation of the vascular and cellular components of the inflammatory response. The highlight for MEOM-2018 can be explained by the concentration of secondary metabolites, due to environmental factors, such as temperature increase and relative humidity decrease. The study reports for the first time the anti-inflammatory and antinociceptive action in the animal model of the leaves of *O. minarum*, partially supporting the popular use as anti-inflammatory, contributing with studies of the genus.

**KEY WORDS:** Canela-vassoura; Lauraceae; inflammation; lipoperoxidation; radical sequestration; flavonoids.

## INTRODUCTION

Canelinha or canela-vassoura as it is known *Ocotea minarum* (Nees & Mart.) Mez., (Lauraceae), abundant in the Brazilian territory, covering the state of Mato Grosso do Sul [1], is popularly used for candidiasis [2] and others of *Ocotea* genus are used inflammation treatments *i.e.* *O. odorifera* [3]. Some researchers reported at present from flavonoids, coumarins, steroids and sesquiterpenes on fruits, heartwood and stem [4], as well as alkaloids on the leaves of *O. minarum* [5]. However, there are no reports available in the literature, studying the anti-inflammatory properties of this specie.

Plants of *Ocotea* genus are reported with potential anti-inflammatory agents [6,7,8,9]. The inflammation consists of a mechanism of defense of the organism against cellular and tissue imbalance, aiming at homeostasis, involving the participation of different cell types, soluble substances and vascular elements. After injury, the innate immune response is activated, causing intracellular signaling pathways to activate the production of proinflammatory cytokines, in addition to other mediators such as histamine and prostaglandins [10]. These mediators are generated during arachidonic acid metabolism, where cyclooxygenase isoforms (COX-1 and COX-2) act as key players. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) blocked of prostaglandin biosynthesis [11], and this have been used to treat inflammatory disorders because of their multiple effects, however also cause a lot of side effects, including ulceration in the gastrointestinal system, as well as cardiovascular and neurological disorders.

Based on the idea that phenolic and polyphenolics compounds have demonstrated beneficial effects for the therapy of several acute and chronic disorders, including inflammatory diseases [12,13], at least in part, its use as alternative or supportive treatments in various diseases, this study evaluated the anti-inflammatory effects in

rodents of methanolic extract from *O. minarum* leaves, collected in two consecutive years in the fall season, to investigate its anti-inflammatory effects. In addition, we also determined the antioxidant activity and the isolation of flavonoids genistein, quercetin-7-O- $\beta$ -D-glucopyranoside and myricetin 3-raminoside.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Animals**

Male and female *Swiss* mice (30-60g) were obtained from the central laboratory of the Federal University of Grande Dourados (UFGD). The animals were kept at a constant temperature ( $23 \pm 1^\circ\text{C}$ ) in a light/dark cycle of 12 hours, with free access to feed and water. In the models of pleurisy and paw edema (inflammation), the male and female mice, respectively, were divided into groups (n=6), negative control (saline solution), positive control (dexamethasone, DEX 1mg/kg), MEOM-2017 and MEOM-2018 (30, 100 and 300mg/kg), OM-1 and OM-2 (100mg/kg).

### **Plant material and methanolic extracts preparation**

Sample of methanolic extract *O. minarum* (leaves) collected in the autumn (May) in 2017 and 2018, in Itahum ( $22^\circ 08' 05''\text{S}$  and  $55^\circ 08' 17''\text{O}$ ), Mato Grosso do Sul, Brazil and identified by Dr. Zefa Valdivina Pereira (Faculty of Biological and Environmental Sciences, Federal University of Grande Dourados, MS, Brazil) and a voucher specimen was deposited in the Herbarium this University under the registration number 5633. The methanolic extract of the *O. minarum* (MEOM) was then prepared by maceration of the leaves in methanol (P.A) at room temperature for 6 days. The extracts were filtered and the residue was submitted to 4 more extractions using the

same process. After 30 days, the filtrate was concentrated under reduced pressure and finally freeze-dried and stored at  $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , with yielded of (MEOM-2017, 218.4 g) and (MEOM-2018, 44.3 g)

### **Isolation and identification of compounds**

Part of the methanolic extract from the leaves (MEOM-2018, 36 g) was dissolved in MeOH: H<sub>2</sub>O (1:1) and partitioned with hexane, chloroform and ethyl acetate, with subsequent evaporation of the solvents under reduced pressure, resulting in hexane fractions (HF-OM, 7.59 g), chloroform (CF-OM, 1.54 g), ethyl acetate (EAF-OM, 1.41 g) and hydromethanol (HMF-OM, 7.45 g). Part of EAF-OM (0.267 g) was fractionated in Sephadex LH-20 using H<sub>2</sub>O, H<sub>2</sub>O: MeOH (75:25, 50:50, 25:75) and MeOH, resulting in EAF-OM-1 to EAF-OM-139 subfractions, of which EAF-OM-60 and EAF-OM-77 were sent for <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR analysis, allowing the identification of flavonoids quercetin-7-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (OM -1) and 3-raminoside myricetin in the EAF-OM-77 subfraction and genistein (OM-2) of the EAF-OM-60 subfraction.

### **Content of constituents**

The determination of the content of total phenols and flavonoids was determined following the methodology by [14]. The standards used were gallic acid and quercetin, respectively. The methanol was used as white and the results expressed in milligrams of the standard per gram of extract.

### **DPPH – radical screening**

In the DPPH assay different concentrations of MEOM-2017 and MEOM-2018 (5-300 mg/mL) were added (2mL) to a pre-prepared solution of DPPH (0.1mM). The

tubes were incubated at room temperature and under light protection for 30min and the reading performed at 515nm [14]. Butylhydroxytoluene (BHT) was used as standard. The percentage of inhibition was calculated according to:  $(I\%) = (A_0 - A/A_0) \times 100$ , where  $A_0$  is the absorbance of the control and  $A$  is the absorbance of the sample. The IC50 value was calculated as the sample concentration required eliminating 50% free radicals by plotting the I% versus the extract concentration. The test was performed in triplicate.

### **Peroxidation $\beta$ -carotene/linoleic acid**

The  $\beta$ -carotene was dissolved in 10mL of chloroform, called the  $\beta$ -carotene solution [15,16]. In 1ml of this solution was added 20 $\mu$ l of linoleic acid and 200 $\mu$ l of Tween 40. The mixture was subjected to rotaevaporation at 45°C to remove chloroform. 50ml of distilled water was added and the mixture was stirred vigorously until emulsion. 0.2mL of the samples and the BHT standard were added to 5mL of the emulsion. Absorbance reading was performed in the time from zero to 470nm. The tubes were placed in a 50°C water bath and the absorbance was read at 15min intervals until discoloration of the  $\beta$ -carotene in the control sample (210 min). For test the calculation was performed from the following equation:  $AA\% = 1 - (A - A_0 / A'A' - A'0) \times 100$ , where  $A$  and  $A'A'$  refer to absorbance values measured at time zero for the test and control sample, respectively, and  $A_0$  and  $A'0A'0$  refer to the corresponding absorbance values of the test and control sample measured after incubation, respectively. The assay was performed in triplicate.

### **Paw edema – carrageenan induced**

The treatment (via gavage) was performed 1 hour prior to intraplantar injection



of carrageenan (Cg). Paw edema was induced from 50  $\mu$ L of Cg injection in the right paw and injection of sterile saline (0.9%) applied to the left paw of the animal as control. The edema was evaluated with a plethysmometer at 1, 2 and 4 h after Cg injection. The results were expressed in mL and the difference between onset and postinjection was quantified as edema [17].

### **Pleurisy – carrageenan induced**

Treatment (via gavage) was performed 1h prior to intrapleural injection. Pleurisy was induced from the injection of 100 $\mu$ l intrapleural Cg (1%) [19]. The negative control group was treated with sterile saline solution by intrapleural injection. The group not injected with carrageenan was called naive. After four hours, the animals were anesthetized and submitted to euthanasia. 1mL of phosphate buffered saline (PBS) was used to wash the pleura and remove the exudate, a 20 $\mu$ L aliquot of the exudate was diluted in 400 $\mu$ l of Turk's liquid, and the total leukocyte count was performed in neubauer chamber under light microscopy. The exudates removed were centrifuged and evaluated for extravasation of proteins [20].

### **Antinociceptive**

Cold hyperalgesia was measured by the acetone test as described previously (18), analyzed at 3 and 4 hours after administration of intraplantar Cg. The cold sensitivity reaction, indicated from the licking, agitation or friction of the paw, was observed and recorded. The duration of the test was 30s.

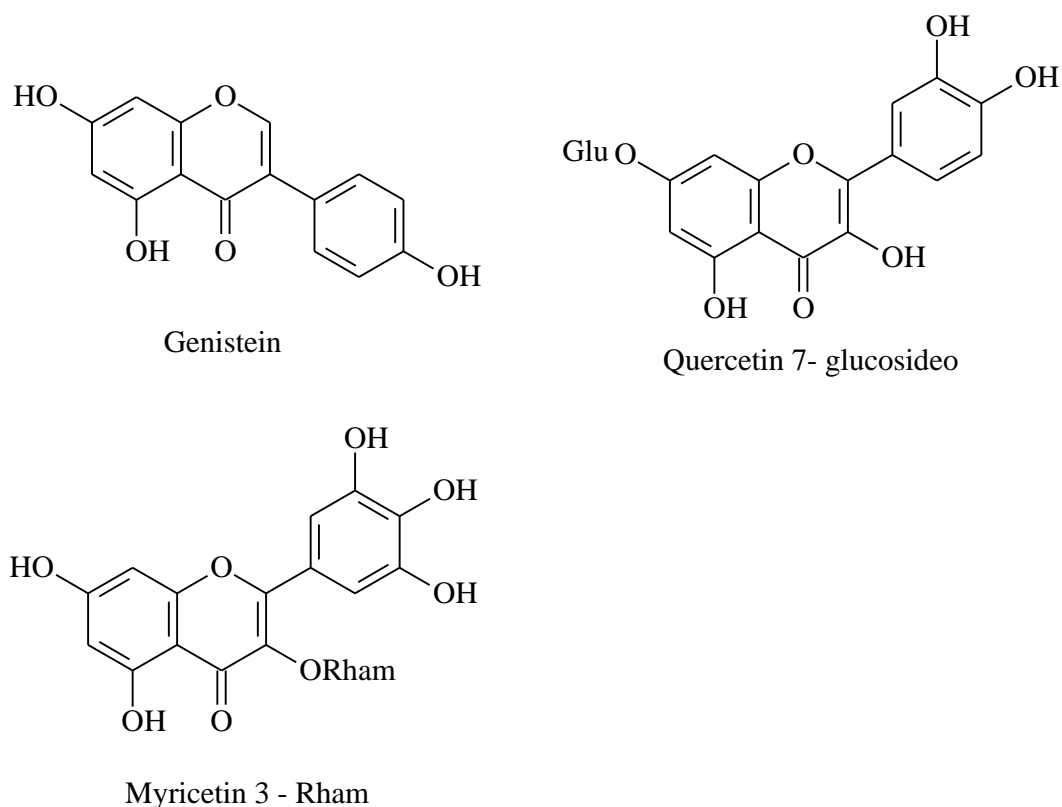
## Statistical analysis

All data are presented as mean  $\pm$  S.E.M. Difference between groups was evaluated by analyses of variance (one-way ANOVA) followed by Student Newman-Keuls test. The number of animals per group is indicated in the legends. Statistical differences were considered to be significant at  $p < 0.05$ .

## RESULTS

### Phytochemical study

The MEOM-2017 and MEOM-2018 presented variation in the content of constituents evaluated, highlighting the sample the MEOM-2018 with highest total phenolics ( $1050.7 \pm 0.19$  mg GAE/g extract) and flavonoids ( $321.96 \pm 1.20$  mg QE/g extract). Whereas MEOM-2017 was  $302.56 \pm 0.67$  mg GAE/g extract for total phenols and  $205.04 \pm 0.67$  mg QE/g extract for flavonoids. In an attempt of demonstrate the flavonoids present, the chemical investigation of MEOM-2018 has led to isolation of the genistein by  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data in the aromatic region of  $\delta_{\text{H/C}}$  8.30 (s)/152.50, 7.87 (d,  $J = 8.2\text{Hz}$ )/129.43, 6.94 (d,  $J = 1.2\text{Hz}$ )/102.56, 6.63 (d,  $J = 8.2$ )/115.09 e 6.53 (d,  $J = 1,2\text{Hz}$ )/104.44 for the isoflavone aglycone and comparison with data from the literature [21], as also quercetin-7-O- $\beta$ -D-glucopyranoside and myricetin 3-raminoside, relating to flavonol aglycone, isolation of the ethyl acetate fraction (Fig. 1).



**Fig. 1.** Chemical structures of genistein, quercetin-7-O- $\beta$ -D-glucopyranoside and myricetin 3-rhamnoside, identified in extract of *O. minarum* by  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR.

## Biological activity

### Antioxidant

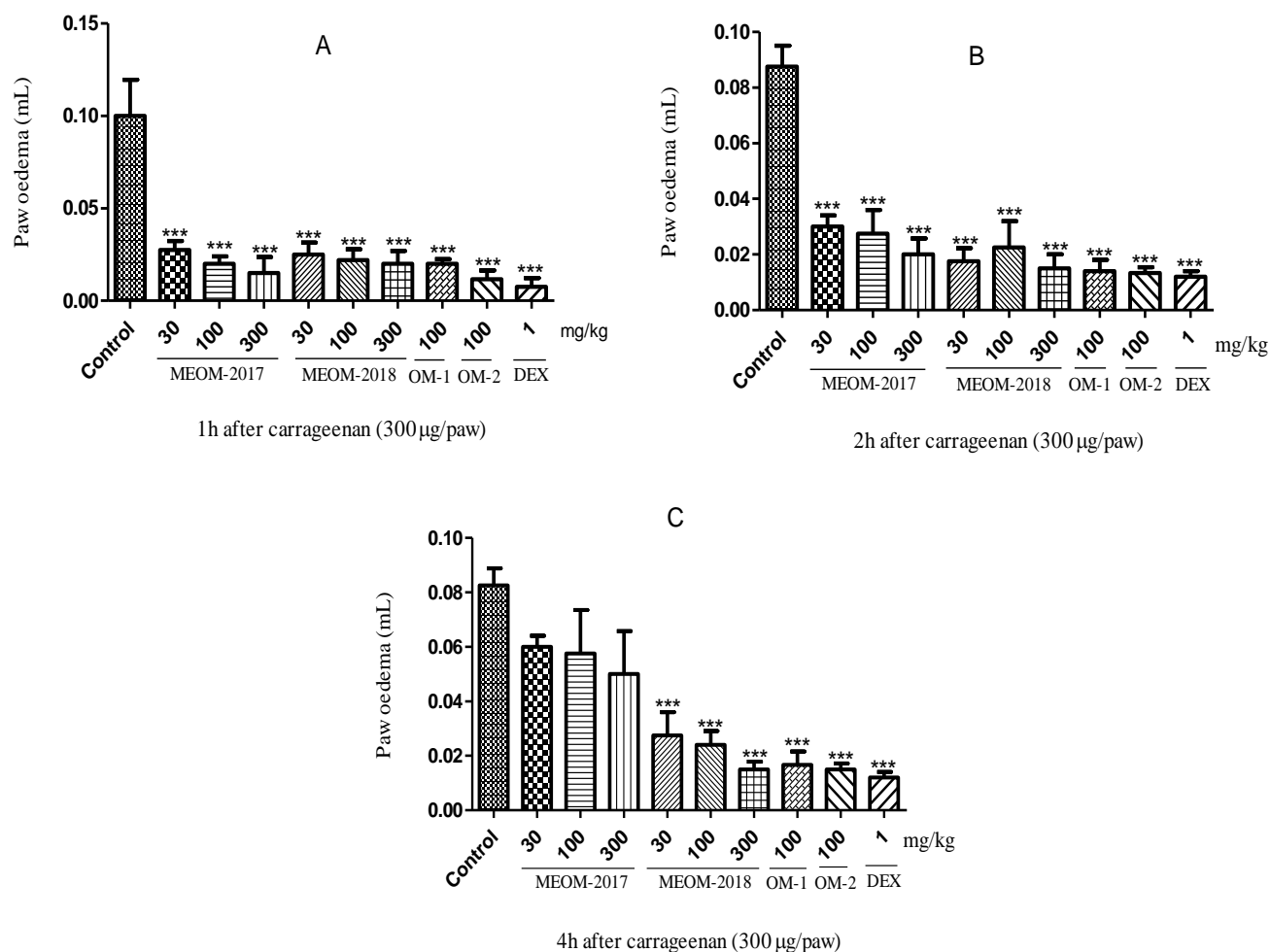
The highest antioxidant capacity was also the average of DPPH with an  $\text{IC}_{50}$  of  $25.16 \pm 1.28 \mu\text{g/mL}$  and  $16.66 \pm 0.11 \mu\text{g/mL}$ , for MEOM-2017 and for MEOM-2018, respectively, with potential similar to the BHT ( $\text{IC}_{50}$  of  $16.7 \pm 1.34$ ). Higher antioxidant activity was found for MEOM-2018 ( $58.7 \pm 0.81\%$ ) with the  $\beta$ -carotene bleaching method compared to BHT ( $77.3 \pm 0.67\%$ ), while the MEOM-2017 which presented values  $24.5 \pm 1.40\%$ .

### Paw oedema

Paw edema was measured using a plethysmometer. After 1 hour of Cg injection,

MEOM-2017 and MEOM-2018 (30, 100 and 300 mg/kg) were able to reduce edema size by 72.5; 80.0 and 85.0%, respectively, for MEOM-2017 and 75.0; 78.0 and 80.0%, respectively, for MEOM-2018. The isolated compounds OM-1 and OM-2, tested at a dose of 100 mg/kg, presented 80 and 88.4%, respectively, of decreasing edema size in 1h (Fig. 3A). At 2h, MEOM-2017 (30, 100 and 300 mg/kg) reduced by 65.7; 68.7 and 77.1%, respectively, while MEOM-2018 presented 80; 74.2 and 82.8% reduction, respectively. OM-1 (100 mg/kg) and OM-2 (100 mg/kg) presented values of 84 and 84.8% reduction, respectively (Fig. 3B). On reading after 4h of Cg injection, MEOM-2017 decreased its effect of reducing edema size, with results of 27.7; 30.3 and 39.3%, respectively, while the MEOM-2018 maintained its reduction effects 81.8; 70.9 and .6%

respectively, while OM-1 and OM-2, maintained their anti-inflammatory effects with a reduction of 79.8 and 81.8% (Fig. 3C). DEX showed inhibition of 92.5% (1h), 86.2% (2h) and 85.4% (4h) (Fig. 3).

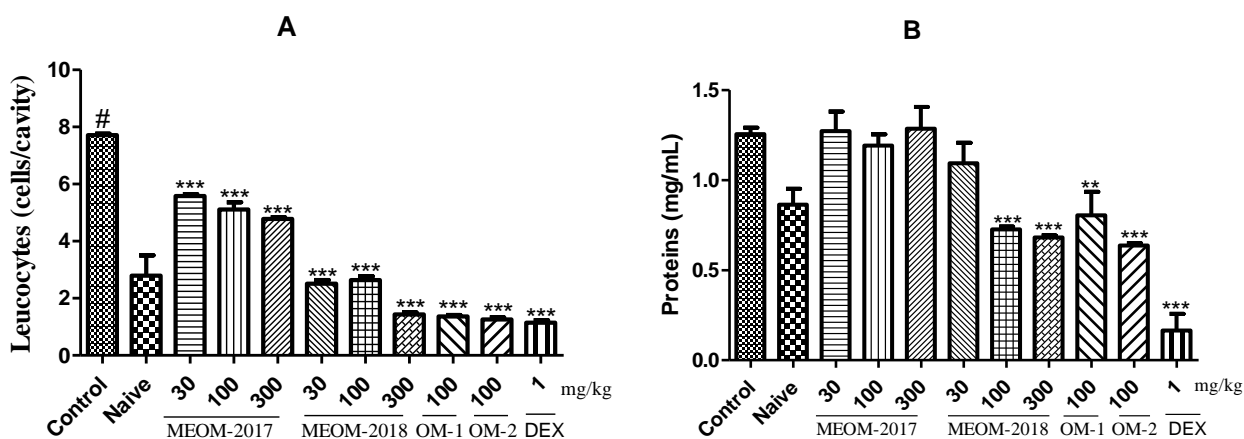


**Fig. 3.** Effect of oral administration of MEOM-2017, MEOM-2018, OM-1 and OM-2 on carrageenan-induced paw edema in mice. The animals received MEOM-2017 and MEOM-2018 (30, 100 or 300 mg/kg, p.o.), OM-1 and OM-2 (100 mg/kg, p.o.), control (saline) or DEX (1 mg/kg, sc), and 1h later, an intraplantar injection of carrageenan (300 µg/paw) was administered. The graphs (A), (B) and (C) represent the evaluation of

paw edema at 1, 2 and 4 h, respectively, after Cg injection. Each bar represents the mean  $\pm$  SEM of 6 animals.  $**p < 0.01$ ,  $***p < 0.001$ , compared to the control group. One-way ANOVA followed by the Newman-Keuls test.

## Pleurisy

In the pleurisy assay, females were orally treated with MEOM-2017, MEOM-2018, OM-1 and OM-2. Treatment with MEOM-2017 and MEOM-2018 at doses of 30, 100 and 300 mg/kg showed inhibition of leukocyte migration of 27.6; 33.7 and 38%, respectively, for MEOM-2017 and 67.4; 65.7 and 70.2% for MEOM-2018, whereas OM-1 and OM-2 at the doses of 100 mg/kg reduced leukocyte migration in 82.3 and 83.6%, after 4 hours of Cg injection. DEX showed inhibition of 89% (Fig. 4A). However, only the doses of MEOM-2 and the compounds OM-1 and OM-2 tested showed significant protein extravasation (Fig. 4B).

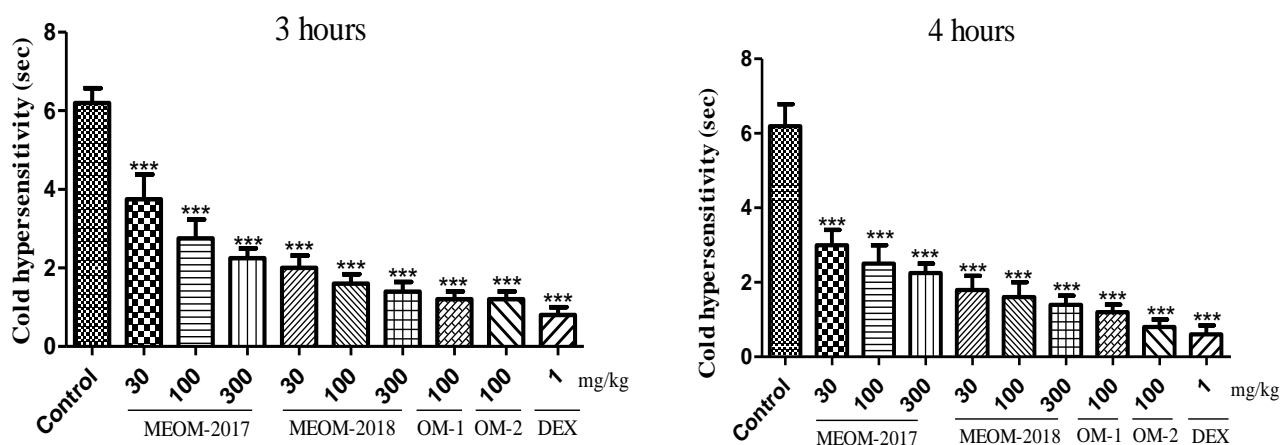


**Fig. 4.** Effects of oral administration of MEOM-2017, MEOM-2018, OM-1 and OM-2 on leukocyte migration (A) in the pleurisy test (B) and protein extravasation. The animals received MEOM-2017 and MEOM-2018 (30, 100, or 300 mg/kg, p.o.), OM-1 and OM-2 (100 mg/kg, p.o.), control (saline) or dexamethasone (DEX, 1 mg/kg, s.c.). After 1h, they received an intrapleural injection of Cg or saline solution (100  $\mu$ L of a

1% solution/cavity). Each bar represents the mean  $\pm$  SEM of 6 animals. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , # $p < 0.001$  compared with the control group. One-way ANOVA followed by the Newman-Keuls test.

### Cold sensitivity

The MEOM-2017 and MEOM-2018 (30, 100 and 300 mg/kg) were able to reduce the acetone cold response at 3 and 4 hours after Cg injection, with inhibitions of 39.5; 55.6 and 63.7%, for MEOM-2017, respectively, and 67.7; 74.1 and 77.4% for MEOM-2018, respectively. The OM-1 and OM-2 (100 mg/kg) also had significant antinociceptive activity, with values of 80.6 and 81.6%, respectively, in the 3h analysis. At 4h, MEOM-2017 (30, 100 and 300 mg/kg) reduced the cold response by 51.6; 59.6 and 63.7%, while MEOM-2018 at the same doses showed 70.9; 74.1 and 77.4%, respectively. The OM-1 and OM-2 (100 mg/kg) presented antinociception activities with values of 80.6 and 87%, respectively. The DEX presented values of 87 and 90.3% in the times of 3 and 4h, respectively (Fig. 5).



**Fig. 5.** Effect of oral administration of MEOM-2017, MEOM-2018, OM-1 and OM-2 on the cold sensitivity induced by acetone in mice. The animals received MEOM-2017

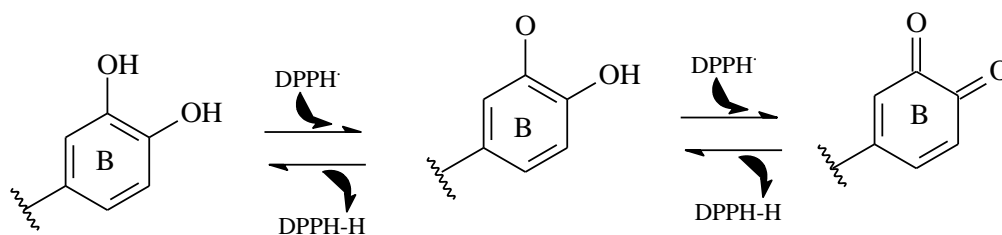
and MEOM-2018 (30, 100 or 300 mg/kg, p.o.), OM-1 and OM-2 (100 mg/kg, p.o.), control (saline) or DEX (1 mg/kg, s.c.). The cold sensitivity was measured 3 and 4h after carrageenan administration. Each bar represents the mean  $\pm$  SEM of 6 animals. \*\*\* $p < 0.001$ ; compared with the control group One-way ANOVA followed by the Newman-Keuls test.

## DISCUSSION

The present study reports the first research on the anti-inflammatory and antioxidant effects of leaves from *O. minarum* and its isolated compounds, showed of the presence flavonoids of the methanolic extracts collected in the same month in consecutive years.

The DPPH is a free radical that accepts electrons or hydrogen radicals from donor compounds and shows a strong absorption band at 515–520 nm. Flavonoids are potent antioxidants, since they have the capacity to donate hydrogen from the hydroxyl groups present in their structures, resulting in a radical of lower reactivity, highlight the need for including these compounds in the diet due to their potential antioxidant activities and a wide range of health benefits. It is known that the transfer of simple electrons and hydrogen atoms are important mechanisms for the antioxidant potential of flavonoids [22]. We have attempted to explain the results obtained using the DPPH method for the flavonoids aglycone related, suggest the hypotheses to explain the antiradical efficiencies, that flavonol aglycone (ring B, orto or para-hydroxyl group) each reduce nearly two molecules DPPH as is shown in the following reaction (Fig. 6).





**Fig. 6.** Hypothesis to explain anti-radical efficiencies of isolated flavonoids.

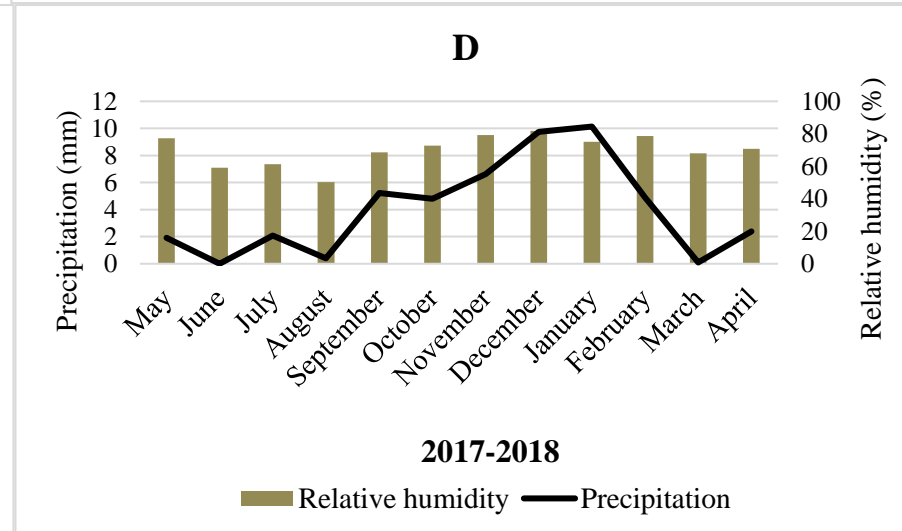
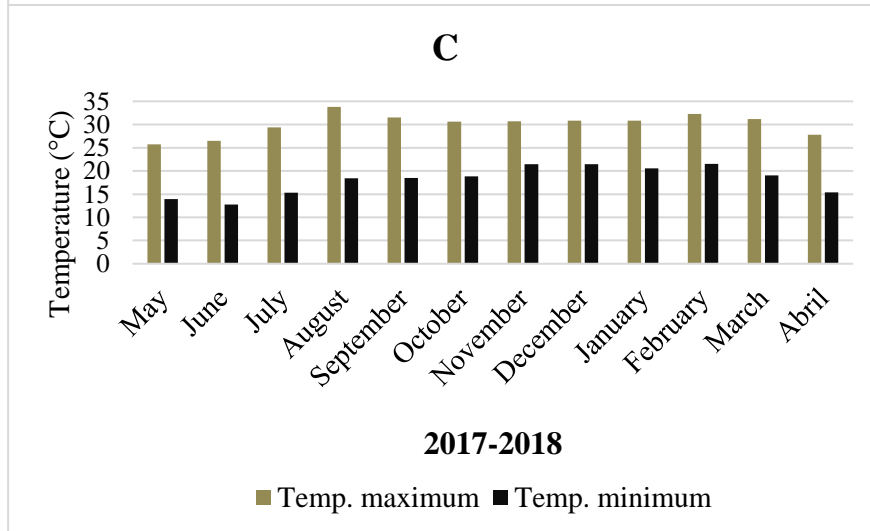
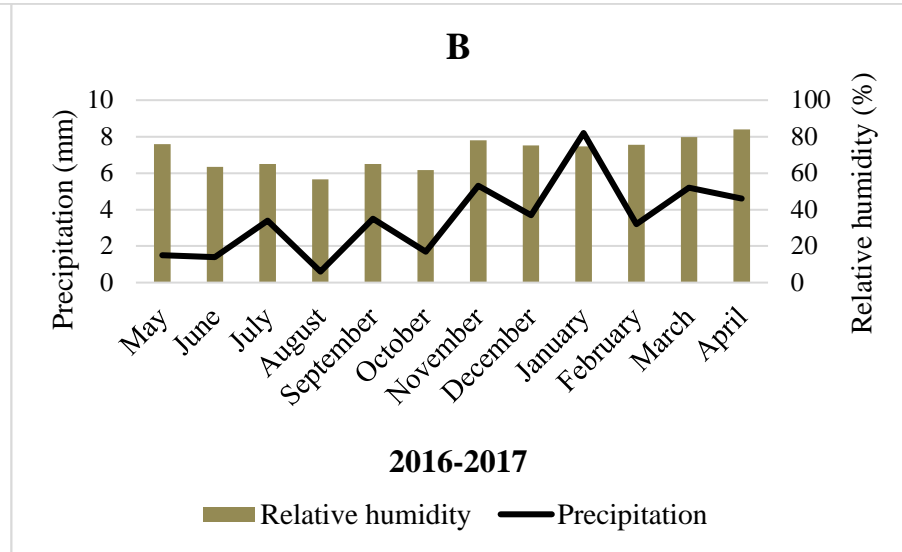
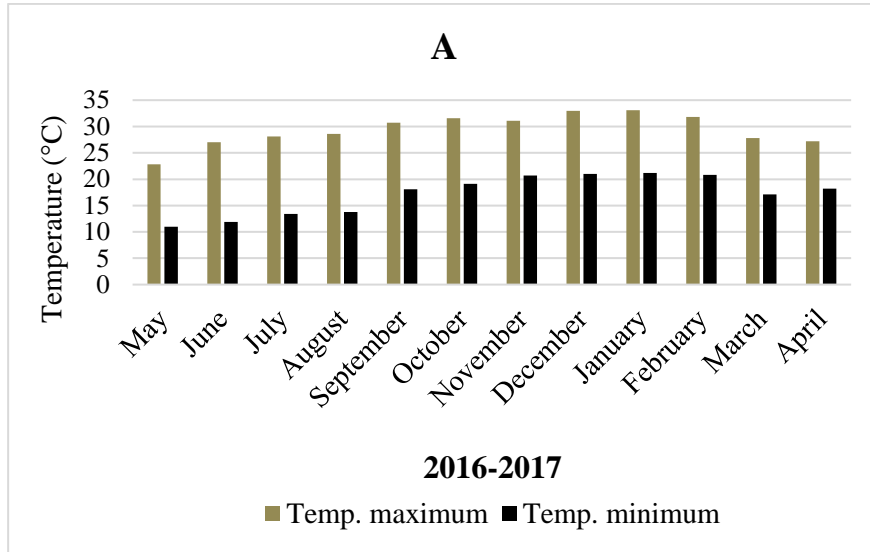
This extract contains lipophilic compounds, which act by inhibiting or retarding oxidation of  $\beta$ -carotene. Some species of the *Ocotea* genus have been tested for antioxidant activity, showing satisfactory results, notably *O. bullata*, *O. minor*, *O. foetens*, *O. lancifolia* and *O. odorifera* have confirmed their properties [6, 23-27].

The models of acute inflammation allow to investigate the vascular and cellular components of the inflammatory response. In the attempt to verify if the species under study has anti-inflammatory activity by the model of edema and pleurisy induced-Cg. The Cg is capable of causing the release of various inflammatory and nociceptive mediators such as histamine, prostaglandins and cytokines [28]. The edema is a cardinal signal dependent on the synergism between the mediators that generate local vasodilation, increasing blood flow [29]. This is a classic test to evaluate the first phase of the inflammatory reaction with multiple mediators acting in sequence to produce an inflammatory response. The early phase (0–1 h) includes the release of histamine, serotonin and bradykinin occurs, and later stage (1–6 h) includes an increased production of prostaglandins, COX-2 activation and NO release [30]. The isoflavones have been reported as anti-inflammatory substances. The genistein is able to negatively regulate the signal transduction generated by cytokines, affecting leukocyte cells acting against inflammation [31], as well as other reported mechanisms of action [32,33,34,35,36,37].

In the pleurisy model it is possible to evaluate leukocyte migration. The cytokines released by macrophages and neutrophils are able to recruit other cells to the site of injury, and increased vascular permeability generates extravasation of fluids with high concentrations of proteins responsible for signs of swelling and pain. In our study it was possible to observe that the extracts and compounds were able to generate inhibition of the leukocyte migration, reduction in protein concentration and, moreover, acted as analgesics in antinociception.

The MEOM-2018 presented the best results of antioxidant, anti-inflammatory and antinociceptive activity compared to MEOM-2017, this can be explained by the environmental factors that generate alterations in the content of secondary metabolites. According to data from the western agricultural Embrapa, from May 2016 until the same month of 2017, when the leaves were collected, the mean maximum temperature was 26.6 ° C and the minimum was 15.4 ° C (Fig. 7A), the relative humidity had an average of 71% and the rainfall index was 3.5 mm (Fig. 7B).

However, for the months of May 2017 to 2018, where the species was collected at the same site, the temperature averages were 30.1 °C for maximum and 18.1 °C for minimum (Fig. 7C) , while the relative humidity presented a mean of 70.2% and a rainfall of 4 mm (Fig. 7D), indicating that in the years 2017-2018 there was a higher temperature rise and a lower relative humidity compared to 2016-2017, it may be assumed that *O. minarum* produced a higher amount of secondary metabolites due to environmental changes, which can be observed through the content of constituents present in MEOM-2018 and its potential in the tests performed.



**Fig. 7.** Minimum and maximum temperatures (A and C), precipitation and relative humidity (B and D) during the months of April-2016 to May-2017 and April-2017 to May-2018.

Flavonoids are widely distributed in the plant defense system, their synthesis has a positive correlation with the intensity of solar radiation, as they hinder ultraviolet radiation damage to the inner tissues of the plant, through its dissipation and/or absorption characteristics. solar energy. They accumulate mainly in the superficial tissues of the vegetable and are used by them as filters, by absorbing the solar radiation [38]. This can be explained by the higher concentration of flavonoids found in the 2018 extract, because with the elevation of temperature, there is an increase in the ultraviolet radiation rates that affect the species.

The study reports for the first time the anti-inflammatory and antinociceptive action in the animal model of the leaves of *O. minarum*, with the presence of flavonoids, which in part support the popular use as anti-inflammatory, contributing with studies of the genus. Environmental conditions such as temperature and relative humidity influence the production of secondary metabolites, thus highlighting a better response for the methanol extract obtained from the leaves collected in May 2018.

## FUNDING

The authors are grateful to FUNDECT (Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul; 59/300.029/2015) and Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior; 2764/2011) for financial support and fellowships.

## COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS

**Conflict of interest.** The authors declare that they have no competing interests.

**Ethical Approval.** All experimental procedures were carried out in accordance with the U.S. National Institutes of Health and were approved by the Animal Ethics Committee from UFGD (Nbr. 18/2017).

## REFERENCES

1. Moraes, P.L.R. 2005. Sinopse das Lauraceas nos Estados de Goiás e Tocantins, Brasil. *Biota Neotropica* 5: 1-18. <http://dx.doi.org/10.1590/S1676-06032005000300018>
2. Rodrigues, A.B., Bicudo, B.P., Wiebusch, L., Borges, R.R., De Almeida, A.A., De Oliveira, K.M.P. 2014. Bioprospecting of *Ocotea minarum* (Laurales: Lauraceae) by ethanolic extract in control of strains of gender *Candida*. *BMC Proceedings* 8: 21. <https://dx.doi.org/10.1186/1753-6561-8-S4-P21>
3. Tribess, B., Pintarelli, G.M., Bini, L.A., Camargo, A., Funez, L.A., De Gasper, A.L., Zeni, A.L.B. 2015. Ethnobotanical study of plants used for therapeutic purposes in the Atlantic Forest region, Southern Brazil. *Journal of Ethnopharmacology* 164: 136-146. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.02.005>
4. Garcez, W.S., Garcez, F.R., Da Silva, L.M.G.E., Shimabukuro, A.A. 2005. Indole alkaloid and other constituents from *Ocotea minarum*. *Journal of Brazilian Chemical Society* 16: 1382-1386. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-50532005000800013>
5. Vecchietti, V., Casagrande, C., Ferrari, G., Severini, R.C. 1979. New aporphine alkaloids of *Ocotea minarum*. *Farmaco Science* 34: 829-840.

6. Zschocke, S., Staden, J.V., Paulus, K., Bauer, R., Horn, M.M., Munro, O.Q., Brown, N.J., Drewes, S.E. 2000. Stereostructure and anti-inflammatory activity of three diastereomers of ocobullenone from *Ocotea bullata*. *Phytochemistry* 54: 591-595. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00163-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00163-1)
7. Ogundajo, A.L., Adeniran, L.A., Ashafa, A.O. 2018. Medicinal properties of *Ocotea bullata* stem bark extracts: phytochemical constituents, antioxidant and anti-inflammatory activity, cytotoxicity and inhibition of carbohydrate-metabolizing enzymes. *Journal of Integrative Medicine* 16: 132-140. <https://doi.org/10.1016/j.joim.2018.02.007>
8. Montrucchio, D.P., Miguel, O.G., Zanin, S.M., Da Silva, G.A., Cardozo, A.M., Santos, A.R. 2012. Antinociceptive effects of a chloroform extract and the alkaloid dicentrine isolated from fruits of *Ocotea puberula*. *Planta Medica* 78: 1543-1548. <https://doi.org/10.1055/s-0032-1315026>
9. Madubanya, L.A., Jager, A.K., Makunga, N.P., Geldenhuys, C.J., Staden, J.V., Meyer, J.J.M. 2005. DNA fingerprinting and anti-inflammatory activity of *Ocotea bullata* bark from different locations. *South African Journal of Botany* 71: 38-44. [https://doi.org/10.1016/S0254-6299\(15\)30146-0](https://doi.org/10.1016/S0254-6299(15)30146-0)
10. Cruvinel, W.M., Mesquita Junior, D., Araújo, J.A.P., Catelan, T.T.T., De Souza, A.W.S., Da Silva, N.P., Andrade, L.E.C. 2010. Sistema Imunitário –Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. *Revista Brasileira de Reumatologia* 50: 434-461. <http://dx.doi.org/10.1590/S0482-50042010000400008>
11. Ricciotti, E., FitzGerald, G.A. 2011. Prostaglandins and Inflammation. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 31: 986-1000. <https://dx.doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.207449>
12. Mena, P., Domínguez-Perles, R., Gironés-Vilaplana, A., Baenas, N., García-Viguera, C., Villaño, D. 2014. Flavan-3-ols, anthocyanins, and inflammation. *IUBMB Life* 66: 745-758. <https://doi.org/10.1002/iub.1332>
13. Pan, Y., He, C., Wang, H., Ji, X., Wang, K., Lui, P. 2010. Antioxidant activity of microwave-assisted extract of *Buddleia officinalis* and its major active component. *Food Chemistry* 121: 497-

502. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.12.072>

14. Formagio, A.S.N., Volobuff, C.R.F., Santiago, M., Cardoso, C.A.L., Vieira, M.C., Pereira, V.P. 2014. Evaluation of antioxidant activity, total flavonoids, tannins and phenolic compounds in *Psychotria* leaf extracts. *Antioxidants* 3: 745-757. <https://dx.doi.org/10.3390/antiox3040745>

15. Jayaprakasha, G.K., Singh, R.P., Sakariah, K.K. 2001. Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models *in vitro*. *Food Chemistry* 73: 285–290. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00298-3](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00298-3)

16. Kaur, C., Kapoor, H.C. 2002. Antioxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. *International Journal of Food Science & Technology* 37: 153–161. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.2002.00552.x>

17. Henriques, M.G., Silva, P.M., Martins, M.A., Flores, C.A., Cunha, F.Q., Assreuy-Filho, J., Cordeiro, R.S. 1987. Mouse paw edema. A new model for inflammation?. *Brazilian Journal Medicinal and Biological Research* 20: 243-249.

18. Decosterd, I., Woolf, C.J. 2000. Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. *Pain* 87: 149–158. [https://doi.org/10.1016/S0304-3959\(00\)00276-1](https://doi.org/10.1016/S0304-3959(00)00276-1)

19. Velo, G. P., Dunn, C.J., Giroud, J. P., Timsit, J., Willoughby, D. A. 1973. Distribution of prostaglandins in inflammatory exudate. *The Journal of Pathology* 111: 149–158. <https://doi.org/10.1002/path.1711110302>

20. Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

21. Redko, F., Clavin, M.L., Weber, D., Ranea, F., Anke, T., Martino, V. 2007. Antimicrobial Isoflavonoids from *Erythrina crista galli* Infected with *Phomopsis* sp. *Z Naturforsch C.*, 62: 164-168.

22. Chen, Y., Zhang, X., Guo, Q., Liu, L., Li, C., Cao, L., Qin, Q., Zhao, M., Wang, W. 2018. Effects of UV-B Radiation on the Content of Bioactive Components and the Antioxidant Activity of



*Prunella vulgaris* L. Spica during Development. *Molecules* 23: 989.  
<http://dx.doi.org/10.3390/molecules23050989>

23. Yamaguchi, K.K.L., Alcantara, J.M., Junior Veiga, V.F. 2012. Investigação do potencial antioxidante e anticolinesterásico de 20 espécies da família Lauraceae. *Acta Amazonica* 42: 541-546. <http://dx.doi.org/10.1590/S0044-59672012000400012>

24. Tavares, L., Carrilho, D., Tyagi, M., Barata, D., Serra, A.T., Duarte, C.M., Duarte, R.O., Feliciano, R.P., Bronze, M.R., Chicau, P., Espírito-Santo, M.D., Ferreira, R.B., Dos Santos, C.N. 2010. Antioxidant Capacity of Macaronesian Traditional Medicinal Plants. *Molecules* 15: 2576-2592. <https://doi.org/10.3390/molecules15042576>

25. Gontijo, D.C., Brandão, G.C., Gontijo, P.C., De Oliveira, A.B., Diaz, M.A.N., Fietto, L.G., Leite, J.P.V. 2017. Identification of phenolic compounds and biologically related activities from *Ocotea odorifera* aqueous extract leaves. *Food Chemistry* 1: 618-626. [https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.087\\_](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.087_)

26. Da Silva, J.K., Da Trindade, R., Moreira, E.C., Maia, J.G.S., Dosoky, N.S., Miller, R.S., Cseke, L.J., Setzer, W.N. 2017. Chemical diversity, biological activity, and genetic aspects of three *Ocotea* species from the Amazon. *International Journal Molecular Sciences* 18: 2-15. [https://doi.org/10.3390/ijms18051081\\_](https://doi.org/10.3390/ijms18051081_)

27. Cansian, R. L., Mossi, A.J., Paroul, N., Toniazzo, G., Zboralski, F., Prichoa, F.C., Kubiak, G.B., Lerin, L.A. 2010. Atividade antioxidante e antimicrobiana de extratos de canela-sassafrás (*Ocotea odorifera* (VELL.) ROWHER). *Perspectiva* 134: 123-133.

28. Dharmasiri, M.G., Jayakody, J.R., Galhena, G., Liyanage, S.S., Ratnasooriya, W.D. Anti-inflammatory and analgesic activities of mature fresh leaves of *Vitex negundo*. 2003. *Journal of Ethnopharmacology* 87: 199-206. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(03\)00159-4](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(03)00159-4)

29. De Toni, L.G., Menaldo, D.L., Cintra, A.C., Figueiredo, M.J., De Souza, A.R., Maximiano, W.M., Jamur, M.C., Souza, G.E., Sampaio, S.V. 2015. Inflammatory mediators involved in the paw edema and hyperalgesia induced by Batroxase, a metalloproteinase isolated from *Bothrops atrox* snake venom. *International Immunopharmacology* 28: 199-207. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2015.06.001>

30. Di Rosa, M., Giroud, J.P., Willoughby, D.A. 1971. Studies on the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. *The Journal of Pathology* 104: 15-29. <https://doi.org/10.1002/path.1711040103>
31. Verdrengh, M., Jonsson, I.M., Holmdahl, R., Tarkowski, A. 2003. Genistein as an anti-inflammatory agent. *Inflammation Research* 52: 341-346. <https://doi.org/10.1007/s00011-003-1182-8>
32. Kao, T.H., Wu, W.M. Hung, C.F, Wu, W.B, Chen, B.H. 2007. Anti-inflammatory effects of isoflavone powder produced from soybean cake. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55: 11068-79. <https://doi.org/10.1021/jf071851u>
33. Duan, W., Kuo, I.C, Selvarajan, S., Chua, K.Y, Baía, B.H, Wong, W.S. 2003. Anti-inflammatory effects of genistein, a tyrosine kinase inhibitor, on a guinea pig model of asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 167: 185–192. <https://doi.org/10.1164/rccm.200205-420OC>
34. Yu, J., Bi, X., Yu, B., Chen, D. Isoflavones: anti-inflammatory benefit and possible caveats. *Nutrients* 8: 2-16. <https://doi.org/10.3390/nu8060361>
35. Danciu, C. Soica, C. Csanyi, E. Ambrus, R. Feflea, S. Peev, C. Dehelean C. 2012. Changes in the anti-inflammatory activity of soy isoflavonoid genistein versus genistein incorporated in two types of cyclodextrin derivatives. *Chemistry Central Journal* 6: 2-10. <https://dx.doi.org/10.1186/1752-153X-6-58>
36. Hamalainen, M., Nieminen, R., Vuorela, P., Heinonen, M., Moilanen, E. 2007. Anti-inflammatory effects of flavonoids: genistein, kaempferol, quercetin, and daidzein inhibit STAT-1 and NF-kappaB activations, whereas flavone, isorhamnetin, naringenin, and pelargonidin inhibit only NF-kappaB activation along with their inhibitory effect on iNOS expression and NO production in activated macrophages. *Mediators Inflammation*: 1-10. <https://dx.doi.org/10.1155/2007/45673>
37. Sutrisno, S., Maryiani, M., Herawati, I., Rinata, E., Jehanara, J., Yueniwati, Y., Nurdiana, N., Noorhandani, N., Santoso, S. 2014. The effects of genistein as anti-inflammatory and

antiangiogenesis in primary endometriosis cell culture. *Asian Pacific Journal Reproduction*. 3: 299-304. [https://doi.org/10.1016/S2305-0500\(14\)60043-9](https://doi.org/10.1016/S2305-0500(14)60043-9)

38. Gobbo-Neto, L.; Lopes, N.P. 2007. Plantas Mediciniais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova* 30: 374-381.

## 6. CONCLUSÃO GERAL

De acordo com dados obtidos no estudo, os extratos metanólicos obtidos das folhas de *O. minarum* possuem potenciais antioxidantes nos ensaios testados, incluindo radical DPPH e  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico, quando comparado ao composto antioxidante convencional, BHT. Além disso, mostraram serem capazes de atuar como agentes anti-inflamatórios, reduzindo o edema de pata e inibindo a migração leucocitária. Entretanto, a atividade de maior evidência foi demonstrada no extrato das folhas coletadas no ano de 2018, sendo possível o isolamento de flavonoides. Em parte, os flavonoides isolados do extrato podem ser atribuídos as atividades relatadas. O maior conteúdo de metabolitos secundários no extrato de 2018, deve-se a fatores ambientais, por exemplo, estresse hídrico, umidade relativa e temperatura que interferem na composição e estabilização dos compostos.