



**COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DO
ÓLEO ESSENCIAL OBTIDO DAS FOLHAS E CASCAS DA
Nectandra lanceolata NEES (LAURACEAE) COLETADA NO
ESTADO DE MATO GROSSO DO SUL**

Acadêmica: **Érica Rodrigues Costa**

Orientador: **Prof.Dr. Euclésio Simionatto**

“Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Recursos Naturais, área de concentração em Recursos Naturais, da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Recursos Naturais”.

Dourados - MS

Março/2016

FICHA CATALOGRÁFICA

Costa, Érica Rodrigues

Composição química e atividade biológica do óleo essencial obtido das folhas e cascas da *Nectandra lanceolata* Nees (Lauraceae) coletada na região sul do estado de Mato Grosso do Sul

Érica Rodrigues Costa. Dourados: UEMS, 2016.

nº 90 de páginas, centímetros do trabalho

Dissertação (Mestrado) – Pós Graduação em Recursos Naturais – UEMS, 2015.

Orientador: Prof. Dr. Euclésio Simionatto

1. Óleos voláteis 2. Constituintes Químicos 3. Canela Branca
CDD



Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul

Unidade Universitária de Dourados

Programa de Pós- Graduação em Recursos Naturais

Folha de aprovação





Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul

Unidade Universitária de Dourados

Programa de Pós- Graduação em Recursos Naturais

DEDICATÓRIA

“Aos meus pais, pelo carinho e incentivo e apoio de sempre.”



AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Euclésio Simionatto, pela orientação, paciência, amizade e por todo conhecimento transmitido.

Ao professor Dr. Rogério César Lara da Silva pela disponibilidade e assistência nas análises.

A professora Dra. Claudia Andrea Lima Cardoso (UEMS), pelas análises cromatográficas.

A professora Dra. Maria de Fatima Cepa Matos (UFMS), pelos testes biológicos.

Ao professor Dr. Etenaldo Felipe Santiago (UEMS) e seu grupo de pesquisa, pela identificação da espécie.

Aos professores Rogério, Silvia, Claudia e Kelly, por aceitarem fazer parte da banca examinadora.

A todos os professores e funcionários da UEMS e PGRN por toda contribuição durante o desenvolvimento do trabalho.

A CAPES pelo apoio financeiro.

Aos meus familiares por estarem sempre ao meu lado me incentivando.

Ao meu namorado Rodrigo Messias por todo amor, paciência e apoio.

Aos amigos e colegas de Laboratório: Elisandra Oliveira, Cleber Langallaite, Gabriela Moessa, Marcia Cabral, Jaqueline Cândido, Valdete da Silva, Viviane Mallmann, Débora de Freitas, Tiziana Medeiros, Sônia Ávila, Eduardo Felipe de Carli, pela leveza e alegria que trouxeram aos meus dias, e pela ajuda durante o desenvolvimento da pesquisa.

Aos demais amigos, Maycon dos Santos, Andrielly Cioca, Daniela Bronzatti e Manu Guimarães, pelo apoio de sempre.



EPÍGRAFE

“É melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota.”

(Theodore Roosevelt)

COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DO ÓLEO ESSENCIAL OBTIDO DAS FOLHAS E CASCAS DA *Nectandra lanceolata* NEES (LAURACEAE) COLETADA NO ESTADO DE MATO GROSSO DO SUL

RESUMO

O presente trabalho consiste em extrair e caracterizar quimicamente o óleo essencial da espécie conhecida popularmente como canela branca, *Nectandra lanceolata*, coletada no estado de Mato Grosso do Sul, pertencente à família Lauraceae constituída por 52 gêneros e aproximadamente 3000 espécies. A extração do óleo essencial (OE) das folhas e cascas da planta foi realizada através do processo de hidrodestilação com aparelho Clevenger. O óleo essencial das folhas e cascas foi submetido à análise antioxidante por DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo), porém foram considerados ineficientes como sequestradores de radicais livres. A identificação e quantificação dos constituintes foram realizadas por meio de análises cromatográficas em Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas e ao detector de ionização em chama (CG-EM e CG-DIC) e também foi realizado o cálculo do índice de Kovats (IK), possibilitando a identificação de 91,03% do OE das folhas entre os majoritários destacam-se os compostos sesquiterpenos biciclogermacreno (18,21%), espatulenol (16,91%), cariofileno (12,45%), β -bourboneno (5,96%), e 92,19% do OE das cascas, dentre os principais constituintes identificados, os monoterpenos, α -pineno (7,87%) e limoneno (3,68%) e os sesquiterpenos guaiol (13,18%) e α -eudesmol (7%), a análise química dos óleos permitiu verificar grande variação qualitativa e quantitativa de seus constituintes. Através do fracionamento por meio da Cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) foi possível o isolamento do composto guaiol, majoritário para o OE da casca, e γ -patchouleno para o OE da folha. Para confirmação estrutural do composto γ -patchouleno foi realizada a técnica de RMN ^{13}C e ^1H . A atividade antimicrobiana foi realizada para ambos os OE, por meio do método de disco difusão em ágar, contra a bactéria *Acinetobacter baumannii*, entretanto na triagem prévia somente o OE das cascas se mostrou ativo contra a bactéria. Foi realizado em seguida com este OE o teste de Concentração inibitória mínima (CIM), o OE apresentou fraca atividade antibacteriana (CIM 1800 $\mu\text{g/mL}$). Os OE também foram testados quanto a inibição total do crescimento de nove linhagens de células, o OE das cascas mostrou melhores atividades na inibição total do crescimento das células de leucemia (14,6 $\mu\text{g/mL}$) e glioma (37,3 $\mu\text{g/mL}$). Portanto os óleos voláteis estudados demonstraram diferenças importantes em sua composição química e conseqüentemente, diferentes respostas aos testes biológicos.

PALAVRAS-CHAVE: óleo volátil, constituintes químicos, *Nectandra lanceolata*.

CHEMICAL COMPOSITION AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF ESSENTIAL OIL OBTAINED FROM LEAVES AND THE BARK OF *Nectandra lanceolata* NEES (LAURACEAE) COLLECTED AT THE STATE OF MATO GROSSO DO SUL

ABSTRACT

This work consists of extracting and chemically characterize the essential oil of the species known popularly as “canela branca”, *Nectandra lanceolata* Nees collected in Mato Grosso do Sul state belonging to the Lauraceae family. The extraction of the essential oil (EO) from the leaves and bark of the plant was carried out by hydrodistillation with the Clevenger apparatus process. The OE leaves and bark were subjected to analysis by DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) antioxidant, but were considered inefficient as free radical scavengers. The identification and quantification of constituents were performed by chromatographic analysis in gas chromatography coupled to mass spectrometer and the ionization detector flame (GC-MS and GC-FID) and it was also performed the calculation and Kovats indices (IK), enabling the identification of 91.03% of the essential oil from leaves between the main highlights are the sesquiterpenes compounds, bicyclogermacrene (18.21%), spathulenol (16.91%), caryophyllene (12.45%), β -bourboneno (5,96%), and 92.19% of essential oil from the bark, among the main constituents identified, the monoterpenes, α -pinene (7.87%) and limonene (3.68%) and sesquiterpenes guaiol (13.18%) and α -eudesmol (7%), the chemical analysis of oils has shown great qualitative and quantitative change of its constituents. By fractionating by thin layer chromatography preparative (CCD) was possible to isolate the compound guaiol, the majority compound of the bark essential oil and γ -patchouleno for the leaves essential oil. For structural confirmation of γ -patchouleno was used at ^{13}C NMR and ^1H NMR. The antimicrobial activity was performed for both oils through the disc agar diffusion method, against the bacteria *Acinetobacter baumannii*, however in previous screening only the OE of the bark proved active against bacteria. It was done then with this essential oil the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) test, the oil showed weak antibacterial activity (MIC 1800 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). The oils were also tested for total inhibition of growth of nine cell lines, the bark essential oil showed better activities in complete inhibition of growth of leukemia cells (14.6 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) and glioma (37.3 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). Therefore, the volatile oils studied showed significant differences in their chemical composition and thus different responses to biological testing.

Key Words: essential oil, chemical constituent, *Nectandra lanceolata*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Unidade de isopreno, C5 (1) monoterpenos, C10 (2) sesquiterpenos, C15 (3) e fenilpropanóides (4).....	22
Figura 2. Espécie <i>Nectandra lanceolata</i> Nees	34
Figura 3. Extrator Clevenger adaptado	35
Figura 4. Óleos Essenciais da espécie <i>Nectandra lanceolata</i> , (F) folhas e (C) cascas.....	35
Figura 5. Cromatógrafo á gás com detector de ionização em chama	36
Figura 6. Cromatógrafo á gás acoplado ao espectrômetro de massas.....	37
Figura 7. Cuba cromatográfica	38
Figura 8. Fórmula para cálculo do Índice de Kovats	39
Figura 9. Perfil cromatográfico do óleo essencial obtido das folhas da <i>N. lanceolata</i> , coluna ZB5 40m (0,25 mm x 0,25 µm), fase estacionária 5% fenil e 95% dimetilpolisiloxano.	43
Figura 10. Perfil cromatográfico do óleo essencial obtido das cascas da <i>N. lanceolata</i> , coluna ZB5 40m (0,25 mm x 0,25 µm), fase estacionária 5% fenil e 95% dimetilpolisiloxano.	43
Figura 11. Perfil cromatográfico do óleo essencial obtido das folhas da <i>N. lanceolata</i> por CG-DIC, coluna 100% polietilenoglicol.....	44
Figura 12. Perfil cromatográfico do óleo essencial obtido das cascas da <i>N. lanceolata</i> por CG-DIC, coluna 100% polietilenoglicol.	44
Figura 13. Perfil cromatográfico do óleo essencial obtido das folhas da <i>N. lanceolata</i> por CG-EM.....	45
Figura 14. Perfil cromatográfico do óleo essencial obtido das cascas da <i>N. lanceolata</i> por CG-EM.....	45
Figura 15. Perfil cromatográfico obtido por CCD para óleo das folhas (a) e cascas (b) da <i>Nectandra lanceolata</i>	49
Figura 16. Fracionamento do óleo bruto das folhas por CCDP	50
Figura 17. Cromatograma obtido do óleo essencial das folhas por CG-EM para fração 5..	50
Figura 18. Fracionamento do óleo bruto das cascas da <i>N. lanceolata</i> por CCDP.....	51
Figura 19. Cromatograma obtido do óleo essencial das cascas por CG-EM para fração 3(a) e 7(b)	51
Figura 20. Cromatograma obtido do óleo essencial das cascas por CG-EM para fração 5.	52

Figura 21. Cromatograma do composto isolado do óleo essencial das folhas com índice de Kovats 1513.....	52
Figura 22. Espectro obtido por CG-EM para o composto isolado do óleo essencial das folhas.....	53
Figura 23. Espectro de RMN ¹³ C obtido para fração 4 do óleo essencial das folhas..	53
Figura 24. Espectro de DEPT-135 para fração 4 do óleo essencial das folhas.....	54
Figura 25. Espectro de ¹ H obtido por RMN para fração 4 do óleo essencial das folhas.....	54
Figura 26. Estrutura do γ -patchouleno, sesquiterpeno isolado do óleo das cascas de <i>Nectandra lanceolata</i>	55
Figura 27. Teste da atividade antimicrobiana dos óleos por disco-difusão	56
Figura 28. Teste da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos OE pelo método de microdiluição em placa	57
Figura 29. Cromatograma do óleo bruto da casca (<i>N. lanceolata</i>).....	63
Figura 30. Cromatograma da fração 1, LC1C	63
Figura 31. Cromatograma da fração 2, LC2C	63
Figura 32. Cromatograma da fração 3, LC3C	64
Figura 33. Cromatograma da fração 4, LC4C	64
Figura 34. Cromatograma da fração 5, LC5C	64
Figura 35. Cromatograma da fração 6, LC6C	65
Figura 36. Espectros (a, b,c) dos principais compostos da fração 1, LC1C.....	65
Figura 37. Espectros (a, b) dos principais compostos da fração 2, LC2C	66
Figura 38. Espectros (a, b, c) dos principais compostos da fração 3, LC3C.....	66
Figura 39. Espectros (a, b) dos principais compostos da fração 4, LC4C	67
Figura 40. Espectros (a, b, c, d, e) dos principais compostos da fração 5, LC5C	68
Figura 41. Espectros (a, b, c, d) dos principais compostos da fração 6, LC6C.....	69
Figura 42. Cromatograma obtido por CG-EM para fração 1 do OE das folhas.....	88
Figura 43. Espectro obtido por CG-EM para fração 1 do OE das folhas	88
Figura 44. Cromatograma obtido por CG-EM para fração 2 do OE das folhas.....	89
Figura 45. Espectro obtido por CG-EM para fração 2 dos OE das folhas	89
Figura 46. Cromatograma obtido por CG-EM para fração 3 do OE das folhas.....	89
Figura 47. Espectro obtido por CG-EM para fração 3 do OE das folhas	89
Figura 48. Espectro obtido por CG-EM para fração 5 do OE das folhas	90



Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul

Unidade Universitária de Dourados

Programa de Pós- Graduação em Recursos Naturais



LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Nomenclatura dos terpenos por unidade de isopreno	20
Tabela 2. Linhagens celulares utilizadas nos testes de atividade antitumoral.....	41
Tabela 3. Rendimento dos óleos essenciais.....	42
Tabela 4. Constituintes químicos do óleo essencial das folhas da <i>Nectandra lanceolata</i> ...	46
Tabela 5. Constituintes Químicos das cascas da <i>Nectandra lanceolata</i>	47
Tabela 6. Diâmetro dos halos de inibição pela técnica de disco-difusão.....	56
Tabela 7. Valores de TGI* ($\mu\text{g}/\text{mL}$) dos óleos de folhas e cascas de <i>N. Lanceolata</i>	59
Tabela 8. Quantidade de óleo nas frações, resultantes do fracionamento do óleo das cascas de <i>N. lanceolata</i> (quantidades obtidas por placa em mg)	61
Tabela 9. Valores de GI50 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) em linhagem de células tumorais 786-0 e HT-29 e em células não tumorais NIH/3T3.....	61
Tabela 10. Valores de TGI ($\mu\text{g}/\text{mL}$) das frações do óleo das folhas contra linhagens de células tumorais 786-0 e HT-29 e em células não tumorais NIH/3T3.....	62



LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg: microgramas

a.C: Antes de Cristo

AcEt: Acetato de Etila

AH: Ação Antioxidante

atm: atmosfera

C: Carbono

CCD: Cromatografia em Camada Delgada

CCDP: Cromatografia em Camada Delgada Preparativa

CG: Cromatografia Gasosa

CIM: Concentração Inibitória Mínima

cm⁻¹: centímetros⁻¹

CO₂: Dióxido de Carbono

Col: Colaboradores

DIC: Detector de Ionização em Chama

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazila

Dr: Doutor

Dra: Doutora

EM: Espectrômetro de Massas

g: gramas

H: Hidrogênio

h: horas

He: Hélio

IK: Índice de Kovats

ISO: International Organization for Standardization

Kg: kilogramas

L: litros

LPCS: Laboratório de Pesquisa em Ciências da Saúde

m/z: relação massa/carga elétrica

m: metros

mg: miligramas



min: minutos

mL: Mililitros

mmol: milimol

MS: Mato Grosso do Sul

NCI: Instituto Nacional do Câncer

NIST: National Institute of Standard Technology

N: *Nectandra*

n: número

Na₂SO₄: Sulfato de sódio

nm: nanômetros

°C: Graus Celsius

OE : Óleos Essenciais

OMS: Organização Mundial da Saúde

ppm: partes por milhão

Prof: Professor (a)

RF: tempo de retenção

RMN: Ressonância Magnética Nuclear

RMN de ¹³C: Ressonância magnética nuclear de carbono 13

RMN de ¹H: Ressonância magnética nuclear de hidrogênio

SRB: Sulforrodamina B

TR: Tempo de Retenção

UEMS: Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul

UFC: Unidade Formadora de Colônia

UFGD: Universidade Federal da Grande Dourados

UFMS: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

UV: Ultra Violeta



Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul

Unidade Universitária de Dourados

Programa de Pós- Graduação em Recursos Naturais



SUMÁRIO

1	<u>INTRODUÇÃO</u>	<u>18</u>
2	<u>OBJETIVOS GERAIS</u>	<u>19</u>
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
3	<u>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</u>	<u>20</u>
3.1	ÓLEOS ESSENCIAIS.....	20
3.2	EXTRAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS.....	22
3.2.1	HIDRODESTILAÇÃO.....	23
3.2.2	EXTRAÇÃO POR SOLVENTES ORGÂNICOS.....	23
3.2.3	DESTILAÇÃO Á VAPOR	23
3.2.4	ARRASTE POR VAPOR D'ÁGUA.....	24
3.2.5	EXTRAÇÃO POR FLUIDO SUPERCRÍTICO.....	24
3.2.6	ENFLORAÇÃO.....	25
3.2.7	PRENSAGEM A FRIO.....	25
3.3	TÉCNICAS PARA IDENTIFICAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS.....	26
3.4	TESTES BIOLÓGICOS COM ÓLEOS ESSENCIAIS	27
3.4.1	ANTIMICROBIANOS	27
3.4.2	ANTITUMORAL.....	28
3.5	IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS	29
3.6	FUNÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS NAS PLANTAS.....	29
3.7	PLANTAS MEDICINAIS.....	30
3.8	FAMÍLIA LAURACEAE.....	31
3.8.1	GÊNERO <i>NECTANDRA</i>	32
3.8.2	ESPÉCIE <i>NECTANDRA LANCEOLATA</i>	33
4	<u>MATERIAIS E MÉTODOS.....</u>	<u>34</u>
4.1	MATERIAL VEGETAL	34
4.2	TESTE DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DO RADICAL LIVRE (DPPH)	35
4.3	ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS	36
4.3.1	CROMATOGRAFIA A GÁS ACOPLADA A DETECTOR DE IONIZAÇÃO DE CHAMA (CG-DIC)	36
4.3.2	CROMATOGRAFIA A GÁS COM DETECÇÃO POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG-EM)	37
4.3.3	CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)	37
4.3.4	IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS	38
4.4	RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN).....	39
4.5	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	39
4.6	ATIVIDADE ANTITUMORAL IN VITRO.....	40
5	<u>RESULTADOS E DISCUSSÃO</u>	<u>41</u>

5.1	RENDIMENTO	41
5.2	ANÁLISE ANTIOXIDANTE (DPPH)	42
5.3	ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS	43
5.3.1	CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA AO DETECTOR DE IONIZAÇÃO EM CHAMA (CG-DIC).....	43
5.3.2	CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA AO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS (CG-EM)	45
5.4	IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS	46
5.4.1	CONSTITUINTES QUÍMICOS FOLHAS.....	46
5.4.2	CONSTITUINTES QUÍMICOS CASCAS	47
5.5	CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)	49
5.5.1	CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA PREPARATIVA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS	49
5.5.2	CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA PREPARATIVA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS CASCAS	50
5.6	RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)	52
5.6.1	ATRIBUIÇÃO DO COMPOSTO ISOLADO: SESQUITERPENO γ -PATCHLOULENO.....	52
5.7	ANÁLISE ANTIMICROBIANA	55
5.8	ANÁLISE ANTITUMORAL	59
5.8.1	ANÁLISE ANTITUMORAL <i>IN VITRO</i> DOS ÓLEOS DE FOLHAS E CASCAS DE <i>N. LANCEOLATA</i>	59
5.8.2	FRACIONAMENTO DO ÓLEO DA CASCA E ENSAIOS ANTITUMORAIS	60
6	<u>CONCLUSÃO</u>	70
7	<u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	72
8	<u>APÊNDICE</u>	88

1 INTRODUÇÃO

No que se refere ao mercado de óleos essenciais, observa-se que constitui uma forte atividade econômica, isto é confirmado quando observamos o grande crescimento no cultivo de espécies aromáticas, utilizadas como fontes de matérias primas para a utilização industrial. Dentro de temas que tratam da utilização dos componentes de óleos essenciais, encontramos uma vasta gama de aplicações, envolvendo desde utilização em perfumes e fragrâncias até emprego em condimentos alimentares e produtos farmacêuticos. As pesquisas desenvolvidas nesta área incluem temas diversificados como: controle de qualidade de produtos utilizados como alimentos como, por exemplo, sucos de frutas [46,47], elucidação das propriedades biológicas de óleos essenciais visando o descobrimento de novos agentes antimicrobianos [48] e estudos que envolvem interações planta-inseto e planta-planta (alelopatia) [49,50].

Devido ao grande interesse nesta área de pesquisas, observou-se na última década o desenvolvimento de novas e mais modernas técnicas de análises, como o aprimoramento dos métodos cromatográficos de análise de componentes voláteis dos óleos essenciais.

Os óleos essenciais são importantes fontes renováveis de matéria-prima para setores da indústria oleoquímica, pois oferecem um grande número de materiais diversificados e de baixo custo. Estes fatores tornam os óleos essenciais materiais de partida de grande importância econômica, tecnológica e científica. O isolamento de novas moléculas orgânicas pertencentes às classes dos monoterpenos, sesquiterpenos e eventualmente diterpenos, tem sido possível através do estudo com óleos voláteis. As plantas aromáticas são objeto de vastos estudos, devido ao interesse em suas aplicações terapêuticas e benefícios. Os efeitos biológicos dos óleos dependem dos princípios ativos que compõem a fração volátil das espécies, entre estes compostos, os terpenóides voláteis, têm mostrado especial interesse, devido a grande variedade de propriedades biológicas exibidas por representantes deste grupo de produtos naturais [51]. Por estas características os terpenos naturais são considerados importantes materiais de partida para síntese de flavours, fragrâncias, produtos farmacêuticos e agentes de biocontrole.

Problemas ambientais causados pelo uso excessivo de pesticidas, aliados a pressão por parte dos consumidores para reduzir o uso de aditivos químicos sintéticos em alimentos, tem causado o interesse e impulsionado pesquisas a fim de desenvolver métodos alternativos de

controle de pestes ou pragas. Plantas com propriedades pesticidas são algumas das alternativas a serem utilizadas no controle de patógenos [52,53]. Os óleos essenciais, extratos e substâncias isoladas têm sido extensivamente estudados com relação a suas atividades fungicidas e pesticidas, e avaliados quanto seu potencial de uso no controle de patógenos em alimentos, e como agroquímicos [54].

O fato de muitos destes produtos serem caracterizados por uma vasta gama de compostos voláteis, muitos dos quais substâncias com importante função na qualidade de aroma (“flavour”) do alimento é mais um fator que provoca interesse por substâncias aromáticas [55]. Muitos mecanismos de ação têm demonstrado que, quando submetidas a situações adversas como, por exemplo, o ataque de microorganismos patogênicos, a planta reage produzindo substâncias para combater estes organismos invasores. Desta forma, os óleos voláteis e seus constituintes isolados tem sido testados quanto a sua potencialidade de aplicação como agentes antifúngicos e antimicrobianos naturais [55,56].

O Pantanal, o Cerrado e outros Biomas existentes em Mato Grosso do Sul, ricos em biodiversidade, representam um grande potencial de exploração para a obtenção de produtos vegetais úteis, com propriedades químicas ainda não conhecidas. Portanto neste trabalho foram estudados óleos essenciais extraídos das folhas e cascas da espécie *Nectandra lanceolata* Nees (Lauraceae) coletada na região Sul do estado de Mato Grosso do Sul, destacando que se trata de **uma** espécie inédita.

2 OBJETIVOS GERAIS

- ✓ Extração do óleo essencial das folhas e cascas da espécie *Nectandra lanceolata* Nees (Lauraceae) por hidrodestilação.
- ✓ Caracterização Química dos óleos essenciais
- ✓ Testes Biológicos com os óleos brutos, frações e compostos purificados.

2.1 *Objetivos específicos*

- ✓ Identificação dos constituintes químicos dos óleos essenciais por CG-EM, CG-DIC e cálculo do índice de Kovats (IK).
-

- ✓ Fracionamento do óleo bruto do óleo essencial das folhas e cascas por cromatografia em camada delgada preparativa.
- ✓ Análise da atividade antimicrobiana do óleo essencial bruto pelos testes de disco difusão em ágar e concentração inibitória mínima (CIM).
- ✓ Análise antitumoral do óleo essencial bruto e das frações.
- ✓ Análise estrutural de compostos puros por ressonância magnética nuclear (RMN).

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Óleos Essenciais

Óleos voláteis também chamados de OE constituem-se de uma mistura complexa de substâncias voláteis, de viscosidade semelhante à de óleos, insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos [1].

A ISO (International Organization for Standardization) define óleo essencial como: “um produto obtido por destilação em água ou vapor, por destilação seca de materiais naturais ou por processos mecânicos de extração de pericarpos de frutos cítricos. Após a destilação o óleo essencial é fisicamente separado de fase aquosa” [2]. Sendo que na literatura são citadas outras formas de extração de OE nas plantas dentre elas, extração com solventes orgânicos, enfloração, prensagem ou utilização de CO₂ supercrítico. Em função do método de extração utilizado haverá variação na composição do óleo obtido [3,4].

As principais características de um óleo essencial são sua fragrância e suas atividades antimicrobianas e antioxidantes, portanto, são largamente utilizados em indústrias de perfume, de aditivos naturais para aromatizar alimentos, indústrias farmacêuticas, por conter estruturas fenólicas que o tornam ativo contra microrganismos e em indústrias de cosméticos [9].

Quimicamente a grande maioria dos óleos é constituída de derivados fenilpropanóides ou de terpenoides, de acordo com a origem biossintética, sendo que os últimos preponderam. Os compostos terpênicos são constituídos de duas ou mais moléculas de isopreno (Tabela 1).

Tabela 1. Nomenclatura dos terpenos por unidade de isopreno

Átomos de Carbono	Unidade de Isopreno	Nomenclatura
10	2	Monoterpenos

15	3	Sesquiterpenos
20	4	Diterpenos
25	5	Sesterterpenos
30	6	Triterpenos
40	8	Tetraterpenos

Monoterpenos - são as moléculas de maior abundância nos OE, representando cerca de 90% dos constituintes, formados pela justaposição de duas unidades isoprênicas. O composto comum para formação dos monoterpenos é o pirofosfato de geranila (GPP), com uma ligação dupla, o que possibilita reações com formação de isômeros, gerando diversos tipos monoterpênicos. Podem apresentar cadeias abertas, cíclicas ou bicíclicas, oxigenadas ou não [89].

Sesquiterpenos - é uma classe de terpenos em que possui grande número de estruturas diferenciadas, todas com 3 unidades isoprênicas, podendo ser acíclicas, monocíclicas, bicíclicas ou lactonas sesquiterpênicas. Nos óleos essenciais são encontrados sesquiterpenos de cadeia cíclica não oxigenados (aromadendreno, β -cariofileno, β -elemeno) e oxigenados (espatulenol, globulol e α -cadinol). O α -bisadolol é um exemplo sesquiterpênico de um álcool monocíclico insaturado, com a hidroxila ligada ao carbono saturado, que faz parte da composição do óleo da camomila.

Os compostos mais frequentes em óleos voláteis são monoterpenos, sesquiterpenos e os fenilpropanóides (Figura 1) que caracterizam-se por serem derivados benzênicos com cadeia lateral de três átomos de carbono originados de ácidos aromáticos de carbono que por sua vez se originam do ácido chiquímico [1,5].

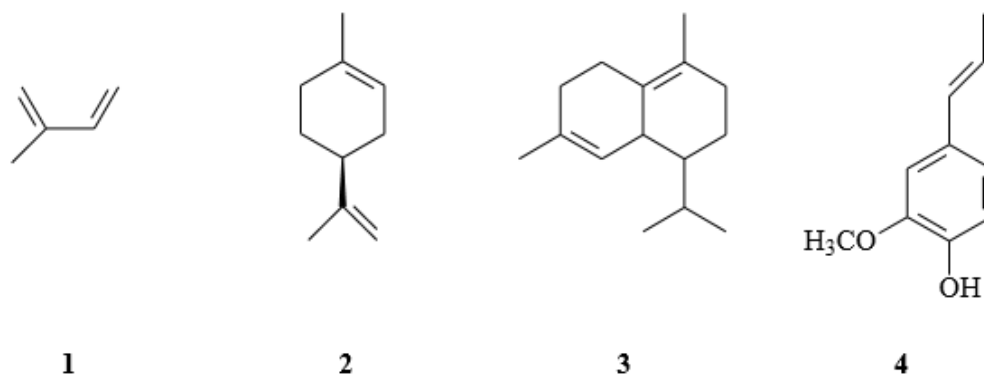


Figura 1. Unidade de isopreno, C5 (1) monoterenos, C10 (2) sesquiterpenos, C15 (3) e fenilpropanóides (4).

Fonte: Adaptado de Baser e Buchbauer, 2010.

A composição química dos OE pode ser determinada por fatores exógenos (condições de cultivo) e por fatores endógenos (características genéticas, anatômicas e fisiológicas). A exposição por um longo período de tempo aos fatores exógenos pode afetar genes responsáveis pela produção dos voláteis e levar a existência de quimiotipos ou raças químicas dentro da mesma espécie, estes quimiotipos são vegetais da mesma espécie que são botanicamente idênticos, mas que diferem quimicamente. Além disso, o estágio de desenvolvimento dos órgãos da planta também pode ser um fator determinante para a composição dos OE [7,8].

Diversas atividades de OE e de seus componentes foram comprovadas, tais como, antibacteriana, antiviral, antibiótica, antitóxigênica, antiparasitária, inseticida, analgésica, sedativa, anti-inflamatória, espamolítica, anestésica local, hipotensora, vasorrelaxante, anticonvulsão, antioxidante e anticâncer [1,23,24,25,26]

3.2 Extração dos Óleos Essenciais

Utilizam-se diferentes métodos para extração de tais óleos essenciais, devendo-se ressaltar que, dependendo do método, a composição do óleo pode variar significativamente, alguns dos métodos de extração mais utilizados são: hidrodestilação, extração por solventes orgânicos, destilação a vapor, extração por fluido supercrítico, enfloração, prensagem a frio, dentre outros. Mas para melhorar a qualidade do óleo, o rendimento e a viabilidade econômica foram feitas modificações nesses métodos e outros foram desenvolvidos, como extração subcrítica, extração por gás refrigerante, por micro-ondas e ultrassom [10,11].

Os métodos de extração variam conforme a localização do óleo essencial na planta e com a proposta de utilização do mesmo, sendo os principais métodos citados a seguir.

3.2.1 Hidrodestilação

A hidrodestilação é um método antigo e versátil no qual o material vegetal permanece em contato com a água em ebulição, o vapor força a abertura das paredes celulares e ocorre a evaporação do óleo que está entre as células da planta. O vapor, que consiste na mistura de óleo e água, passa por um condensador, onde ocorre seu resfriamento e, como os componentes voláteis e a água são imiscíveis, ocorre à formação de duas fases líquidas que podem ser separadas [12,13].

3.2.2 Extração por solventes orgânicos

Determinados tipos de óleos são muito instáveis, não suportando aumentos de temperatura. Neste caso, utilizam-se solventes orgânicos para sua extração, tais como hexano, benzeno, metanol, etanol, propanol, acetona, pentano e diversos solventes clorados, sendo que, geralmente tem-se preferência por solventes apolares, ressaltando-se que o benzeno é um dos mais utilizados. As principais características que o solvente deve ter são: a seletividade, uma baixa temperatura de ebulição, ser quimicamente inerte e possuir um baixo custo [14, 15,16].

3.2.3 Destilação á vapor

A destilação por arraste a vapor é uma operação unitária, utilizada principalmente para materiais sensíveis à temperatura, sendo baseada na diferença de volatilidade de determinados compostos presentes na matéria-prima vegetal. A indústria prefere a destilação por arraste a vapor devido à sua maior simplicidade e economia, pois permite tratar de uma única vez quantidades significativas de material vegetal [17]. Na extração por arraste a vapor, o material vegetal, de onde será extraído o óleo, é geralmente moído ou triturado [15]. Este processo utiliza uma caldeira para geração de vapor, um extrator (destilador), onde é colocada a matéria prima a ser extraída, um condensador e um frasco de coleta (vaso florentino). O vapor

é percolado através do leito de sólidos, no interior do vaso extrator, arrastando o óleo essencial. A mistura vapor-óleo segue então para o condensador, onde ocorre a mudança de fase. O condensador é alimentado no vaso florentino, onde ocorre a separação das fases, por diferenças de polaridade, já que os óleos essenciais são apolares ou pouco polares [17].

Posteriormente o óleo essencial é envasado em vidro âmbar e mantido em local abrigado de temperaturas elevadas e luminosidade [18].

3.2.4 Arraste por vapor d'água

Os óleos voláteis possuem tensão de vapor mais elevada que a da água, sendo por isso, arrastados pelo vapor d'água. Em pequena escala, emprega-se o aparelho Clevenger. O óleo volátil obtido, após separar-se da água, deve ser seco com Na_2SO_4 anidro. Existem dois tipos de extrações distintas por arraste de vapor d'água. Esta distinção é realizada pela forma da qual se estabelece o contato da amostra com a água. A primeira chamada de hidrodestilação, onde a amostra fica imersa na água numa caldeira (como descrito acima). Na segunda chamada de destilação por vapor de água, a amostra é mantida em um recipiente separado e o vapor d'água que flui provem de um gerador [63].

3.2.5 Extração por fluido supercrítico

Várias substâncias podem ser utilizadas como solventes supercríticos, tais como metano, etano e etileno, porém o CO_2 apresenta algumas características que o elegeram como uma opção diferenciada, entre elas está a facilidade de separação do soluto por ser extremamente volátil, não tóxico, não inflamável, relativamente barato e não apresenta odor [17].

A extração supercrítica baseia-se no princípio da solubilidade dos compostos orgânicos em fluidos supercríticos, em relação à solubilidade dos mesmos em fluidos na fase vapor [19]. No caso de extração utilizando CO_2 , costuma-se empregar condições onde a pressão é de até 200 atm e a temperatura é de 33°C . Nessas condições, estando o CO_2 em estado de fluido supercrítico, este recebe as partes da planta que tem o óleo extraído, nas quais age como um solvente. Após o equilíbrio entre a pressão da substância e a pressão do ambiente o CO_2 volta ao estado gasoso restando apenas o óleo essencial [20]. O CO_2 é utilizado de forma a alcançar um estado em que sua viscosidade corresponde a de um gás,

mas sua capacidade de solubilidade é igual à de um líquido [16]. Utilizando-se esse método, obtêm-se óleos essenciais de melhor qualidade e, por isso mesmo, de acentuado potencial terapêutico, uma vez que este processo mantém de forma muito significativa a integridade dos extratos em termos de compostos ativos [20].

3.2.6 Enfloração

O método de enfloração foi amplamente utilizado no passado, porém atualmente é empregado apenas para algumas indústrias de perfumes. Emprega-se este método na extração de óleos voláteis de pétalas de flores como, por exemplo, do jasmim, da laranjeira e de rosas.

Esta técnica é empregada em flores que possuem baixo teor de óleo essencial, sendo este extremamente instável, não podendo ser destilado por arraste a vapor, pois pode sofrer perdas quase completas de seus compostos aromáticos [20]. O método consiste na deposição das pétalas à temperatura ambiente sobre uma camada de gordura durante certo período de tempo. Em seguida, estas pétalas esgotadas são substituídas por novas até a saturação total, quando a gordura é tratada com álcool. Visando a obtenção de um óleo volátil, o álcool é destilado à baixas temperaturas e o produto, assim obtido, possui alto valor comercial [21]. O princípio do método de *enfleurage* está na grande capacidade da gordura absorver os constituintes voláteis emitidos pelas flores. Considera-se este processo bastante lento, complexo e caro [16].

3.2.7 Prensagem a frio

Este método é empregado para a extração dos óleos voláteis de frutos cítricos, como por exemplo, a bergamota, o limão, a grapefruit e a laranja, ressaltando-se que, no caso específico do Brasil, cuja exportação de óleos essencial de laranja é significativa, a prensagem a frio vem sendo utilizada em grande escala nas unidades de extração de suco de laranja no estado de São Paulo [16,20].

O método consiste em colocar os frutos inteiros diretamente em uma prensa hidráulica, sendo coletados o suco e o óleo presentes na casca. Posteriormente, o óleo é separado da emulsão formada com a água através de decantação, centrifugação ou destilação fracionada [20,21].

3.3 Técnicas para Identificação dos Óleos Essenciais

A Cromatografia gasosa é uma técnica que pode ser utilizada para caracterizar compostos voláteis dos óleos essenciais, por ter um alto poder de separação dos compostos existentes na amostra, essa técnica consiste num cromatógrafo a gás, equipamento composto por um injetor, coluna capilar e um detector, que é um dispositivo sensível que favorece a ionização dos constituintes da amostra, esta é injetada por micro-seringa no injetor, segue para a coluna, fase estacionária, e é arrastada por um gás, fase móvel, até chegar ao detector. [referencia]

O detector proporciona uma resposta através de um sinal elétrico proporcional à quantidade da amostra eluída pela coluna cromatográfica. Um dos primeiros detectores criados é por Ionização de Chama, mas com o avanço na área surgiram outros mais eficientes, como Espectrômetro de Massa, Infravermelho entre outras técnicas [90, 91, 92].

A cromatografia gasosa pode ser combinada com outras técnicas analíticas, como a espectrometria de massa, que é uma importante técnica qualitativa e quantitativa, fornece dados moleculares e estruturais dos compostos, por isso tem alta capacidade de diferenciação, este método permitiu obter um cromatograma com informações estruturais dos compostos através da ionização e fragmentação da molécula, estes dados são interpretados por um programa, e posteriormente comparados aos dados espectrais da biblioteca do equipamento, onde se observa o tempo de retenção de cada composto, representado pelos “picos cromatográficos”. Para uma confirmação mais confiável calcula-se o Índice de Kovats (IK) utilizando os tempos de retenção fornecidos pelo cromatograma e de uma série de hidrocarbonetos homólogos. Os valores de IK calculados são então comparados aos IK tabelados, neste momento também é observado a semelhança da fragmentação da molécula, obtida pelo EM, com o fornecido pela literatura [89, 90, 91, 92].

A ressonância magnética nuclear (RMN) também é uma técnica analítica espectroscópica, de grande importância para elucidação do esqueleto molecular de substâncias naturais, consiste na exposição de uma amostra pura ou semi-purificada à um campo eletromagnético na frequência de rádio. Os núcleos que possuem campo magnético, os mais utilizados são o ^{13}C e ^1H , entram em ressonância e absorvem essa energia, que posteriormente é liberada gerando um sinal elétrico. A frequência e a intensidade dos sinais permite obter um espectro de RMN, em que a frequência é representada pelos desvios químicos que são

expressos em ppm (parte por milhão). Os diferentes desvios químicos do espectro representam os sinais de RMN que caracterizam cada grupo químico. A análise dos diferentes espectros obtidos por RMN possibilita identificar os tipos e quantidades de grupos químicos, sendo importante ferramenta para a elucidação de estruturas moleculares de compostos voláteis [91, 92, 93, 94].

A CCD é um método simples e rápido, que utiliza uma fase estacionária e uma fase móvel. A fase estacionária consiste numa placa recoberta por sílica ou outro composto, denominada de cromatoplaça ou cromatofolha. A fase móvel é composta por um ou mais solventes e uma cuba cromatográfica. Uma pequena alíquota do óleo é espalhada de forma contínua na cromatoplaça, esta é acomodada na cuba previamente saturada com o sistema solvente para eluição da fase móvel por efeito de capilaridade. Após a cromatoplaça é retirada da cuba, e é usado um revelador físico que consiste numa câmera UV-VIS (luz ultravioleta na região do visível) propiciando a visualização de manchas de diferentes cores e posições, que representam cada composto da amostra, e um revelador químico, geralmente a vanilina, mais específico para terpenóides e fenilpropanos, onde é borrifado sobre a placa e em seguida aquecido em chapa aquecedora. Obtêm-se então um perfil cromatográfico com manchas de colorações características de cada composto e diferentes tempos de retenção (RF), que permite a identificação ou até mesmo detecção de possíveis falsificações, através de comparações com dados da literatura [64, 105, 106, 107].

3.4 Testes biológicos com Óleos essenciais

3.4.1 Antimicrobianos

Os óleos essenciais apresentam atividade contra uma ampla variedade de microrganismos: vírus, fungos, protozoários e bactérias. Os compostos e suas porcentagens presentes nos OE variam de acordo com a espécie considerada, as condições de coleta e extração, e as partes da planta utilizadas [108].

Apesar de várias estruturas químicas isoladas de produtos do metabolismo secundário das plantas exercerem alguma ação antibacteriana, a maior parte destas moléculas apresenta atividade fraca e espectro de ação limitado quando utilizadas sozinhas. Porém, ao serem combinadas entre si ou com antibióticos, podem atuar como adjuvantes, modificando a

resistência bacteriana frente determinadas drogas, diminuindo a dose necessária de antibióticos para um resultado eficaz [64].

A atividade antimicrobiana dos OE tem sido atribuída principalmente aos terpenos e derivados, sendo estes compostos capazes de interagir com diferentes moléculas alvo e funções das células bacterianas. Vários estudos têm avaliado a atividade antibacteriana destes compostos e relataram diferentes mecanismos de ação, como inibição da síntese de ácidos nucleicos, das funções da membrana citoplasmática e do metabolismo energético [52].

3.4.2 Antitumoral

O Brasil possui uma grande diversidade de espécies de plantas, entretanto, um valor inferior a 10% foram avaliadas no que diz respeito as suas características biológicas e menos de 5% foram submetidas a estudos fitoquímicos detalhados. Dentro desse universo elas são escassamente estudadas quanto à citotoxicidade em linhagens de células tumorais. Mas, esforços estão sendo realizados por pesquisadores na tentativa de explorar a natureza a procura de novas substâncias com potencial atividade anticâncer ou que melhorem a ação de compostos já existentes [109].

Os OE tem atraído considerável interesse devido a diversidade de seus constituintes bioativos, os quais desempenham um papel importante na prevenção e tratamento do câncer, mesmo com os avanços existem muitos OE que apresentam moléculas desconhecidas que podem possuir propriedades anticâncer, além disso moléculas individuais precisam ser sinteticamente modificadas para melhorar a sua atividade, cada vez mais investigações são justificadas pela ciência e comunidade médica para o desenvolvimento de protocolos de tratamentos mais eficazes, que altere a condição de vida de quem sofre com o problema [26].

O teste de citotoxicidade em cultura de células, que avalia a inibição causada pelos compostos que são analisados quanto a atividade antineoplásica, utiliza o sal de tetrazolium MTT [84]. Outro teste também muito utilizado na investigação antitumoral é da SRB, ambos são amplamente utilizados na rotina de triagem de drogas anticâncer pelo Instituto Nacional de Câncer dos Estados Unidos (NCI) [85, 86]. Uma das vantagens deste último método é a estabilidade da placa para leitura, pois as células são primeiramente fixadas, coradas e a medida da absorbância pode ser realizada por várias semanas após o término do ensaio [110].

3.5 *Importância econômica dos Óleos essenciais*

Os OE são importantes fontes renováveis de matéria-prima para setores da indústria oleoquímica, pois oferecem um grande número de materiais diversificados e de baixo custo, estes fatores tornam os OE materiais de partida de grande importância econômica, tecnológica e científica. O isolamento de novas moléculas orgânicas pertencentes às classes dos monoterpenos, sesquiterpenos e eventualmente diterpenos, tem sido possível através do estudo com óleos voláteis.

Atualmente existe um grande número de plantas conhecidas para produção de OE, o que gerou uma expressa importância econômica por serem empregadas principalmente como aromatizantes, fragrâncias, fixadores de fragrâncias, em composições farmacêuticas e comercializados em sua forma bruta ou purificada. As 18 espécies de plantas mais representativas neste mercado são a *Citrus sinensis*, *Mentha arvensis*, *Eucalyptus globulus*, *Cymbopogon winterianus*, *Mentha x piperita*, *Citrus limon*, *Eucalyptus citriodora*, *Syzygium aromaticum*, *Juniperus virginiana*, *Citrus aurantifolia*, *Mentha spicata*, *Chamaecyparis funebris*, *Lavandula intermedia*, *Cinnamomum micranthum*, *Cinnamomum camphora*, *Coriandrum sativum*, *Citrus paradise* e *Pogostemon cablin* [22].

3.6 *Função dos óleos essenciais nas plantas*

Diversas hipóteses foram levantadas ao longo dos anos para explicar a produção de OE, uma das principais propostas era que estes compostos eram de importância secundária para as funções vitais das plantas, considerados como produtos de resíduos metabólitos [57].

Esses compostos voláteis têm sua distribuição limitada no reino das plantas, a sua biossíntese é restrita em tipos de tecidos específicos e em específicos estágios de desenvolvimento, os compostos voláteis das flores são os principais responsáveis pela atração de insetos polinizadores, mas também os dispersores de sementes, talvez até mesmo estejam envolvidos na direção da co-evolução de ambos, polinizador e polinizado [58,59]. Em muitas espécies as quais não são autopolinizáveis a atração de polinizadores é absolutamente requerida para reprodução destas espécies [60]. Embora esses metabólitos não sejam requeridos para o processo do metabolismo primário como, por exemplo, a síntese de

proteínas, muitos são requeridos para a manutenção da espécie e no processo de adaptação ao meio ambiente [57].

Os óleos voláteis nas plantas também podem atuar como um mecanismo de defesa contra seus inimigos naturais, os herbívoros, exemplos desta interação entre plantas, herbívoros e parasitas têm sido descritas [57].

Alguns constituintes de OE podem atuar também na proteção de folhas e meristemas contra perda de água e aumento da temperatura, na proteção contra predadores e infestantes como é o caso do mentol e da mentona, inibidores do crescimento de vários tipos de larvas, alguns monos e sesquiterpenos, como mirceno, canfeno, α -pineno e longifoleno retardam o crescimento de fungos decompositores [61,62]. Além disso, em diversas espécies de *Salvia*, *Atemísia*, *Eucalyptus*, *Rosmarinus* e *Thymus*, foi observado o efeito alelopático de compostos presentes nos OE (como canfeno, cânfora, cineol, tujona, α e β - pineno) devido à atividade inibidora de respiração das raízes e da germinação, afetando o espaçamento entre plantas e a composição da comunidade [62].

3.7 Plantas Mediciniais

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a definição de plantas medicinais é tida como “todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, compostos que podem ser utilizados com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semissintéticos”. No início da década de 1990, a OMS divulgou que 65-80% da população dos países em desenvolvimento dependiam das plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde [72].

A produção de plantas medicinais apresenta muitas oportunidades, estende-se desde a produção e extração de óleos essenciais, indústrias de alimentos, bebidas, cosméticos, fitoterápicos, fitofármacos, corantes, entre outros, além de contribuir para a preservação das espécies [64,65]. Estas plantas atuam através de substâncias ativas, que agem fisiologicamente no organismo, podendo modificá-lo, por meio de ações terapêuticas ou profiláticas. Propicia-nos a descoberta de novos princípios ativos, para promover benefícios e evitar os males do corpo, uma planta pode conter um ou mais princípios ativos ou bioativos. Os bioativos são substâncias do metabolismo secundário das plantas, que formam diversas classes de compostos, como flavonóides, alcalóides, fenilpropanos e terpenos, sendo estes os compostos que fazem parte dos constituintes químicos dos OE obtido das plantas [64].

3.8 *Família Lauraceae*

As Lauraceas formam uma grande família de árvores e arbustos, predominantemente tropicais, com a exceção de *Cassytha*, popularmente conhecida como cipó-chumbo, uma herbácea parasita. A família está mais representada nos trópicos americanos e asiáticos, tendo também um grande número de espécies na Austrália e Madagascar, mas é pobremente representada na África. Atualmente são reconhecidos por volta de 50 gêneros e o número estimado está entre 2.500 - 3.000 espécies [27,28].

Na região neotropical ocorrem 30 gêneros da família Lauraceae, sendo que, no Brasil identificaram-se 22 gêneros. Destes, apenas 16 estão representados nos atuais remanescentes da Mata Atlântica brasileira: *Aiouea*, *Aniba*, *Beilschimidia*, *Cassytha*, *Cinnamomum*, *Cryptocarya*, *Endlicheria*, *Licaria*, *Mezilaurus*, *Nectandra*, *Ocotea*, *Persea*, *Phyllostemonodaphne*, *Rhodostemonodaphne*, *Urbanodendron* e *Williamodendrom* [29]. Além dos gêneros nativos é importante ressaltar outros dois, que foram introduzidos no Brasil, devido a sua importância econômica: *Laurus* e *Litsea* [30,31]. As espécies desta família destacam-se das demais, pela sua importância econômica.

Algumas espécies têm sido utilizadas pelas indústrias para fabricação de diversos produtos, porém a maioria destas espécies tem seu uso restrito às comunidades tradicionais que detêm o conhecimento empírico da utilização destas plantas. Essas espécies possuem alto valor comercial no mercado também por serem espécies aromáticas e produtoras de óleos essenciais, sendo frequentemente utilizadas como matérias prima nas indústrias. Os gêneros *Nectandra*, *Aniba* e *Ocotea* são aquelas que apresentam o maior número de espécies de importância econômica [32]. Os óleos essenciais da família Lauraceae podem ser encontrados em toda estrutura da planta, desde as folhas, como na própria madeira, destacando-se o óleo do Pau-Rosa, Sassafrás, Canela-da-China, entre outros [33].

O potencial econômico das espécies dessa família é conhecido desde os tempos remotos, através de documentos da China de 2800 a.C., onde já era empregado o óleo de *Cinnamomum camphora* (L.) J. Presl. e de outras espécies do gênero na medicina, as folhas de *Laurus nobilis* L., o loureiro, eram utilizadas pelos antigos gregos e romanos para confeccionar coroas, com as quais se homenageavam guerreiros e atletas vitoriosos, e estão entre os condimentos conhecidos da culinária de todo o mundo [43, 44].

3.8.1 Gênero *Nectandra*

O gênero *Nectandra* Rol. ex Rottb está entre os gêneros mais importantes da família, com 114 espécies reconhecidas, sendo 43 destas brasileiras, e algumas das espécies deste gênero estão localizadas na bacia do rio Paraná MS [45].

Algumas espécies do gênero *Nectandra* têm sido amplamente utilizadas na medicina popular devido à sua atividade antirreumática, digestiva e diurética. Algumas das propriedades medicinais foram comprovadas por alguns estudos, como em *Nectandra salicifolia* (Kunth) Nees, cujo extrato alcoólico da casca evidenciou propriedade relaxante muscular, atividade antifúngica e antimalárica, devido à presença do alcaloide costaricina obtido do extrato metanólico da casca [34]. Propriedades anti-inflamatórias também foram relatadas para a espécie *N. angustifolia* (Schrad.) Nees, os frutos e folhas de *N. pichurim* (Kunth) Mez são odoríferos e usados contra cólicas e problemas gástricos e o lenho de *N. rodiei* Schomb. é reconhecido como tônico, antipirético, relaxante vascular e antimalárico [32,35].

Dentre outras espécies representativas no Brasil pode-se citar *Nectandra megapotâmica* (Spreng.) Mez, vulgarmente conhecida como canela-louro, canela-preta, canela-ferrugem e canela-fedorenta, muito utilizada como planta ornamental no Estado de São Paulo, esta espécie ocorre desde o sul de Minas Gerais até o Rio Grande do Sul e também na região Centro-Oeste, trata-se de uma planta sem preferência definitiva por tipo de solo, desenvolvendo-se em solos úmidos até os de drenagem rápida [36, 37].

A composição química do óleo essencial provindo das folhas e galhos evidenciou a presença de sesquiterpenos como o E-nerolidol, espatulenol, óxido de cariofileno e guaiol, nas folhas, o componente majoritário do óleo essencial foi o E-nerolidol e este é conhecido pela sua atividade antimalárica, já nos galhos, o guaiol foi encontrado como componente majoritário do óleo essencial e lhe é atribuída atividade antibacteriana [38].

A espécie *N. grandiflora* é encontrada predominantemente nos biomas Mata Atlântica e Cerrado, entre os estados de Minas Gerais e Rio Grande do Sul, também é considerada como uma espécie ameaçada de extinção. Conhecida popularmente como canela-amarela, canela-fedida e canela cheirosa, é uma planta heliófila e secundária, sendo uma das espécies

de melhor regeneração dentro da floresta [36, 39]. Na medicina popular, a espécie é utilizada como anti-reumática, diurética e digestiva.

A atividade antimicrobiana em *Nectandra grandiflora*, inibindo o crescimento de *Staphylococcus aureus* foi descrita pelos mesmos autores que aferem a presença de espatulenol, α -pineno, cariofileno e copaeno no óleo essencial da espécie [40]. Estudos cromatográficos do extrato etanólico das folhas de *N. grandiflora* verificaram que o isolamento de dois flavonoides glicosilados apresentaram atividade antioxidante inibindo a oxidação do β -caroteno [41]. Estudos químicos e farmacológicos preliminares realizados com essa espécie evidenciaram atividade antitumoral do extrato etanólico de sua casca, que produziu efeito inibitório do sarcoma 180 e do carcinoma de Ehrlich implantados em ratos [42].

Na literatura são reportados poucos estudos de óleos essenciais do gênero *Nectandra*, contudo se faz necessário o estudo de novas espécies visando contribuir para o conhecimento da composição química e das atividades biológicas de novas espécies nativas de Mato Grosso do Sul.

3.8.2 Espécie *Nectandra lanceolata*

Conhecida popularmente como canela branca é uma árvore com até 25 metros de altura que se destaca pela intensa floração branca (Figura 2), o que a recomenda como espécie ornamental para ruas, praças e rodovias. Seus frutos são intensamente consumidos por várias espécies de pássaros sendo também indicada para a restauração de áreas. Esta espécie quase sempre apresenta folhas avermelhadas que ajudam na identificação, tronco levemente tortuoso, casca externa áspera e casca interna com cheiro desagradável. Sua madeira é indicada para móveis e construção civil, especialmente para tábuas, ripas e caibros [29,36].

Sendo importante destacar que são inexistentes estudos sobre a caracterização química e atividade biológica do óleo essencial desta espécie em Mato Grosso do Sul.





Figura 2. Espécie *Nectandra lanceolata* Nees

Fonte: Acervo pessoal

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 *Material vegetal*

A espécie selecionada para o estudo foi identificada pelo grupo de pesquisa do professor Etenaldo Felipe Santiago (UEMS), através de comparação com exsicata presente no herbário da (UFGD).

Foram coletadas folhas e cascas da espécie *Nectandra lanceolata* na região rural da cidade de Japorã-MS, em novembro de 2014 e julho de 2015, o material foi levado ao laboratório da UEMS unidade de Naviraí MS, onde foi preparado para extração.

A extração do OE foi realizada por hidrodestilação utilizando um aparelho Clevenger (Figura 3) modificado conforme determinado pela Farmacopéia Bras.(1988), utilizando um balão de fundo redondo de 5L, onde o material vegetal ficou encoberto por água destilada em aquecimento por 7 horas, em seguida o óleo extraído foi retirado utilizando éter etílico e dessecado com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4). O teor de óleo volátil foi obtido por pesagem em balança analítica e posterior calculo de rendimento (%) em função da massa

utilizada de folhas e cascas para extração, por fim o OE foi acondicionado em frasco âmbar (Figura 4) sob refrigeração e protegido da luz..



Figura 3. Extrator Clevenger adaptado

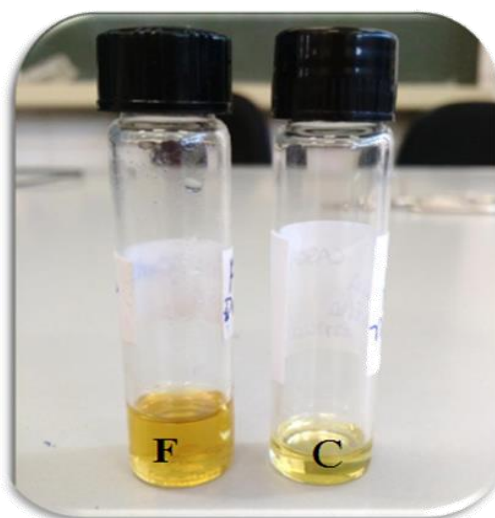


Figura 4. Óleos Essenciais da espécie *Nectandra lanceolata*, (F) folhas e (C) cascas.

4.2 Teste de Atividade Antioxidante pelo método do radical livre (DPPH)

A avaliação antioxidante qualitativa ocorreu pelo método físico-químico de separação cromatográfica, onde em cromatoplasmas de sílica foram aplicados ambos os óleos obtidos das folhas e cascas da *N.lanceolata*, dissolvido em etanol com auxílio de um capilar, sendo em

seguida eluídas em clorofórmio. Após a secagem, as placas foram imersas na solução $0,3 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de DPPH em metanol para a indicação de possível atividade [67].

A técnica foi adaptada conforme literatura consultada [87,88]. O método baseia-se na transferência de elétrons onde, por ação de um antioxidante (AH) ou uma espécie radicalar, o DPPH que possui cor púrpura é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela.

4.3 Análises Cromatográficas

4.3.1 Cromatografia a gás acoplada a detector de ionização de chama (CG-DIC)

A avaliação do perfil cromatográfico do óleo e pureza das frações isoladas foi realizada em CG-DIC-HP5890 (Figura 5), com coluna ZB5 40m (0,25 mm x 0,25 μm), fase estacionária 5% fenil e 95% dimetilpolisiloxano e outra coluna de fase apolar (100% Polietilenoglicol). Condições de análise: razão de divisão do injetor em *split* 1:80, gás de arraste: N_2 ($1,2 \text{ mL min}^{-1}$); forno cromatográfico $60 \text{ }^\circ\text{C}$, elevação de 3°C até 240°C , injetor 250°C e detector 250°C .



Figura 5. Cromatógrafo á gás com detector de ionização em chama

4.3.2 Cromatografia a gás com detecção por espectrometria de massas (CG-EM)

A análise qualitativa foi realizada em um Cromatógrafo Shimadzu GCMS-QP2010 (Figura 6), equipado com uma coluna HP5MS e com biblioteca NIST 32, sob as mesmas condições do CG-DIC.



Figura 6. Cromatógrafo á gás acoplado ao espectrômetro de massas

Para a identificação dos compostos comparou-se à fragmentação do íon molecular dos espectros da amostra obtido com os espectros da biblioteca NIST do equipamento, calculando também o Índice de Kovats (IK) determinado por meio da injeção de uma série de n-alcenos, C₉-C₂₄ injetados nas mesmas condições cromatográficas das amostras de OE e confirmados através do IK tabelado da literatura Adams [68].

4.3.3 Cromatografia em camada delgada (CCD)

As análises de cromatografia em camada delgada (CCD) foram realizadas utilizando placas de alumínio com sílica-gel 60 G (P254) da marca Merck. O óleo obtido das folhas e cascas da *N. lanceolata* foram aplicados nas placas e corridas com eluentes preparados com hexano e acetato (He/AcEt) nas concentrações de 90/10 85/15 e 80/20 em porcentagem respectiva, essas placas foram observadas em câmaras UV (em λ de 365 e 254 nm). As revelações dos cromatogramas, em CCD, foram feitas por revelador de vanilina (preparado com 0,1 g de vanilina adicionando-se 10 mL de ácido sulfúrico e 100 mL de etanol), depois

de submersas essas placas no revelador, foram aquecidas em chapa aquecedora e pode-se observar os compostos revelados e definir o melhor sistema de eluição.

Para o isolamento de frações purificadas de compostos destes OE os mesmos foram aplicados em placas de vidro recobertas com sílica-gel, preparadas manualmente com 15g de sílica-gel e 45 mL de água destilada, nestas foram aplicados 100 mg de cada óleo, e levadas a cuba cromatográfica (Figura 7), essas placas também foram reveladas em lanterna de emissão de radiação UV Marca Pro Tools modelo PA0105, e utilizou-se revelador de vanilina, para uma melhor definição dos compostos separados.



Figura 7. Cuba cromatográfica

4.3.4 Identificação dos Constituintes Químicos

Para a identificação dos compostos comparou-se à fragmentação do íon molecular dos espectros da amostra com os espectros da biblioteca NIST do equipamento CG-EM, calculando também o Índice de Kovats (Figura 8) este índice relaciona o tempo de retenção dos composto ao tempo de retenção de uma série de hidrocarbonetos homólogos injetados nas mesmas condições cromatográficas das amostras de OE e confirmados através do IK tabelado da literatura Adams [68], os valores encontram-se entre 900 (volátil) e 1900 (menos volátil), neste intervalo são encontrados a maioria dos monoterpenos e sesquiterpenos.

$$IK = 100.n + 100 \times \left(\frac{tr_1 - tr_2}{tr_3 - tr_2} \right)$$

Figura 8. Fórmula para cálculo do Índice de Kovats

*IK= índice de kovats, n= número de carbonos do alcano que elui antes do pico de análise, tr_1 =tempo de retenção do pico em análise, tr_2 = tempo de retenção do alcano que elui antes do pico em análise, tr_3 = tempo de retenção do alcano que elui depois do pico base.

4.4 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os experimentos de RMN foram registrados em um espectrômetro da marca BRUCKER DPX-400, do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), que opera a 400 MHz para ^1H -RMN e a 100 MHz para ^{13}C -RMN, utilizando tubos de 5mm. Foi utilizado clorofórmio deuterado como solvente (CDCl_3).

Utilizando como solvente o clorofórmio deuterado (CDCl_3). Os deslocamentos químicos (δ) foram registrados em ppm, em relação ao TMS ($\delta=0$).

Esta análise de RMN foi realizada apenas com a fração 4 equivalente a um composto isolado extraído do OE obtido das folhas, para elucidação de sua estrutura e confirmação na identificação.

4.5 Atividade Antimicrobiana

Para ensaio antimicrobiano foi selecionada a bactéria Gram-negativa não fermentadora da espécie *Acinetobacter baumannii* produtora de carbapenemase, portadora do gene de resistência *bla_{oxa-23}*, isolada de processo clínico humano, caracterizada previamente no Laboratório de Pesquisa em Ciências da Saúde (LPCS) da UFGD.

Os OE obtidos das folhas e cascas da *N. lanceolata* foram submetidos a uma triagem inicial utilizando o método de disco difusão em ágar segundo *Clinical and Laboratory Standards Institute*, com adaptações [69,70]. A suspensão do micro-organismo foi semeada com auxílio de um swab descartável, em toda a superfície do ágar Müller-Hinton., em seguida foram adicionados discos de papel filtro estéreis impregnados com 5 μL de cada óleo (forma bruta) a ser testado, após incubação das placas a 37°C por 24 horas foi realizada a leitura dos resultados medindo-se o diâmetro do halo formado ao redor dos discos. Foi considerado como

resultado final de cada extrato a média das duas medidas da duplicata e como suscetível halo igual ou acima de 8 mm de diâmetro considerando também o diâmetro do disco. Como controle positivo foi usado disco de tigeclina.

O teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizado utilizando o método de microdiluição em placas, de acordo com literatura descrita [71]. A suspensão bacteriana foi realizada em solução salina com turvação correspondente a inóculo de 1×10^6 UFC/mL, os óleos foram inicialmente diluídos em água destilada estéril, obtendo-se a concentração de 16%, para obtenção dessas diluições considerou-se a densidade das substâncias igual a 0,9 g/mL, foram adicionados em tubos de vidro estéril: 0,8 mL do óleo, 0,05 mL de Tween 80% e 4,2 mL de água destilada estéril, o conjunto foi agitado durante 5 minutos em vórtex e a concentração final obtida foi de 16% equivalente a 144 mg/mL, em cada um dos poços das placas de microdiluição foram inseridos 100 μ L de caldo Müller-Hinton, em seguida inseriu-se 100 μ L das emulsões dos óleos para obtenção da concentração inicial de 8% (72 mg/mL) na primeira linha da placa de microduição.

As concentrações subsequentes dos óleos foram obtidas após diluição seriada na própria placa, partindo-se da concentração inicial de 8% até 0,0625%, pela transferência de 100 μ L do conteúdo ao poço subsequente. Os testes foram realizados em duplicata, sendo também realizado o controle de toxicidade do Tween 80%, na concentração utilizada para emulsão, no intuito de verificar se este não possui atividade inibitória para a bactéria, também foi realizado controle do óleo para verificar sua esterilidade (óleo mais meio de cultura), como controle positivo, suspensão bacteriana em solução salina com turvação correspondente a 0,5 da escala McFarland acrescida de polimixina B (antibiótico comercial com ação inibitória para o micro-organismo estudado) e como controle negativo, suspensão bacteriana mais meio de cultura.

As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Para revelação dos resultados, foi utilizada uma solução indicadora de resazurina sódica 0,01%, após a incubação foram adicionados 30 μ L da solução indicadora em cada cavidade e as placas incubadas por duas horas em estufa a 37°C.

4.6 Atividade Antitumoral *in vitro*

A capacidade antiproliferativa foi realizada no departamento de farmácia da UFMS, sob supervisão da Prof.^a Dra. Maria de Fátima Cepa Matos.

As linhagens celulares tumorais, utilizadas neste trabalho são originárias de neoplasias humanas e foram cedidas pelo National Cancer Institute (NCI) dos EUA. Todas as linhagens foram enviadas congeladas, sendo então descongeladas e repicadas, quando necessário, sob condições estéreis (Fluxo Laminar Veco®, Classe IIB2) e mantidas em frascos de 25cm² (T25) com 5 ml de RPMI-1640 /SFB e incubadas a 37°C em atmosfera de 5 % de CO₂ em ambiente úmido.

Para avaliação da atividade anticâncer dos óleos essenciais obtidos da *N.lanceolata* foram utilizadas nove linhagens tumorais humanas apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2. Linhagens celulares utilizadas nos testes de atividade antitumoral

CÓDIGOS	CÉLULAS
U251	Glioma
MCF-7	Mama
NCI-ADR/RES	Ovário com fenótipo resistente
786-0	Rim
NCI-H40	Pulmão
PC-3	Próstata
OVCAR-03	Ovário
HT29	Cólon
K562	Leucemia
HaCat	Queratinócitos imortalizados

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 *Rendimento*

A espécie estudada apresentou baixo rendimento de óleo essencial, conforme demonstrado na Tabela 3.

Tabela 3. Rendimento dos óleos essenciais

AMOSTRA	RENDIMENTO (%)
<i>N.lanceolata</i> folha	0,09%
<i>N.lanceolata</i> casca	0,04%

Este é o primeiro estudo de rendimento do óleo essencial desta espécie em MS, mas o mesmo pode ser considerado baixo quando comparado a estudos realizados com outras espécies deste gênero *Nectandra*, como no estudo realizado por Silva [73] com a espécie *Nectandra grandiflora*, o autor verificou que o rendimento de (OE) médio da espécie foi em torno de 0.51% um valor muito acima do obtido neste estudo.

Estes rendimentos obtidos também são inferiores quando comparados com espécies de Lauraceae do gênero *Cinnamomum*, sendo que em estudos realizados estas apresentaram rendimento para OE das folhas em torno de 1,5% [83].

Alguns autores estudaram o efeito da sazonalidade sobre o rendimento de espécies pertencente à família Lauraceae, (*Ocotea porosa*, *Nectandra megapotâmica*, *Ocotea odorifera*), sendo que estas espécies apresentaram diferença significativa no teor de óleo essencial extraído conforme a época de coleta (diferentes estações). Nestes estudos observou-se que a quantidade e a composição volátil muitas vezes são dependentes da espécie e das fases fenólicas em que a mesma se encontra [74, 75, 76, 77,78]. Portanto o teor de óleo volátil extraído da espécie *N. lanceolata* pode variar dependendo a época de colheita.

5.2 Análise Antioxidante (DPPH)

Dados literários evidenciam que algumas espécies da família Lauraceae possuem atividade antioxidante, as espécies *Aniba roseodora* (galhos), *Licaria martiniana* (folhas e galhos), *Ocotea splendens* (folhas), *Mezilaurus duckei* (folhas e galhos) foram analisadas quanto às suas atividades antioxidante e inibidora de acetilcolinesterase, e todas apresentaram ação antioxidante, mas apenas a espécie *Mezilaurus duckei*, apresentou inibição do crescimento da enzima [112]. Também existem estudos que comprovam a ação antioxidante da espécie *Nectandra megapotâmica* coletada aqui no estado de MS [113]. Porém os OE obtidos das folhas e cascas da espécie *N.lanceolata* não apresentaram atividade antioxidante, portanto foram considerados ineficientes como sequestradores de radicais livres.

5.3 Análises Cromatográficas

5.3.1 Cromatografia Gasosa Acoplada ao detector de ionização em chama (CG-DIC)

O OE obtido das folhas e cascas da *N. lanceolata* foram analisados por CG-DIC, em duas colunas de polaridade diferente para maior precisão na identificação dos constituintes químicos, levando em consideração a diferença de polaridade entre eles, e também a hipótese que duas substâncias diferentes podem ter mesmo índice de Kovats.

Abaixo (Figura 9 e 10) estão demonstrados os cromatogramas obtidos para folha e casca na coluna polar.

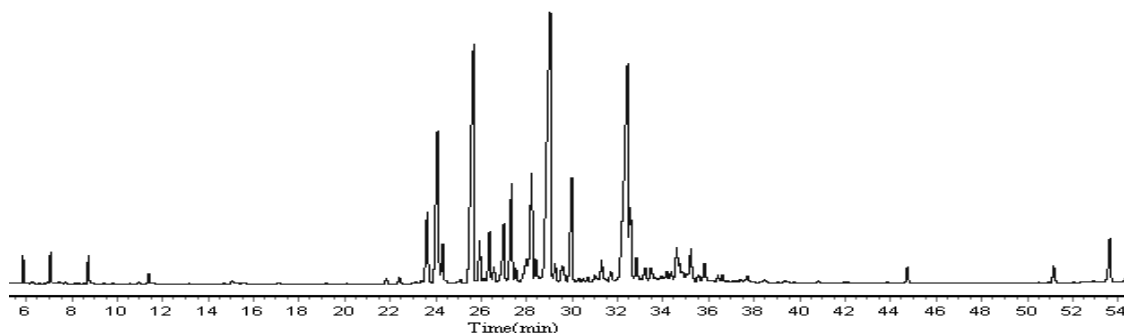


Figura 9. Perfil cromatográfico do óleo essencial obtido das folhas da *N. lanceolata*, coluna ZB5 40m (0,25 mm x 0,25 μ m), fase estacionária 5% fenil e 95% dimetilpolisiloxano.

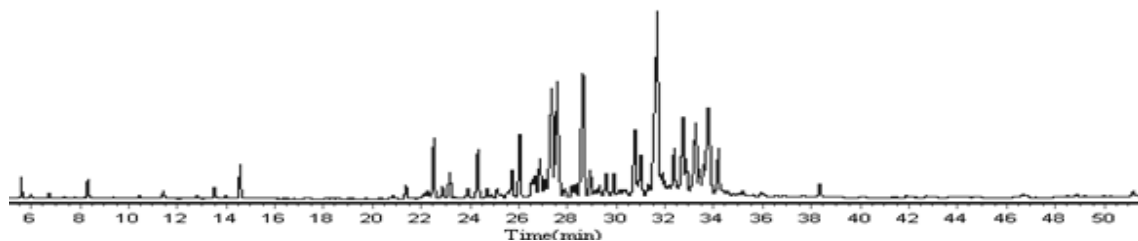


Figura 10. Perfil cromatográfico do óleo essencial obtido das cascas da *N. lanceolata*, coluna ZB5 40m (0,25 mm x 0,25 μ m), fase estacionária 5% fenil e 95% dimetilpolisiloxano.

Cromatogramas obtidos para folhas e cascas utilizando coluna apolar (Figura 11 e 12).

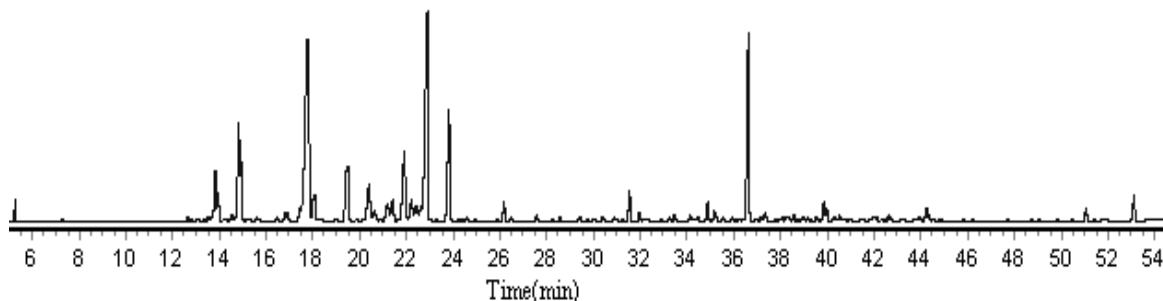


Figura 11. Perfil cromatográfico do óleo essencial obtido das folhas da *N. lanceolata* por CG-DIC, coluna 100% polietilenoglicol

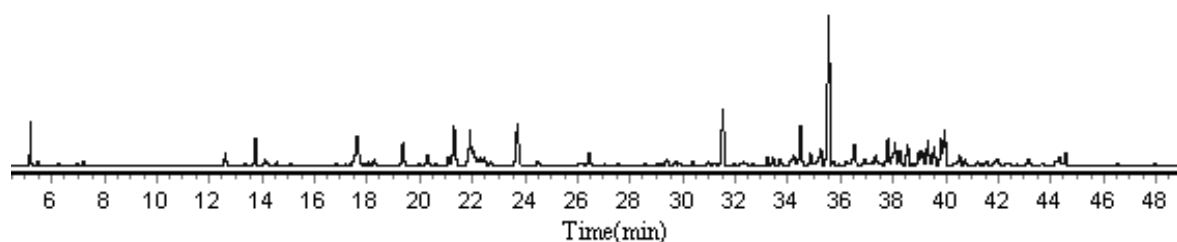


Figura 12. Perfil cromatográfico do óleo essencial obtido das cascas da *N. lanceolata* por CG-DIC, coluna 100% polietilenoglicol.

Pode-se observar através dos cromatogramas obtidos por CG-DIC para o óleo essencial das folhas e cascas da *N. lanceolata* a presença de compostos monoterpenos, sesquiterpenos e diterpenos, também observa-se a diferença entre os cromatogramas obtidos para cada coluna (polar e apolar), a afinidade dos compostos com a coluna pode ser analisada comparando os tempos de retenção em que os picos eluirão e também a intensidade dos sinais de cada pico.

Em uma análise preliminar é possível afirmar a diferença entre o número de compostos (picos) no OE da folha e casca, e também a intensidade destes em cada amostra.

Portanto por meio desta análise nota-se a diferença na composição química mesmo se tratando de um óleo volátil obtido de mesma espécie (*N. lanceolata*), confirmando que o óleo

extraído de uma mesma planta pode diferir quimicamente, dependendo do órgão da planta (folha e casca) utilizado para extração.

5.3.2 Cromatografia Gasosa Acoplada ao Espectrômetro de Massas (CG-EM)

O OE obtido das folhas da espécie *N. lanceolata* apresentou uma grande diversidade de compostos destacando-se como compostos majoritários os sesquiterpenos β -bourboneno, cariofileno, biciclogermacreno e espatulenol, como apresentados na Figura 13.

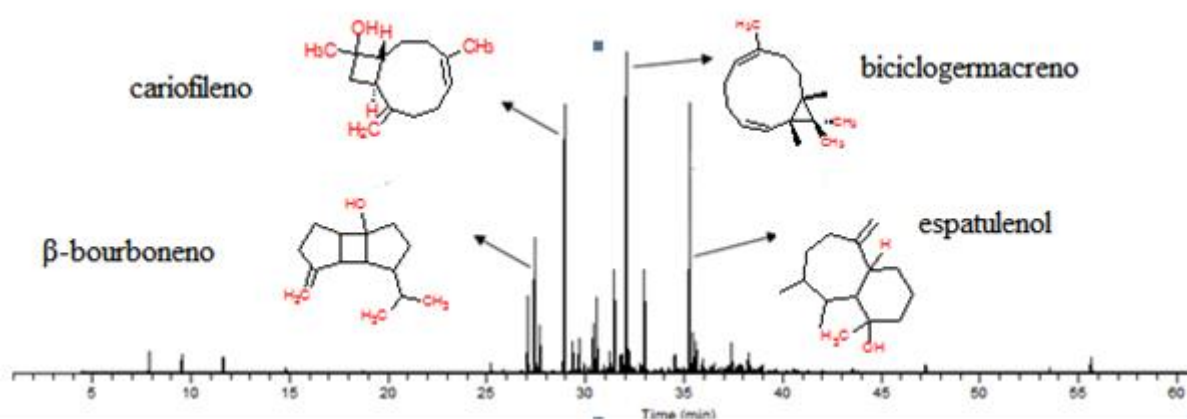


Figura 13. Perfil cromatográfico do óleo essencial obtido das folhas da *N. lanceolata* por CG-EM

Entretanto, o óleo obtido das cascas da mesma espécie (*N. lanceolata*) apresentou uma composição química diferente, apresentando como compostos principais o monoterpene α -pineno, seguido dos sesquiterpenos β -selineno, guaiol, α -eudesmol (Figura 14).

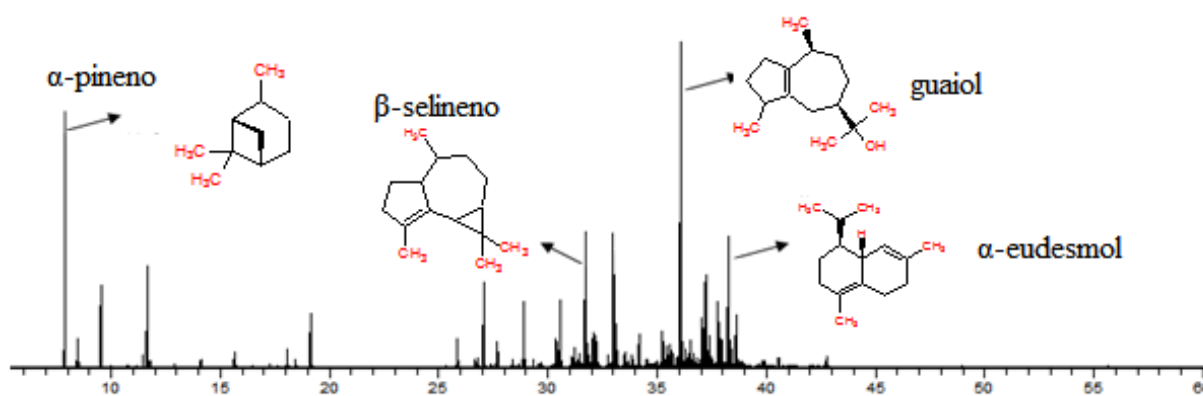


Figura 14. Perfil cromatográfico do óleo essencial obtido das cascas da *N. lanceolata* por CG-EM.

As análises em CG-EM confirmaram que os óleos obtidos das folhas e cascas da espécie *N.lanceolata* são ricos em compostos terpênicos, em maior quantidade os

sesquiterpenos para ambos os OE, entretanto estes diferiram quimicamente em sua composição, sendo que o óleo da folha apresentou somente sesquiterpenos entre os compostos majoritários, já o OE das cascas tem em sua composição entre os principais constituintes químicos, o monoterpeno α -pineno.

5.4 Identificação dos Constituintes Químicos

5.4.1 Constituintes Químicos Folhas

Por meio dos cromatogramas obtidos por CG-DIC e CG-EM e cálculo dos índices de Kovats foi possível à identificação dos constituintes químicos (Tabela 4) do óleo essencial obtido das folhas da *N. lanceolata*, 30 compostos (91,03%) foram identificados entre eles monoterpenos, sesquiterpenos e diterpenos, destacando em maior porcentagem no OE os hidrocarbonetos sesquiterpênicos (59,36%).

Tabela 4. Constituintes químicos do óleo essencial das folhas da *Nectandra lanceolata*

N	COMPOSTOS	TR	CONC. (%)	IK ^C	IK ^L	PB-IM
Hidrocarbonetos Monoterpênicos			1,84%			
1	α -pineno	7,87	0,58	927	932	93-136
2	β -pineno	9,53	0,63	973	974	93-136
3	Limoneno	11,65	0,63	1026	1024	68-136
Monoterpenos Oxigenados			0,2%			
4	Linalool	14,82	0,2	1099	1095	71-136
Ácidos Graxos			0,08%			
5	Ácido Butanoico	18,72	0,08	1184	1197	67-101
Fenilpropanóides			6,03%			
6	Vanilina	30,57	6,03	1454	1452	161-204
Hidrocarbonetos Sesquiterpênicos			59,36%			
7	Elemeneno	25,19	0,42	1328	1335	121-204
8	α -cubebeno	25,85	0,17	1343	1345	105-204
9	α -ylangeno	26,78	0,23	1364	1375	105-204
10	α -copaeno	27,07	3,31	1371	1374	119-204
11	β -bourboneno	27,40	5,96	1379	1387	81-204
12	β -elemeno	27,68	2,58	1389	1389	81-204
13	α -gurjuneno	28,38	0,24	1401	1409	105-204
14	E cariofileno	28,93	12,45	1415	1417	93-204
15	β -cubebeno	29,33	1,44	1424	1387	161-204

16	Aromadendreno	29,73	1,75	1434	1439	91-204
17	1-methoxy-naphthaleno	29,94	0,49	1439	1444	161-204
18	Allo-aromadendreno	30,24	0,49	1446	1458	91-204
29	γ -muuroleno	31,22	1,34	1470	1478	161-204
22	Germacreno D	31,46	4,56	1476	1484	161-204
21	Biciclogermacreno	32,07	18,21	1491	1500	121-204
22	γ -patchouleno	32,98	5,45	1513	1502	161-204
Sesquiterpenos Oxigenados			22,07%			
23	α -copaen-11-ol	33,53	0,27	1527	1539	161-204
24	Espatulenol	35,29	16,91	1572	1577	91-220
25	Óxido cariofileno	35,91	1,0	1588	1582	79-205
26	α -acorenol	37,40	2,27	1627	1632	119-220
27	α -epi-muurolol	37,84	1,47	1639	1640	161-222
28	Aromadendreno epóxido	38,96	0,69	1669	1639	107-220
Diterpenos			1,18%			
29	Farnesilacetona	47,24	0,38	1906	1913	69-161
30	Geranil	55,63	0,8	2176	2217	69-136
Total			91,03%			

Legenda; TR= Tempo de Retenção; Conc= concentração; IK^C= Índice de Kovats Calculado; IK^L=Índice de Kovats da Literatura; PB= Pico Base; IM= Íon Molecular

5.4.2 Constituintes Químicos Cascas

Para o OE das cascas foi possível à identificação de 36 compostos (Tabela 5) que equivale a 92,19 % da composição total, entre eles monoterpenos e sesquiterpenos, destacando-se os sesquiterpenos oxigenados (39,89%).

Tabela 5. Constituintes Químicos das cascas da *Nectandra lanceolata*

N	Compostos	TR	Conc. %	IK ^C	IK ^L	PB IM
Hidrocarbonetos Monoterpênicos			14,09%			
1	α -pineno	7,87	6,9	927	932	93-136
2	Canfeno	8,47	0,89	943	946	93-136
3	β -pineno	9,53	2,19	973	974	93-136
4	Careno< δ -3->	10,77	0,09	1006	1008	93-136
5	Limoneno	11,65	3,68	1026	1024	68-136
6	γ -terpineno	12,90	0,1	1054	1054	93-136
7	Terpinoleno	14,1	0,24	1082	1086	93-136
Monoterpenos Oxigenados			3,31%			
8	Fenchol	15,64	0,57	1116	1118	81-121
9	Borneol	18,05	0,68	1165	1182	95-154

10	Terpine-4-ol	18,44	0,26	1187	1174	71-136
11	γ -terpineol	19,13	1,8	1193	1199	59-139
Hidrocarbonetos Sesquiterpênicos			31,54%			
12	α -cubebeno	25,85	0,94	1343	1345	105-204
13	Ciclosativeno	26,77	0,71	1354	1369	161-204
14	α -copaeno	27,07	2,96	1371	1374	119-204
15	β -bourboneno	27,40	0,11	1379	1387	81-204
16	β -elemeno	27,68	0,96	1385	1389	81-204
17	α -gurjuneno	28,39	0,46	1401	1409	105-204
18	E-cariofileno	28,89	2,48	1459	1464	91-204
19	β -copaeno	29,33	0,27	1424	1430	161-204
20	1-methoxy-naphthaleno	29,67	0,34	1432	1444	161-204
21	Alloaromadendreno	30,56	3,81	1446	1458	91-204
22	γ -muuroleno	31,22	1,35	1470	1478	161-204
23	β -Selineno	31,73	6,25	1482	1489	161-204
24	γ -gurjuneno	32,06	2,75	1490	1475	91-204
25	γ -cadineno	32,99	7,68	1513	1513	161-204
26	α -calacoreno	33,85	0,47	1535	1544	157-200
Outros			3,36%			
27	Acetato elemol	34,18	1,3	1655	1680	59-204
28	Palustrol	34,97	0,62	1564	1567	111-222
29	Acetato cariofileno	35,25	1,44	1750	1701	79-220
Sesquiterpenos Oxigenados			39,89%			
30	Globulol	35,60	2,3	1580	1590	109-222
31	Guaiol	36,09	13,18	1592	1600	161-222
32	Viridiflorol	36,51	2,62	1603	1592	109-222
33	Cubenol	37,23	7,6	1623	1627	161-204
34	α -epi-cadinol	37,77	4,82	1637	1638	161-222
35	α -eudesmol	38,27	7,0	1651	1652	161-204
36	Bulnesol	38,63	2,37	1660	1670	107-222
Total			92,19%			

Legenda; TR= Tempo de Retenção; Conc= concentração; IK^C= Índice de Kovats Calculado; IK^L=Índice de Kovats da Literatura; PB= Pico Base; IM= Íon Molecular

A composição química encontrada para *N. lanceolata* difere das já descritas na literatura para o gênero *Nectandra*. Em *N. rígida* (folhas) os majoritários encontrados foram α -felandreno e β -felandreno, no óleo essencial das folhas da *N. augustifolia* foi identificado como composto majoritário o α -terpinoleno, já para o óleo essencial da casca da *N. salicina* os principais compostos foram atractilona e germacreno D [94, 95, 96]. Importante destacar que

este é o primeiro trabalho relatando a composição química do OE da espécie *N. lanceolata* no estado de Mato Grosso do Sul.

Os monoterpenos α -pineno, β -pineno e limoneno estão presente em ambos os óleos voláteis, porém em maior proporção no OE das cascas, assim como o sesquiterpeno α -cubebeno.

Os sesquiterpenos E-cariofileno e β -bourboneno estão presentes em maior proporção no óleo das folhas, além destas diferenças em proporções dos constituintes em cada OE também é notável a diferença na presença de monoterpenos em maior porcentagem no OE das cascas.

5.5 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

A melhor separação foi determinada para concentração de 85/15 de hexano/acetato de etila He/AcEt (Figura 15).

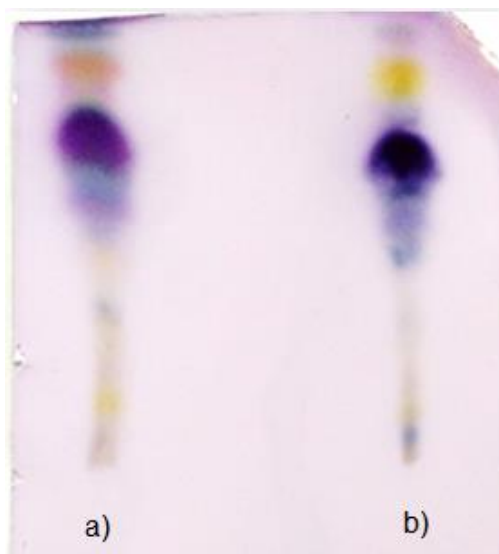


Figura 15. Perfil cromatográfico obtido por CCD para óleo das folhas (a) e cascas (b) da *Nectandra lanceolata*.

5.5.1 Cromatografia em camada delgada preparativa do óleo essencial das folhas

O OE obtido das folhas da *N. lanceolata* foram aplicados nas placas cromatográficas, (Figura 16) sendo assim possível a separação de 5 frações, obtendo-se o enriquecimento de alguns compostos e também o isolamento de um composto.

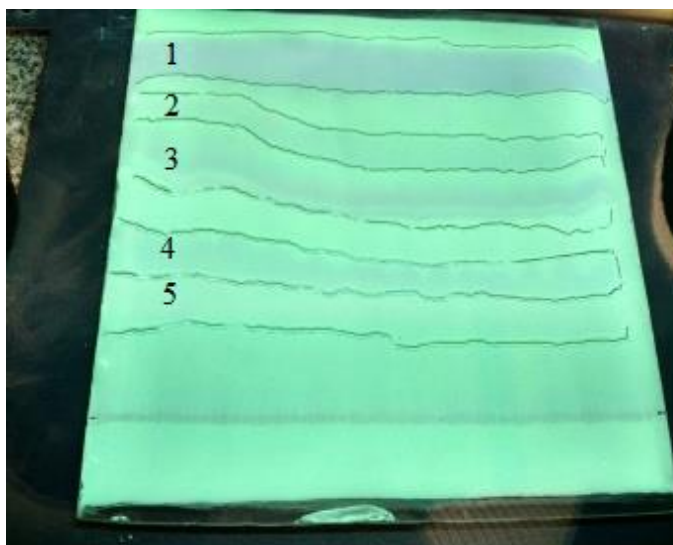


Figura 16. Fracionamento do óleo bruto das folhas por CCDP

Através do fracionamento do OE bruto obteve-se o enriquecimento de alguns composto e também o isolamento do composto γ -patchouleno, na fração 5 pode-se observar o enriquecimento de 2 diterpenos, Farnesilacetona e Geranil (Figura 17), sendo que este composto é descrito na literatura por diversos autores por sua elevada atividade antimicrobiana e também por sua atividade citotóxica [79, 80, 81, 82].

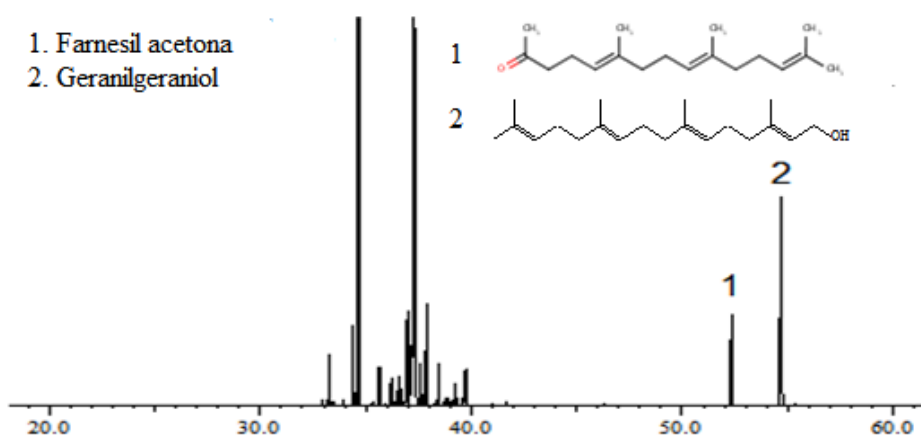


Figura 17. Cromatograma obtido do óleo essencial das folhas por CG-EM para fração 5

5.5.2 Cromatografia em camada delgada preparativa do óleo essencial das cascas

O óleo essencial obtido das cascas da *N. lanceolata* foi aplicados em 3 placas cromatográficas (Figura 19) , sendo assim possível a separação de 8 frações, nestas alguns

compostos mostraram-se em maior proporção que no óleo bruto, e obteve-se também o isolamento de um composto.

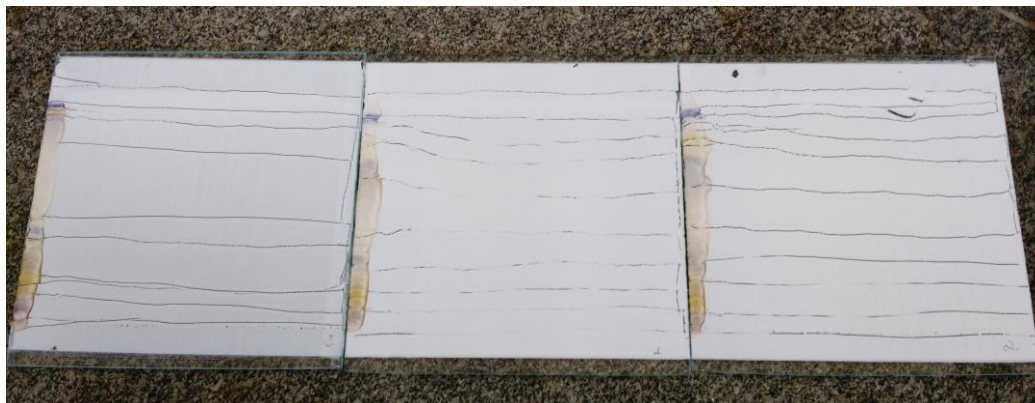


Figura 18. Fracionamento do óleo bruto das cascas da *N. lanceolata* por CCDP

Na fração 3 (Figura 19 a)) pode-se observar o enriquecimento do composto cubenol, e na fração 7 (Figura 20 b) dos compostos borneol e α -terpineol.

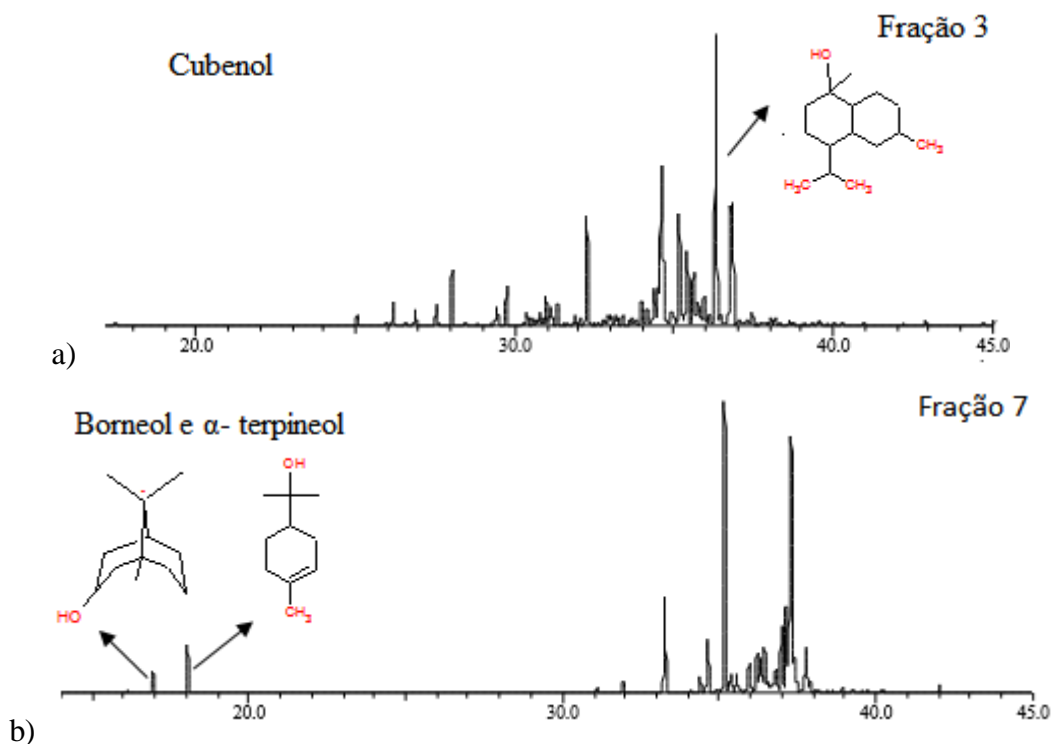


Figura 19. Cromatograma obtido do óleo essencial das cascas por CG-EM para fração 3(a) e 7(b)

Na fração 5 (Figura 20) o composto majoritário (Guaiol) do óleo essencial da casca foi isolado.

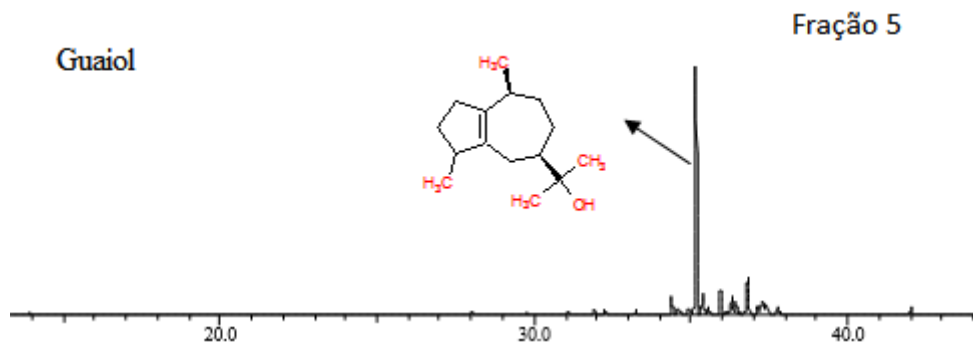


Figura 20. Cromatograma obtido do óleo essencial das cascas por CG-EM para fração 5.

5.6 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

5.6.1 Atribuição do composto isolado: sesquiterpeno γ -patchlouleno

O composto isolado na forma pura (Figura 21) a partir do fracionamento do óleo das folhas de *N. lanceolata*, teve sua estrutura confirmada após análise mais detalhadas.

Inicialmente, não foi possível atribuir sua real identidade devido a dados discrepantes entre o índice de Kovats e os espectros de massas da base de dados de Adams. Estas discrepâncias se deveram ao fato das informações não serem confirmadas, pois ocorreram diferenças significativas entre as massas moleculares dos compostos sugeridos para uma determinada faixa de índice de Kovats, onde se encontra o composto analisado. As informações fornecidas pelo índice de Kovats e o espectro de massas do composto (Figura 22) foram capazes de caracterizar que se tratava de um sesquiterpeno com massa molecular 204 g.mol^{-1} .

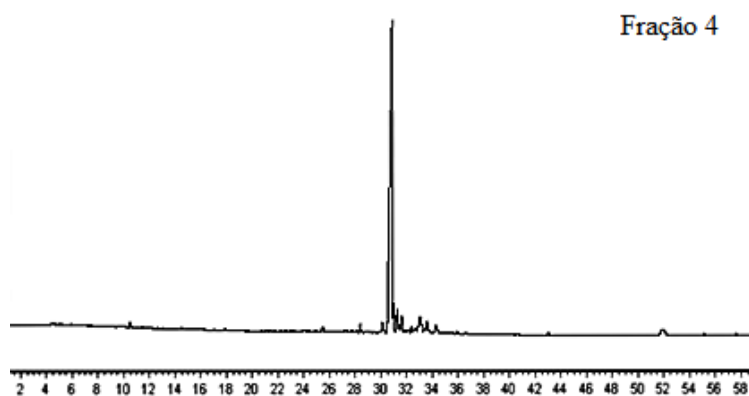


Figura 21. Cromatograma do composto isolado do óleo essencial das folhas com índice de kovats 1513.

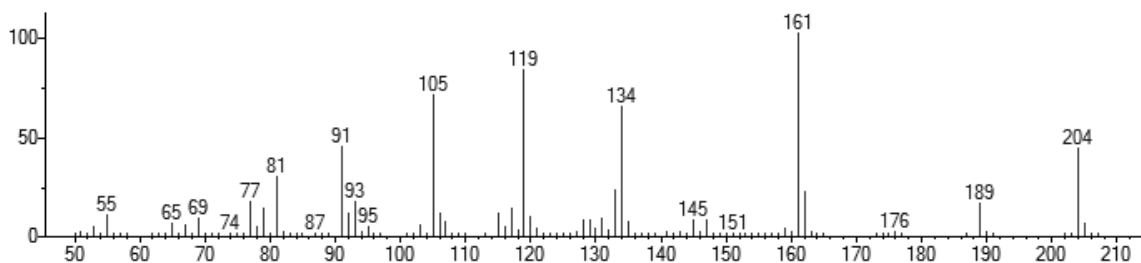


Figura 22. Espectro obtido por CG-EM para o composto isolado do óleo essencial das folhas.

A atribuição de que se tratava do composto γ -patchouleno foi baseada na união dos dados de espectro de massa e ressonância magnética nuclear (RMN de ^1H e ^{13}C). Nestes espectros observamos que o composto isolado apresentava uma ligação dupla. Através do espectro de RMN de ^{13}C (Figura 23) pode-se confirmar que se tratava de uma dupla exocíclica, por meio da análise do espectro de DEPT-135 (Figura 24), em que é possível observar os sinais dos carbonos da ligação dupla (δ 106 ppm e δ 153 ppm), a dupla ligação também é evidenciada pelos deslocamentos de prótons olefinicos em δ 4,66-4,69 (Figura 25) ppm (Figura 25), demonstrando que existe o sistema $-\text{CH}=\text{CH}_2$.

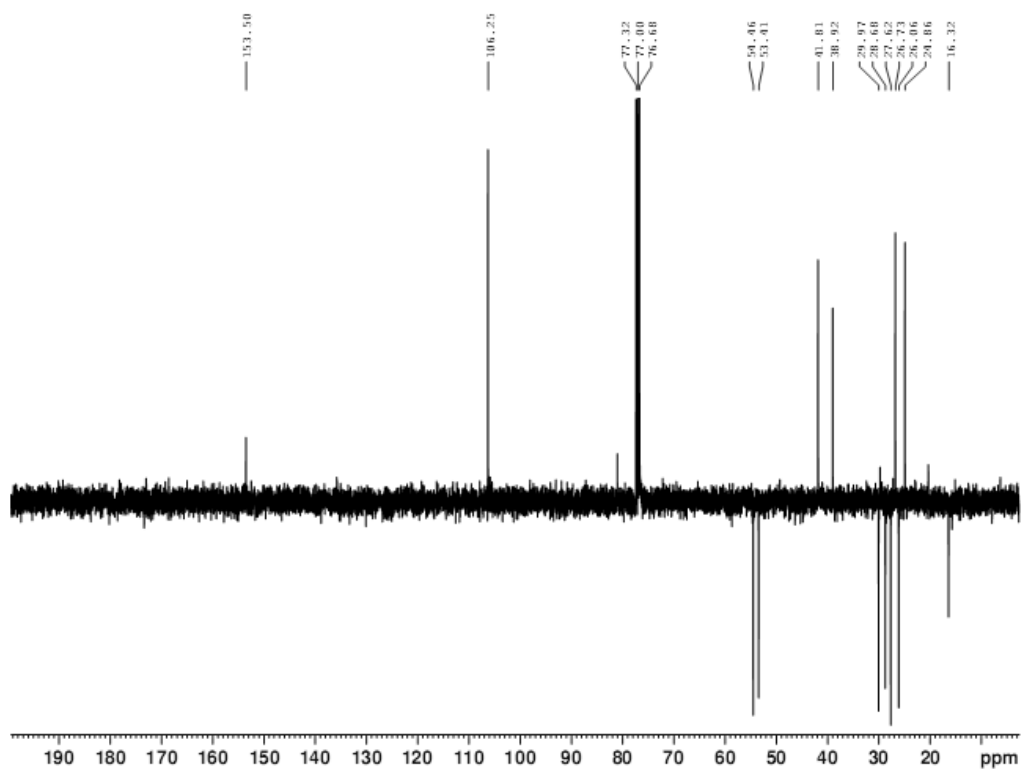


Figura 23. Espectro de RMN ^{13}C obtido para fração 4 do óleo essencial das folhas..

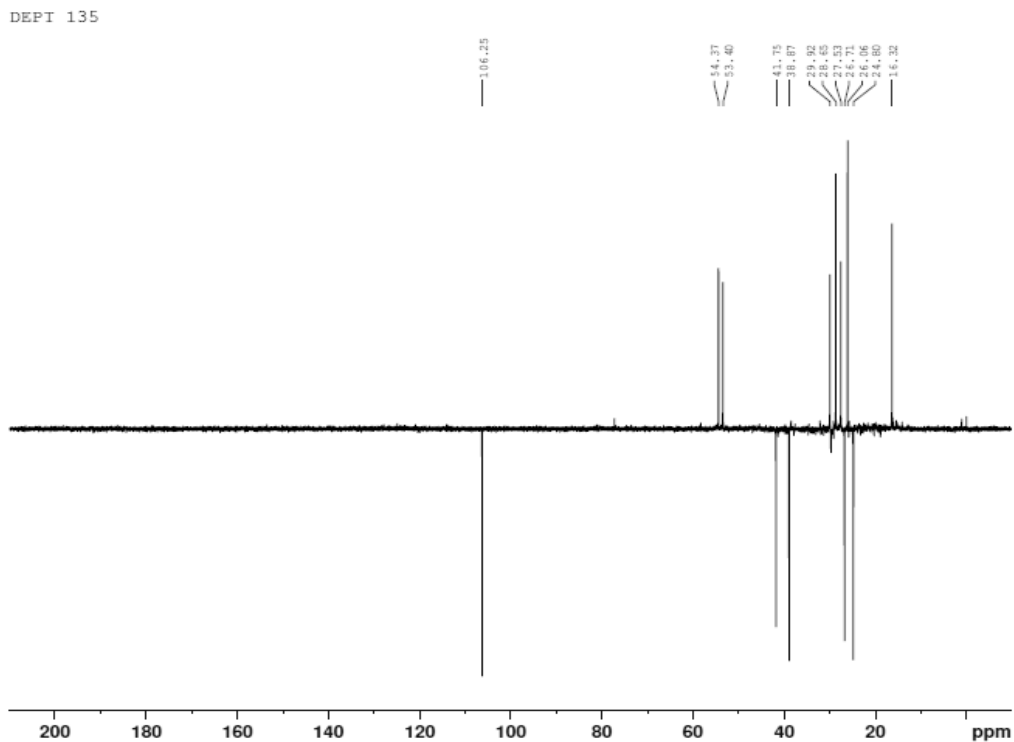


Figura 24. Espectro de DEPT-135 para fração 4 do óleo essencial das folhas.

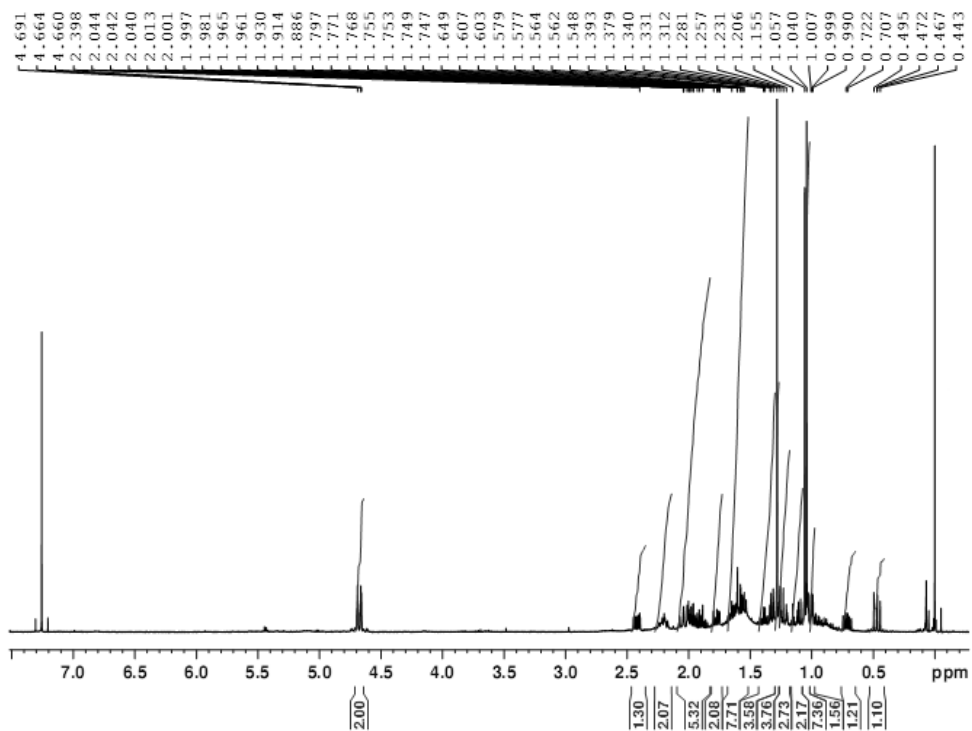


Figura 25. Espectro de ^1H obtido por RMN para fração 4 do óleo essencial das folhas.

Sabendo que o composto analisado apresentou um índice de Kovats de 1513, aliado as informações dos espectros (EM, RMN) foi possível excluir diversos compostos sesquiterpênicos com índice de Kovats próximo, devido a discrepâncias referentes a massa molecular, presença de compostos saturados, presença de compostos oxigenados, presença de compostos monoinsaturados endocíclicos e compostos poliinsaturados. Desta forma, chegamos a estrutura do γ -patchouleno (Figura 26), que apresenta dados espectrais que corroboram com sua estrutura química.

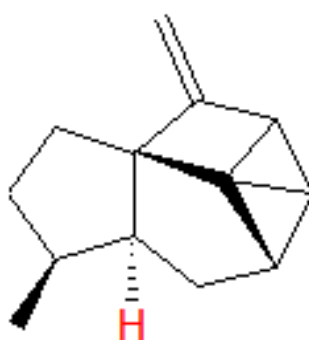


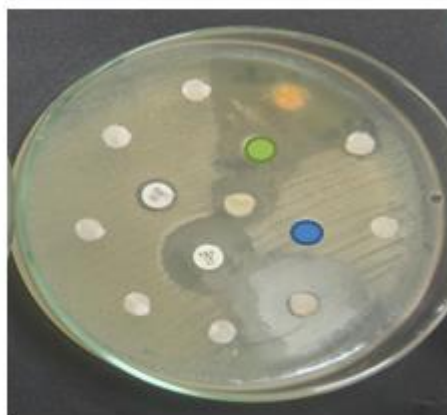
Figura 26. Estrutura do γ -patchouleno, sesquiterpeno isolado do óleo das cascas de *Nectandra lanceolata*.

O IK listado para este composto na literatura é 1502, este composto é relatado na literatura originado do óleo de *Pogostemon cablin* Benth. (Lamiaceae) popularmente conhecida como patchouli, este OE é amplamente empregado em indústrias de perfumaria e cosméticos [114,115], são também conhecidas atividades antibacteriana, antioxidante, inseticida, e repelente contra insetos [116, 117, 118,119]. Pode-se atribuir todas as características deste OE a sua composição química que apresenta como componente majoritário o patchoulol ou álcool patchouli, um sesquiterpeno oxigenado, e também grande número de outros hidrocarbonetos sesquiterpenos, em torno de 27 compostos, tais como, α , σ , β , γ - patchoulenos, α -bulneseno, α -guaieno e seicheleno, com estruturas claramente relacionadas ao patchoulol e outros sesquiterpenos [115, 117, 120, 121, 122].

5.7 Análise Antimicrobiana

O OE obtido das folhas e cascas da *N. lanceolata* foram submetidos a uma triagem inicial utilizando o método de disco difusão em ágar, sendo que na triagem prévia somente o óleo essencial obtido das cascas desta espécie foi considerado ativo contra a bactéria *Acinetobacter baumannii*.

Após incubação das placas a 37°C por 24 horas foi realizada a leitura dos resultados medindo-se o diâmetro do halo formado ao redor dos discos como mostrado na Figura 26.



● Óleo essencial cascas
 ● Óleo essencial folhas

Figura 27. Teste da atividade antimicrobiana dos óleos por disco-difusão

Foi considerado como resultado final de cada extrato a média das duas medidas da duplicata e como suscetível halo igual ou acima de 8 mm de diâmetro considerando também o diâmetro do disco (Tabela 6), como controle positivo foi usado disco de tigeclina.

Tabela 6. Diâmetro dos halos de inibição pela técnica de disco-difusão

Óleos essenciais	<i>Acinetobacter baumannii</i> (halo)	Interpretação*
<i>N.lanceolata</i> casca	18 mm	S
<i>N.lanceolata</i> folha	0 mm	R

Legenda: S=sensível; R= resistente

Como o óleo essencial da casca mostrou-se ativo contra a bactéria testada, foi realizado em seguida com este óleo o teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM).

A leitura dos resultados para determinação da CIM foi considerada como positiva para os orifícios que apresentaram coloração azul indicando ausência de crescimento visível e negativa os de coloração vermelha significando a presença de células viáveis, como visualizado na Figura 28.

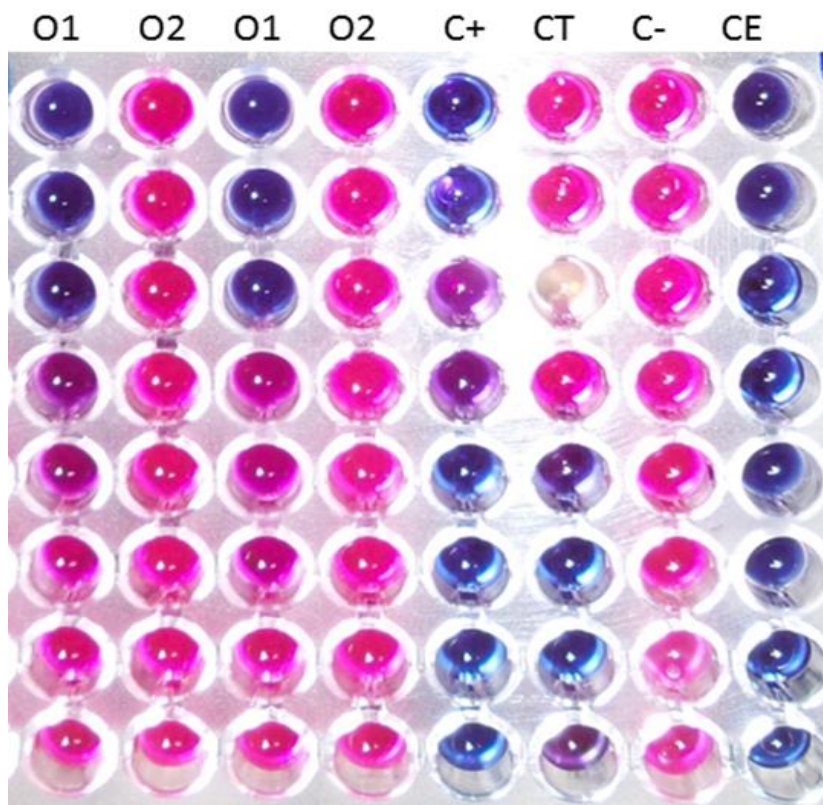


Figura 28. Teste da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos OE pelo método de microdiluição em placa

Legenda: O1 e O2: Óleo essencial casca; C+: controle positivo (*Acinetobacter baumannii* + polimixina B + caldo Müller-Hinton); CT: controle da toxicidade do Tween 80 (*Acinetobacter baumannii* + tween 80 + caldo Müller-Hinton); C-: controle negativo (*Acinetobacter baumannii* + caldo Müller-Hinton); CE: controle de esterilidade do extrato (óleo + caldo Müller-Hinton).

O controle positivo permitiu validar a técnica, já que a polimixina B foi eficiente em inibir o crescimento do *Acinetobacter baumannii*, o controle do Tween 80 permitiu verificar que este não inibe por si só o micro-organismo, já o controle negativo permitiu verificar que a bactéria tinha capacidade de se desenvolver nas condições propiciadas ao cultivo e que nada do que foi adicionado, com exceção dos óleos ou antibióticos, inibia seu crescimento, o controle de esterilidade dos óleos permitiu verificar que estes não possuíam nenhum micro-organismo interferente.

As diluições do óleo essencial da casca apresentaram CIM de 1800 µg/mL, e de acordo com a literatura, óleos essenciais com CIM até 500 µg/mL são considerados com forte atividade antimicrobiana, com CIM entre 600 e 1600 µg/mL possuem atividade moderada e CIM acima de 1600 µg/mL é considerado com atividade fraca [98, 124].

Em estudos realizados com OE da espécie *Callistemon viminalis* (Myrtaceae), utilizando o teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM) frente a bactérias Gram negativas e Gram positivas, este OE apresentou CIM igual ou superior a 2000 µg/mL para as bactérias testadas [123], valor próximo aos resultados obtidos para o OE da *N. lanceolata*, sendo que a espécie *Callistemon viminalis* apresentou em sua composição química um alto teor de monoterpenos e alguns deles como limoneno, terpineno, fenchool, terpinen-4-ol, também foram identificados no OE da espécie *N. lanceolata*.

Dados literários evidenciam que outras espécies da família possuem atividade antimicrobiana comprovada, em um estudo com óleos essenciais de quatro espécies de Lauraceae, pelo mesmo método utilizado no presente estudo (CIM), definiu-se que a espécie *Cinnamomum zeylanicum* apresentou melhor atividade antifúngica diante de várias cepas, logo em seguida vieram as espécies *Aniba roseodora* e *Sassafras albidum*, sendo que já havia sido citado o efeito antifúngico de *Aniba roseodora* por outros autores inibindo o crescimento de *E.coli* e *Staphylococcus aureus* [101,102]. O OE da espécie *Cinnamomum camphora* Nees, em um estudo realizado em 2010 mostrou atividade frente a 19 micro-organismos dentre eles, bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, utilizando mesma metodologia adotada neste estudo [104].

A atividade antimicrobiana deste OE pode ser atribuída à presença dos monoterpenos (α -pineno, β -pineno, limoneno) em maior concentração que no OE obtido das folhas, esta ação tem sido explicada pelo efeito tóxico na estrutura e função da membrana celular, como resultado do caráter lipofílico, os monoterpenos irão, preferencialmente, se deslocar da fase aquosa em direção às estruturas da membrana, o que resulta em expansão da membrana, aumento da fluidez e permeabilidade da membrana, desordenando as proteínas embebidas na membrana, inibindo a respiração e alterando o processo de transporte de íons [99,100]. Dessa forma, danos estruturais à membrana citoplasmática levam ao comprometimento das funções, como barreira seletiva e local de ação enzimática e geração de energia [99].

Portanto o próximo passo na avaliação da atividade deste OE é a capacidade de sinergismo com antibióticos disponíveis comercialmente.

5.8 *Análise Antitumoral*

5.8.1 *Análise antitumoral in vitro dos óleos de folhas e cascas de N. lanceolata*

No teste de capacidade antiproliferativa frente às nove linhagens de células cancerígenas, observou-se que a melhor atividade para o OE obtido das cascas (Tabela 7).

Tabela 7. Valores de TGI* ($\mu\text{g/mL}$) dos óleos de folhas e cascas de *N. Lanceolata*

Códigos	Células	Óleo cascas	Óleo folhas	Doxorrubicina
U251	Glioma SNC	37,3	75,8	0,83
MCF-7	Mama	77,0	89,0	9,8
NCI-ADR/RES 786-0	Ovário com fenótipo resistente	72,0	128,9	>25
	Rim	67,5	102,8	13,1
NCI-H40	Pulmão	70,1	85,6	12,9
PC-3	Próstata	47,0	>250	4,9
OVCAR-03	Ovário	61,6	195,2	5,5
HT29	Cólon	195,2	107,0	>25
K562	Leucemia	14,6	72,4	3,4
HaCat	Queratinócitos imortalizados	90,6	101,7	9,1
Média TGI**	—	71,4	>123,0	>11,2

Legenda; TGI= concentração (em $\mu\text{g/mL}$) necessária para inibir totalmente a proliferação celular; Média TGI= atividade citostática média da amostra considerando-se apenas linhagens tumorais.

O Instituto Nacional do Câncer Americano preconiza que um extrato é promissor quando o IC50 (capacidade de 50% de inibição) é inferior a 30 $\mu\text{g/mL}$ [111]. Para valores expressos em TGI os parâmetros encontrados apontam que valores de $\text{TGI} > 50$ ppm são considerados inativos, $15 \text{ ppm} < \text{TGI} < 50 \text{ ppm}$ são considerados fracamente ativos, $6,25 \text{ ppm} < \text{TGI} < 15 \text{ ppm}$ moderadamente ativos e valores de $\text{TGI} < 6,25 \text{ ppm}$ potencialmente ativos.

Portanto analisando os resultados obtidos pode-se observar que o óleo essencial (bruto) obtido das cascas apresentou melhor atividade contra duas, das nove células cancerígenas avaliadas (Glioma e Leucemia), com uma melhor atividade para a célula de leucemia, este resultado pode ser atribuído a presença dos compostos, borneol, cariofileno E, γ -terpineol, α -pineno, que apresentaram atividade antitumoral comprovada em estudos onde foram testados de forma isolada [26]. O limoneno, composto deste OE, também já foi alvo de diversos estudos contra células cancerígenas, e apresentou eficácia inibindo o crescimento de diversos tipos de tumores, entretanto a alta dose requerida (1000mg/kg/dia) limitou sua utilização clínica, atualmente outros monoterpenos têm sido estudados [103].

Através de dados literários analisados pode-se constatar que outras espécies da família Lauraceae tem apresentado atividade antitumoral como a espécie *N. membranosa* e também a espécie *N. salicina* que apresentou em seu OE os compostos α -pineno, β -pineno entre os compostos principais, e estes quando testados individualmente, são capazes de induzir toxicidade elevada sobre as células tumorais [31].

A análise destes dados literários e os resultados obtidos neste estudo relaciona novamente a atividade antitumoral do óleo essencial da casca da *N.lanceolata* a presença de um maior teor de monoterpenos quando comparado ao OE obtido das folhas da mesma espécie.

Atualmente muitos resultados dos ensaios antitumorais são expressos em inibição do crescimento total (TGI), devido a este fato a Tabela 7 apresenta estes valores. Conforme dados de TGI da literatura (112) pode-se atribuir que o óleo apresenta moderada atividade, contra a linhagem celular mais sensível, leucemia (K562). Esta atividade foi semelhante a dos óleos de *Magnolia ovata* (Magnoliaceae), os quais apresentaram valores de TGI próximos ao deste trabalho (12-16 mg.mL⁻¹) para células da linhagem câncer de mama (MCF7), próstata (PC3) e glioma (U251).

5.8.2 Fracionamento do óleo da casca e ensaios antitumorais

A fim de analisar o efeito do fracionamento na atividade antitumoral foram realizados testes contra duas linhagens celulares (786-0 e HT-29). Para estes ensaios antitumorais foram testadas seis frações obtidas do fracionamento do óleo das cascas de *N. lanceolata*, o qual se mostrou mais ativo quando comparado ao óleo das folhas. As frações foram obtidas a partir de cromatografia em camada delgada preparativa, procedimento este que utilizou 3 placas

para a obtenção das seis frações analisadas, as quais foram reunidas de acordo com o perfil cromatográfico em CCD. A Tabela 8 mostra as massas obtidas por placa após a purificação, com a aplicação de 100 mg de óleo.

Tabela 8. Quantidade de óleo nas frações, resultantes do fracionamento do óleo das cascas de *N. lanceolata* (quantidades obtidas por placa em mg)

Sigla da amostra	Nome	Quantidade (mg)
LC1C	Lauracea Casca Fração 1	6
LC2C	Lauracea Casca Fração 2	5
LC3C	Lauracea Casca Fração 3	16
LC4C	Lauracea Casca Fração 4	11
LC5C	Lauracea Casca Fração 5	17
LC6C	Lauracea Casca Fração 6	6

Após obtenção das frações em quantidades suficientes, as mesmas foram submetidas aos testes antitumorais, a fim de verificar se o enriquecimento de compostos ou mudanças no perfil químico, quando comparado ao óleo bruto, repercute em mudanças na atividade antitumoral. Para este teste usou-se duas células tumorais, sendo estas a linhagem 786-0 e HT-29. Foi também utilizada a célula normal, não tumoral, NIH-3T3. Os resultados de GI% estão expressos na Tabela 9 (em GI₅₀) e Tabela 10 (em TGI).

Tabela 9. Valores de GI₅₀ (µg/mL) em linhagem de células tumorais 786-0 e HT-29 e em células não tumorais NIH/3T3

Amostra	786-0	HT-29	NIH/ 3T3
Óleo casca	<0,25	<0,25	26,70
LC1C	0,77	<0,25	224,97
LC2C	3,37	<0,25	>250
LC3C	<0,25	9,53	>250
LC4C	5,85	<0,25	>250
LC5C	8,83	<0,25	82,39
LC6C	18,09	<0,25	65,87

DOXO 0,12 0,25 2,27

*Legenda; 786-0=Rim; HT-29=Cólon; NIH/3T3=Célula não tumoral.

Tabela 10. Valores de TGI ($\mu\text{g/mL}$) das frações do óleo das folhas contra linhagens de células tumorais 786-0 e HT-29 e em células não tumorais NIH/3T3.

AMOSTRA	786-0	HT-29	NIH/ 3T3
Óleo casca	67,5	195,2	90,6
LC1C	89,01	47,89	>250
LC2C	32,44	51,29	>250
LC3C	45,96	89,57	>250
LC4C	52,14	79,50	>250
LC5C	63,33	58,99	218,79
LC6C	70,21	39,58	132,89
DOXO	13,1	>25	9,1

*Legenda; 786-0=Rim; HT-29=Cólon; NIH/3T3=Célula não tumoral.

Conforme os resultados expostos nas Tabelas 9 e 10 podem-se observar, que o fracionamento do óleo das cascas, afetou a atividade das frações quando comparada ao óleo bruto. Através deste fracionamento, foram obtidas em quantidades significativas 6 frações, as quais foram encaminhadas para testes antiproliferativos contra células tumorais. Comparado com o óleo bruto das cascas, notou-se que as frações aumentam o poder de inibição de crescimento das células. Foram usadas as células 786-0 e HT-29, sendo estas linhagens tumorais e NIH/3T3 como linhagem não tumoral. Conforme a Tabela 10 pode-se observar que 4 frações acentuaram seu efeito quando comparado ao óleo bruto, no ensaio frente a linhagem 786-0, com destaque para a fração LC2C que apresentou o valor de TGI de 32,44 $\mu\text{g/mL}$. Já para as células tumorais HT-29, todas as frações apresentaram melhor efeito inibitório, quando comparadas ao valor de TGI do óleo bruto das cascas, sendo que a fração LC6C apresentou o menor valor de TGI (39,58 $\mu\text{g/mL}$).

Este fracionamento do óleo da casca possibilitou o enriquecimento de compostos em todas as frações obtidas. Na fração LC1C notou-se a maior quantidade de componentes, com destaque para os sesquiterpenos cadineno, óxido de cariofileno e cubenol. Esta fração foi a segunda mais ativa contra a linhagem HT-29 com valor de TGI 47,89 $\mu\text{g/mL}$.

Na fração LC2C a composição foi também predominante de sesquiterpenos com destaque para guaiol e α -cadinol. Na fração LC3C guaiol, cubenol e α -cadinol foram os principais sesquiterpenos identificados. Na fração LC4C guaiol e α -cadinol; na fração LC5C α -copaeno, cariofileno, allo-aromadendreno, óxido de cariofileno e cadineno); na fração LC6C cadineno, óxido de cariofileno, cubenol e α -cadinol, foram os principais componentes.

As (Figuras 29 á 35) demonstram o perfil das frações comparadas ao óleo bruto.

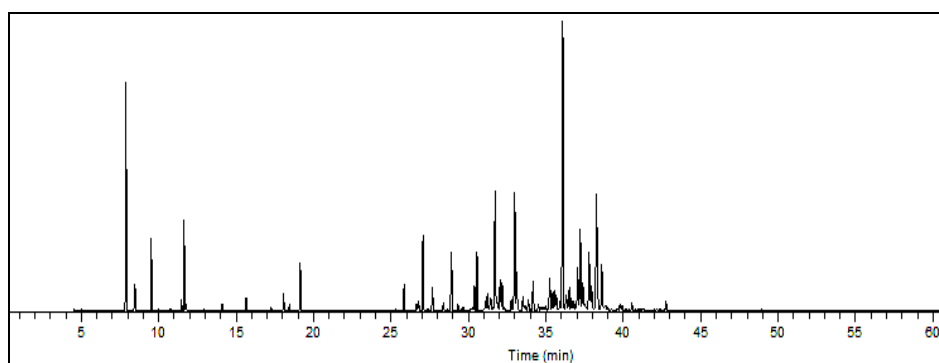


Figura 29. Cromatograma do óleo bruto da casca (*N. lanceolata*).

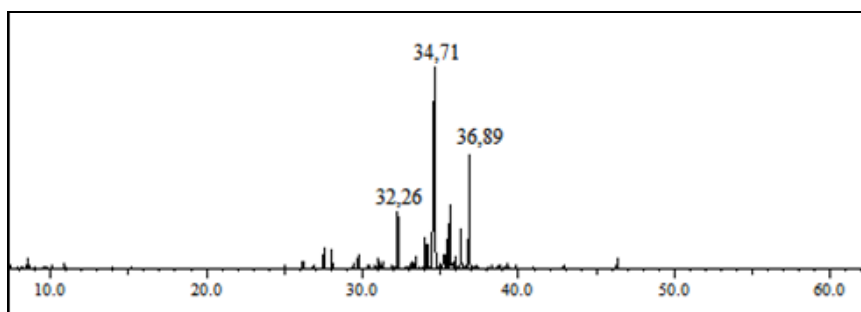


Figura 30. Cromatograma da fração 1, LC1C

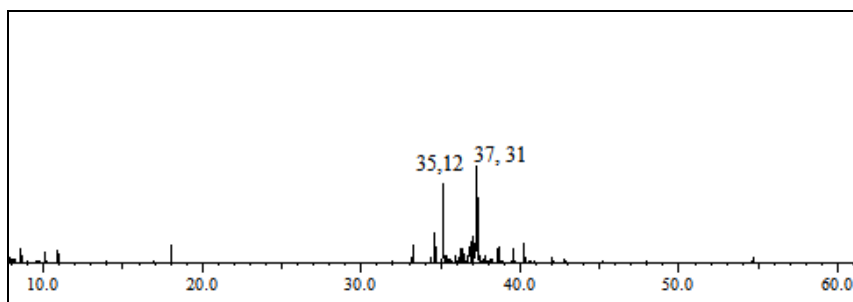


Figura 31. Cromatograma da fração 2, LC2C

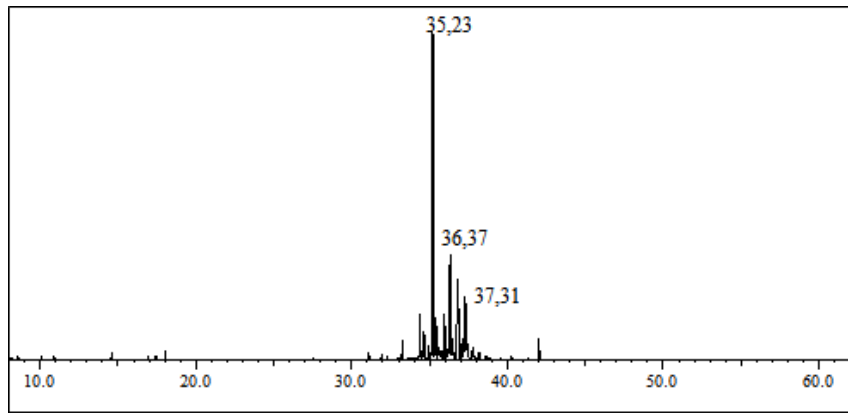


Figura 32. Cromatograma da fração 3, LC3C

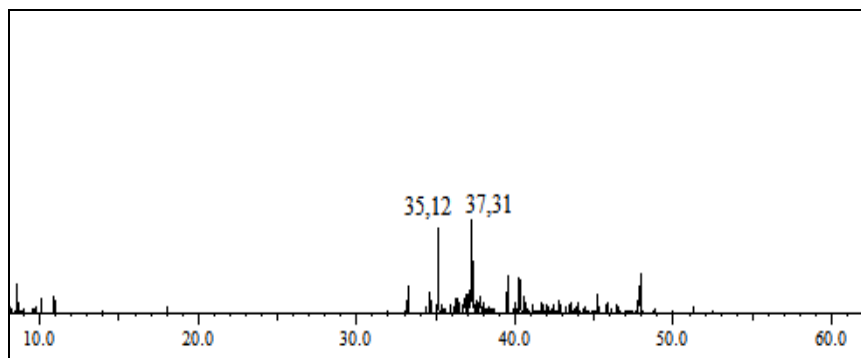


Figura 33. Cromatograma da fração 4, LC4C

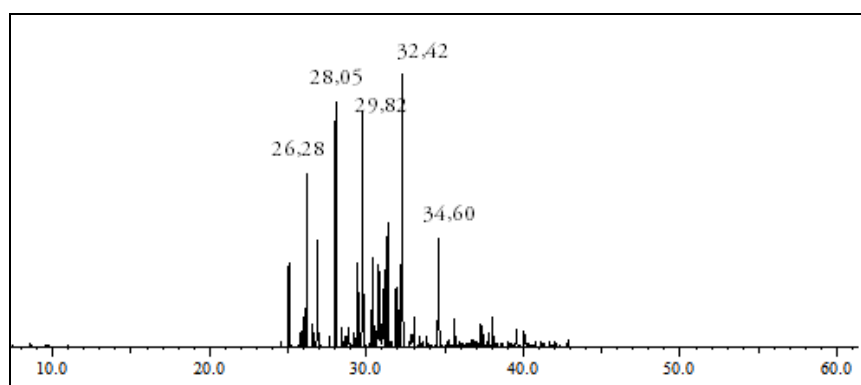


Figura 34. Cromatograma da fração 5, LC5C

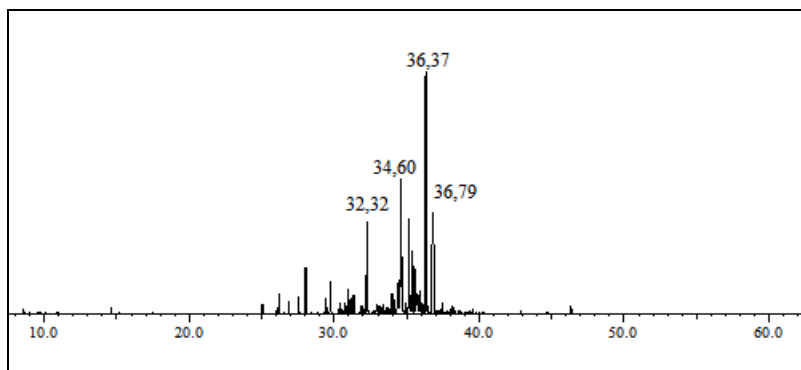


Figura 35. Cromatograma da fração 6, LC6C

A identificação dos compostos principais das frações, foi baseada em análises dos índices de retenção de Kovats e pelos espectros de massas dos compostos. Nas Figuras 36 á 41 são expostos os espectros destes compostos, os quais foram os majoritários nas frações.

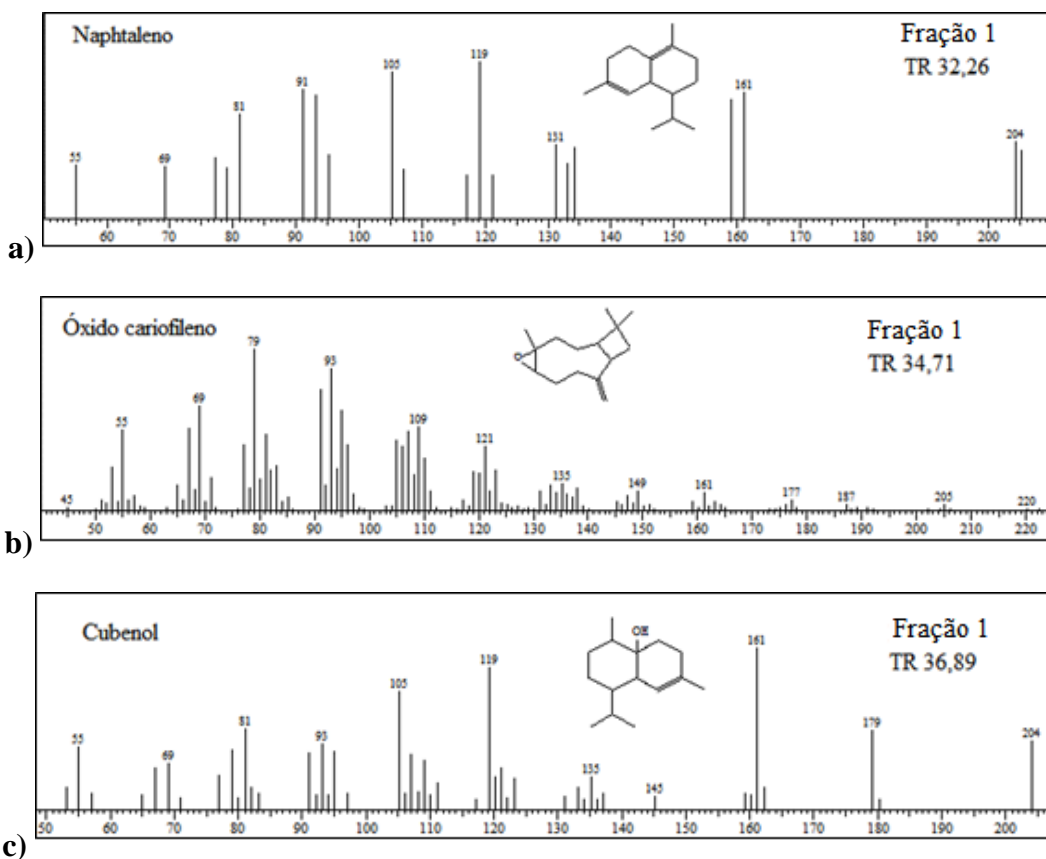


Figura 36. Espectros (a, b,c) dos principais compostos da fração 1, LC1C

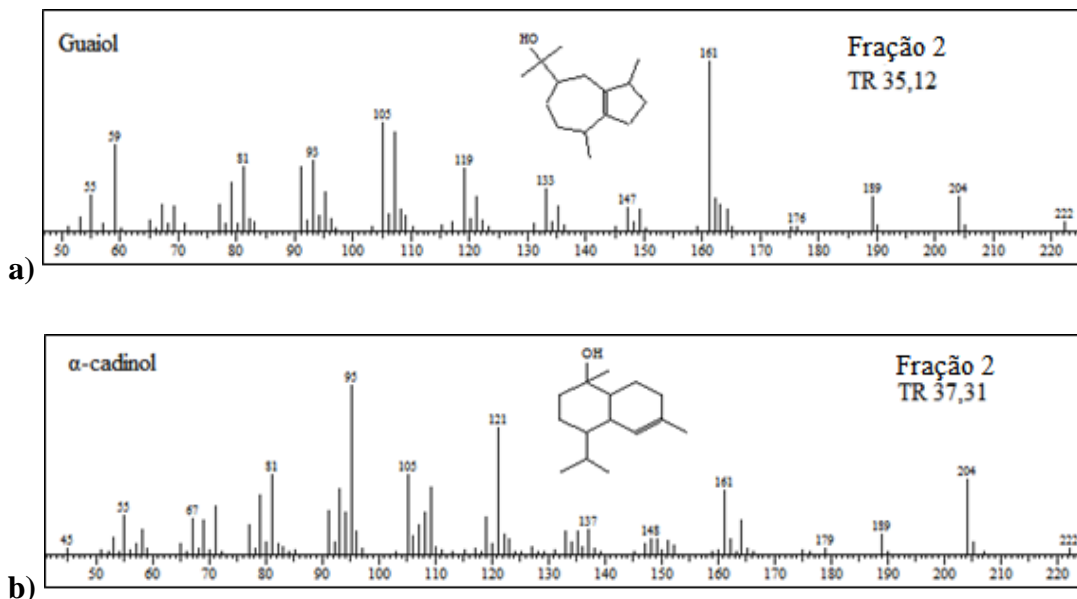


Figura 37. Espectros (a, b) dos principais compostos da fração 2, LC2C

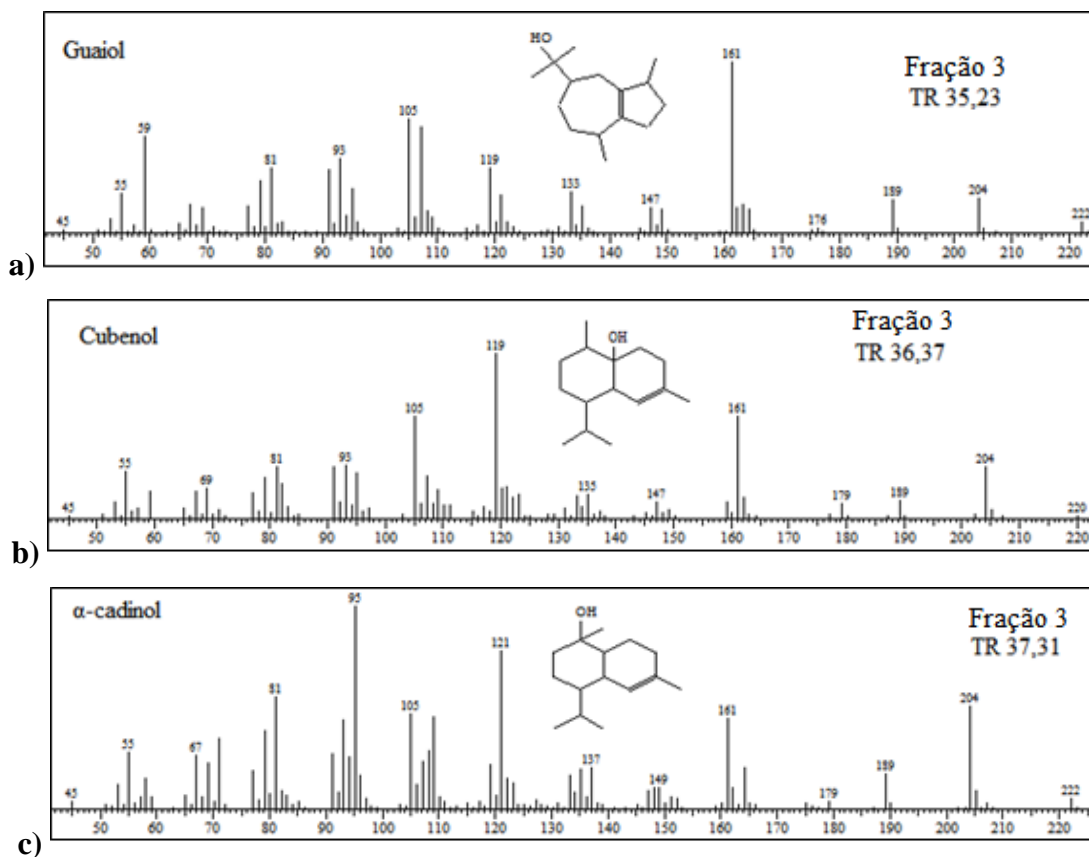


Figura 38. Espectros (a, b, c) dos principais compostos da fração 3, LC3C

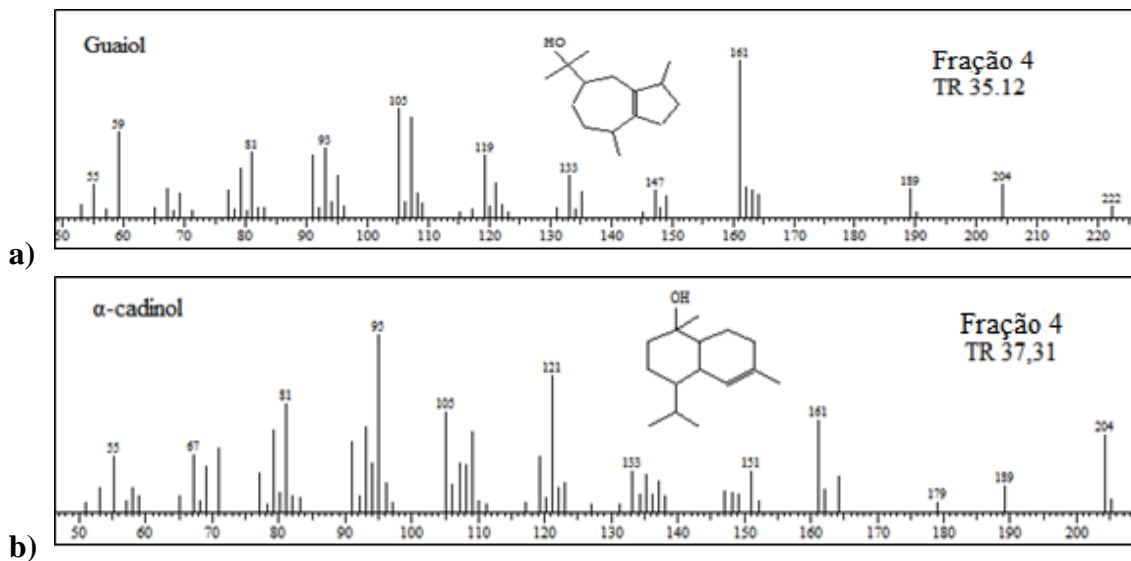
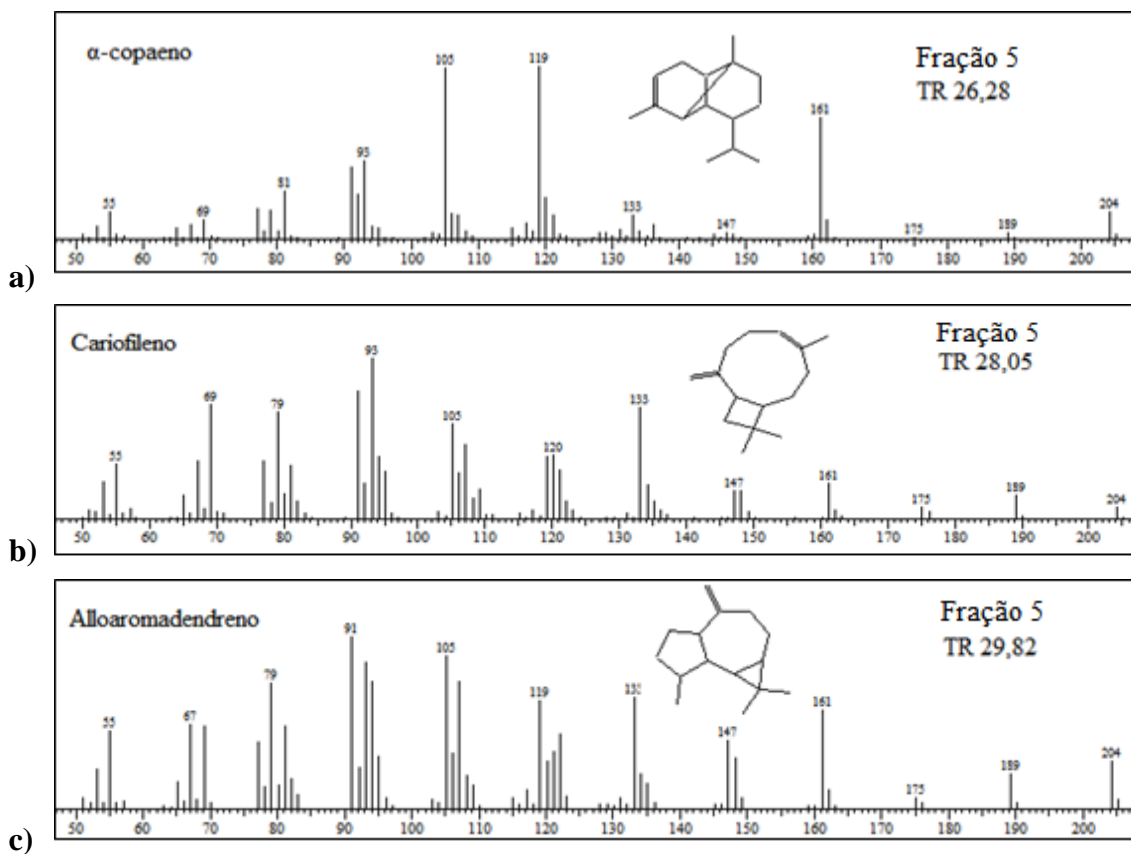


Figura 39. Espectros (a, b) dos principais compostos da fração 4, LC4C



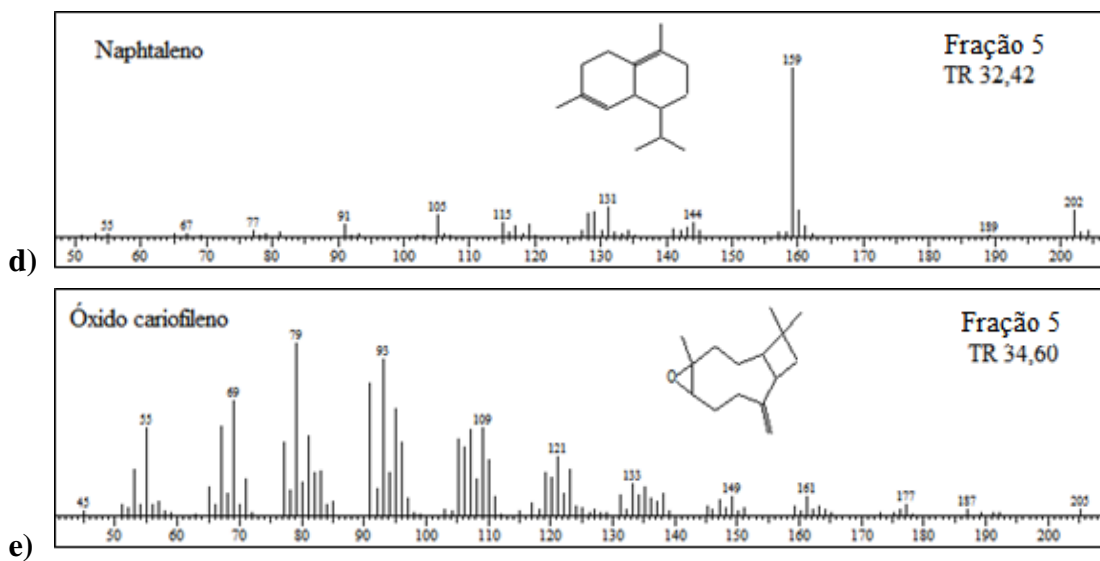
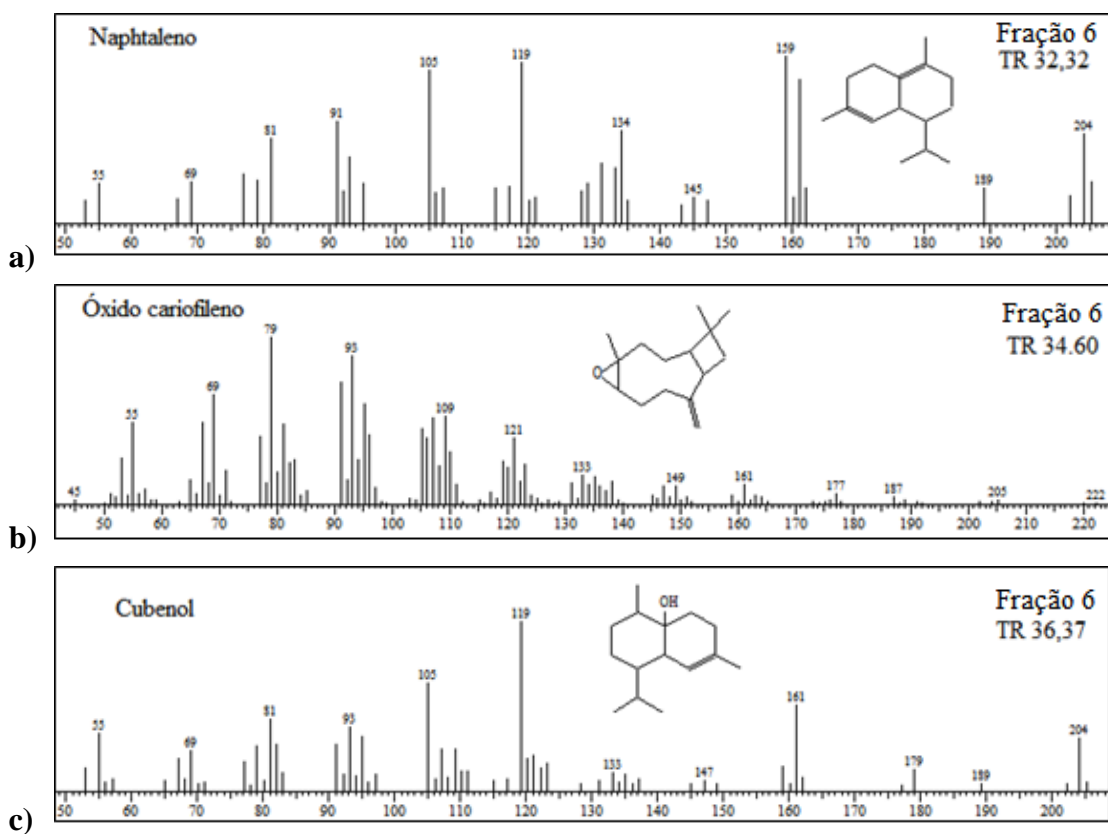


Figura 40. Espectros (a, b, c, d, e) dos principais compostos da fração 5, LC5C



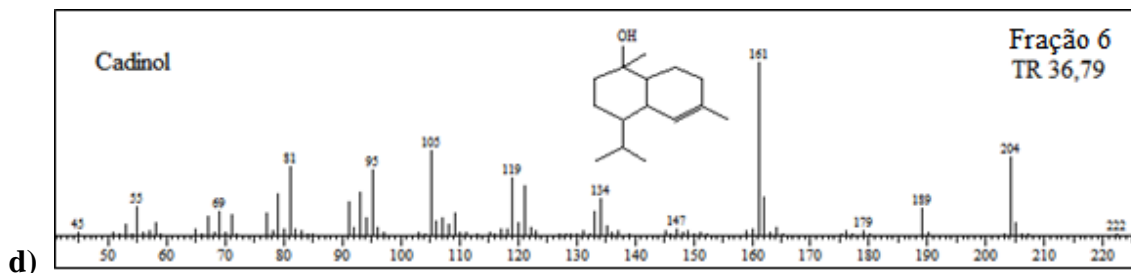


Figura 41. Espectros (a, b, c, d) dos principais compostos da fração 6, LC6C.

6 CONCLUSÃO

Os óleos essenciais de *N. lanceolata* foram obtidos com rendimentos de 0,09% para folhas e 0,04% para cascas.

A composição de componentes voláteis foi diferente para as partes estudadas (folhas e cascas). Nas folhas o principal composto encontrado foi o biciclogermacreno enquanto no OE da casca foi o guaiol, os monoterpenos α -pineno, β -pineno e limoneno estão presente em ambos os óleos voláteis, porém em maior proporção no OE das cascas, assim como o sesquiterpeno α -cubebeno. Os sesquiterpenos cariofileno E e β -bourboneno estão presentes em maior proporção no óleo das folhas, além destas diferenças em proporções dos constituintes em cada OE também é notável a diferença na presença de monoterpenos em maior porcentagem no OE das cascas.

Os óleos foram testados contra a bactéria resistente *Acinetobacter baumannii*, onde se observou que o OE das cascas foi mais ativo apresentando um halo de inibição de 18 mm, sendo que a bactéria é sensível ao óleo. O óleo das folhas apresentou-se inativo.

Foi possível o isolamento de um composto na forma pura a partir do óleo essencial das cascas, o sesquiterpeno γ -patchouleno, portanto a casca pode ser fonte natural deste composto.

Os óleos foram testados em ensaios antitumorais contra 9 linhagens de células tumorais, os resultados demonstraram que o óleo essencial das cascas é mais ativo. A linhagem mais sensível ao óleo das cascas foi K562 (leucemia) com valor de TGI igual a 14,6 mg.mL⁻¹.

Já para o óleos essenciais das folhas a linhagem mais sensível foi também a K562 (leucemia), porém com um valor de TGI mais elevado (72,4 μ g.mL⁻¹).

O óleo das cascas foi fracionado visando um estudo de atividade bioquímica, relacionada à atividade antitumoral. Foram obtidas 6 frações com quantidades significativas de terpenos, em todas as frações foram observados enriquecimentos de componentes quando comparados ao óleo bruto.

As frações foram testadas contra duas linhagens (786-0 e HT-29). A maioria das frações apresentou melhoria na atividade quando comparada ao óleo bruto. Os valores mais significativos de TGI foram para a fração LC2C ($32,44 \mu\text{g.mL}^{-1}$) contra linhagem celular 786-0 e LC6C ($39,58 \mu\text{g.mL}^{-1}$) contra HT-29. Tal resultado demonstra que o fracionamento pode ser útil no estudo de atividades biológicas de óleos essenciais, podendo resultar em atividades relevantes.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, pp. 446-475, 2008.
 2. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **Aromatic natural raw materials – Vocabulary**. ISO 9235:1997. Genebra, 1997. 14p
 3. PYBUS, D.H.; SELL, C.S. **The Chemistry of Fragrances**; Eds.; The Royal Society of Chemistry: Cambridge, UK.1999
 4. SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Florianópolis: Editora da UFSC, 2001, pp. 397-417.
 5. DE ARAÚJO, D.A.M.; FREITAS, C.; CRUZ, J. S. Essential oils components as a new path to understand ion channel molecular pharmacology. **Life Sciences**, v.89, p. 540-544,2011.
 6. BASER, K.H.C.; BUCHBAUER, G. **Handbook of essential oils: Science, technology, and applications**. Boca Raton: CRC Press/Taylor e Francis, 2010.975
 7. FIGUEREDO, A.C. et al. Factor affeting secundar metabolite production in plants voltile componentes and essential oils. **Flavours ans Fragrance Journal**, v.23, n. 4, p. 213-226, 2008.
 8. BARRA, A. Factors affeting chemical variability of essential oils: A review of recente developments. **Natural Product Communications**, v. 4,n.8, p. 1147-1154,2009.
-
-

9. NAVARRETE, A.; WALLRAF, S.; MATO, R. B.; COCERO, M. J. Improvement of Essential Oil Steam Distillation by Microwave Pretreatment. **I&EC Research**, v. 50, p. 4667-4671, 2011.
10. CASSEL, E.; VARGAS, R. M. F.; MARTINEZ, N.; LORENZO, D.; DELLACASSA, E. Steam distillation modeling for essential oil extraction process. **Industrial Crops and Products**, v. 29, p. 171-176, 2009.
11. YUSOFF, Z. M.; NORDIN, M. N. N.; RAHIMAN, M. H. F.; ADNAN, R.; TAIB, M. N. Characterization of Down-Flowing Steam Distillation System using Step Test Analysis. **IEEE CSGRC**, p. 197-201, 2011.
12. SILVA, M. G. F.; **Atividade antioxidante e antimicrobiana in vitro de óleos essenciais e extratos hidroalcoólicos de manjerona (*Origanum majorana* L.) e manjeriço (*Ocimum basilicum* L.)**. 2011. 70 f. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso Superior de Química – Bacharelado em Química Industrial/Licenciatura em Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2011.
13. SARTOR, R. B. **Modelagem, Simulação e Otimização de uma Unidade Industrial de Extração de Óleos Essenciais por Arraste a Vapor**. Dissertação (Mestrado em Pesquisa e Desenvolvimento de Processos). Escola de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2009.
14. FILIPPIS, F. de M. **Extração com CO₂ supercrítico de óleos essencial de Honsho e Ho-sho- experimentos e modelagem**. 2001. 114f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2001.
15. FÜLLER, T. N.; 2008. **Caracterização fenotípica, fitoquímica e molecular de populações de *Elionurus* SP. Humb. & Bompl ex Willd (capim-limão)**. Dissertação
-
-

(Mestrado em Fitotecnia). Faculdade de Agronomia - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2008.

16. BIASI, L.A.; DESCHAMPS, C., 2009, Plantas aromáticas: do cultivo à produção de óleo essencial. Curitiba: Layer Studio Gráfico e Editora Ltda.

17. STEFFANI, E. **Modelagem matemática do processo de extração supercrítica de óleo essencial de Ho-Sho (*Cinnamomum camphora* Nees & Eberm var. *linaloolífera* Fujita) Utilizando CO₂**. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Santa Catarina, 2003.

18. MACHADO, B. F. M. T.; FERNADES Jr., A. Óleos essenciais: aspectos gerais e usos em terapias naturais. **Cadernos Acadêmicos**, v. 3, n. 2, p. 105-127, 2011.

19. SERAFINI, L. A.; SANTOS, A. C. A.; TOUGUINHA, L. A.; AGOSTINI, G.; DALFOVO, V. 2002. *Extrações e aplicações de óleos essenciais de plantas aromáticas e medicinais*. Caxias do Sul: EDUCS.

20. PINHEIRO, A. L. Produção de óleos Essenciais, Viçosa: CPT, 2003.

21. SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTEZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 5ª ed., Porto Alegre – Florianópolis. Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, 2003.

22. BIZZO, H. R; HOVELL, A. M; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: Aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, v.32.,nº3, p. 588-594, 2009.

23. BURT, S. Essential oils: Their antibacterial properties and potencial applications is foods. **International Journal of Food Microbiology** v. 94 p.223-253 2004

24. DE ALMEIDA, R.N.; AGRA, M.F.; MAIOR, F.N.; DE SOUZA, D.P. Essential oils and their constituents: anticonvulsant activity. **Molecules**, v.16, p.2726-2742, 2011.

25. SANTOS, M.R.V; MOREIRA, F.V; FRAGA, B.P; DE SOUZA, D.P; BONJARDIM, L.R; QUINTANS-JUNIOR, L.J. Cardiovascular effects of monoterpenos: a review. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.21, p. 764-771, 2011.
26. BHALLA, Y.; GUPTA, V.K.; JAITAK, V. Anticancer activity of essential oils: a review. **Journal of Science of food and agriculture**, DOI:10.1002/JSFA.6267, p.1-11, 2013.
27. MORAES, P.L.R. Sinopse das lauráceas nos Estados de Goiás e Tocantins, Brasil. **Biota Neotropica**, v.5, n.2, 253-270,2005.
28. WERFF, H; WAN DER; RICHTER, H. G. Toward and improved classification of Lauraceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 8, p. 419-432, 1996.
29. BAITELLO, J. B. A importância das Lauráceas na Mata Atlântica Brasileira. São Paulo: Secretaria do Meio Ambiente, 2014. Disponível em: <http://www.ambiente.sp.gov.br/pequisa_ambiental/pesquisas/a-importancia-das-lauraceas-na-mata-atlantica-brasileira/>. Acesso em: 26 de nov. de 2015.
30. SOUZA, V. C.; LORENZI, H. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. São Paulo, **Instituto Plantarum**, p. 74, 2005.
31. WRIGHT, B.S.; BANSAL, A.; MORIARITY, D.M.; TAKAKU, S.; SETZER, W.N.; **Nat. Prod. Commun.** 2007, 2, 1241.
32. MARQUES, C. A. Importância econômica da família Lauraceae lindl. **Floresta e Ambiente Seropédica**, v. 8, n. 1, p. 195-206, 2001.
33. CRAVEIRO, A. A. et al. **Óleos essenciais de plantas do Nordeste**. Fortaleza, edições UFC, 1981.
-

34. GUTERRES, Z. R. **Investigação das atividades mutagênciã, antiimutagênciã e antioxidante de extratos etanólicos de *Aiouea trinervis*, *Nectandra cissiflora*, *Ocotea minarum* (Lauraceae) e dos alcaloides triptofol, ocateína e dicentrina.** 2008. Tese (Doutorado em Genética e Bioquímica) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2008.
35. MELO, J. O. et al. Anti-inflammatory activity of crude extract and fractions of *Nectandra falcifolia* leaves. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 29, n. 11, p. 2241-2245, 2006.
36. LORENZI, H.E.; MATOS, F.J. Plantas medicinais no Brasil/ Nativas e exóticas. **Nova Odessa: Instituto Plantarum**, 2002, v.1, 512 p.
38. MARIN, R.; SILVA, G. T.; FONTOURA, J. B.; GIORDANI, R. B.; HENRIQUES, A. T.; APEL, M. A. Composição química do óleo essencial obtido de *Nectandra megapotamica* (Spreng) Chodat et Hassler do Sul do Brasil. In: 33A REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 2010, Águas de Lindóia. **Anais... Águas de Lindóia**, 2010.
39. QUINET, A.; ANDREATA, R. H. P. Lauraceae Jussieu na Reserva Ecológica de Macaé de Cima, Município de Nova Friburgo, Rio de Janeiro, Brasil. **Rodriguésia, Rio de Janeiro**, v. 53, n. 82, p. 59-121, 2002.
40. CUNICO, M. M.; VIEIRA, G.; LIMA, C. P.; CÔCCO, L. C.; YAMAMOTO, C. I.; AUER, C. G.; SANQUETTA, C. R. Estudo Preliminar Antimicrobiano e Fitoquímico do Óleo Essencial Foliar da *Nectandra grandiflora* Nees (canela-amarela). in: International Conference on Education for Sustainable Development, 2010, Curitiba. **Anais... Curitiba**, 2010.
-

41. RIBEIRO, A. B.; BOLZANI, V. S.; YOSHIDAB, M.; SANTOS, L. S.; EBERLIND, M. N.; SILVA, D. H. S. A New Neolignan and Antioxidant Phenols from *Nectandra grandiflora*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Campinas, v. 16, n. 3, p. 526-530, 2005.
42. MORENO, P. R. H. et al. Chemical constituents and antitumor activity of *Nectandra grandiflora*. **International Journal of Pharmacognosy**, v.31, p.189-192, 1993.
43. SANGIRARDI, JR.; Botânica fantástica: plantas da mitologia, religião, magia. **Ed. Brasiliense**, Pp. 113, ilustr., São Paulo, 1984.
44. QUINET, A.; ANDREATA, R. H. P. Lauraceae Jussieu na Reserva Ecológica de Macaé de Cima, Município de Nova Friburgo, Rio de Janeiro, Brasil. **Rodriguésia, Rio de Janeiro**, v. 53, n. 82, p. 59-121, 2002.
45. ZANIN, S.M.W.; LORDELLO, A.L.L. Alcaloides aporfinóides do gênero *Ocotea* (Lauraceae). **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 92-98, 2007.
46. BAZEMORE, R.; ROUSEFF, R.; NAIM, M. Linalool in orange juice: origin and thermal stability. **J. Agric. Food Chem.** 2003, *51*, 196 -199.
47. MONDELLO, L.; VERZERA, A.; PREVITI, P.; CRISPO, F.; DUGO, G. Multidimensional capillary GC-GC for the analysis of complex samples. Enantiomeric distribution of monoterpene hydrocarbons, monoterpene alcohols and linalyl acetate of bergamot (*Citrus bergamia* Risso et Poiteau) oils. **J. Agric. Food Chem.** 1998, *46*, 4275-4282.
48. BASER, K. H. C.; DEMIRCI, B.; DEMIRCI, F.; HASHIMOTO, T.; ASAKAWA, Y.; NOMA, Y. Cytogenetic toxicity of leaf extract of *Putranjiva roxburghii*, a medicinal plant. **Planta Med.** 2002, *68*, 564-567.
-

49. CONSOLI, F .L.; WILLIAMS, H. J.; VINSON, S. B.; MATTHEWS, R. W.; COOPERBAND, M. F. Trans-bergamotene, male pheromone of the ectoparasitoid *Melittobia digitate*. **J. Chem. Ecol.** 2002, 28, 1675-1689.
50. VAN DEN BOOM, C. E. M.; VAN BEEK, T. A.; POSTHUMUS, M. A.; DE GROOT, A.; DICKE, M. Qualitative and quantitative variation among volatile profiles induced by *Tetranychus urticae* feeding on plants from various families. **J. Chem. Ecol.** 2004, 30, 69-89.
51. LOCKWOOD, G. B. Techniques for gas chromatography of volatile terpenoids from a range of matrices. **J. Chromatogr., A** 2001, 936, 23-31.
52. DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G.; NOBLE, R. C.; SURAI, P. Evaluation in vitro of plant essential oils as natural antioxidants. **J. Essent. Oil Res.** 1995, 7, 645,651.
53. UTAMA, I. M. S.; WILLIS, R. B. H.; BEN-YEHOSHUA, S.; KUEK, C. In vitro efficacy of plants volatiles for inhibiting the growth of fruit and vegetable decay microorganisms. **J. Agric. Food Chem.** 2002, 50, 6371–6377.
54. BEN-YEHOSHUA, S.; RODOV, V.; PERETZ, J.; Constitutive and induced resistance of citrus fruits against pathogens. In G. I. Johanson, E. Highly, D. C. Joyce (Eds.), Disease resistance in fruits. ACIAR Proceeding. Canberra, Australia: Australian Centre for International Agricultural Research. **1998**, 80, 78–89.
55. KARATZAS, A. K.; BENNIK, M. H. J.; SMID, E. J.; KETS, E. P. W.; Combined action of S- carvone and mild head treatment on *Listeria monocytogenes* Scott A. **J. Appl. Bacteriol.** 2000, 89, 296–301.
56. VAZQUEZ, B. I.; FENTE, C.; FRANCO, C. M.; VAZQUEZ, M. J.; CEPEDA, A.; Inhibitory effects of eugenol and thymol on *Penicillium citrinum* strains in culture media and cheese **Int. J. Food Microbiol.** 2001, 67, 157–163.
-

57. GANG, D.R. Evolution of flavors and scents. *Annu. Rev. Plant Biol.*, v.56 p. 301-325. 2005
58. DUDAREVA N, PICHERSKY E, GERSHENZON J. Biochemistry of plant volatiles. *Plant Physiol.* n. 135 p. 893-902.2004
59. PICHERSKY E, GANG DR. Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. *Trends Plant Sci.* v 5 p.439-450.2000
60. SCHIESTL FP, AYASSE M. Do changes in floral odor cause speciation in sexually deceptive orchids? *Plant Syst. Evol.* 234:111-119.2002
61. DELL, B.B.; McCOMB, A.J. Plant resins – Their formation, secretion and possible functions. In: *Advances in Botanical Research.* ed. **H.W. Woolhouse** Vol. 6, Academic Press. 1987
62. KELSEY, R.G., REYNOLDS, G.W. & RODRIGUEZ, E. 1984. The chemistry of biologically active constituents secreted and stored in plant glandular trichomes. In: Rodriguez E., Healey, P.L. & Mentha, I. (eds) **Biology and chemistry of plant trichomes** **Plenum Press.**
63. CHERCHI, G.; DEIDDA, D.; DE GIOANNIS, B.; MARANGIU, R.; REVERCHON, E. Extraction of *Santolina insularis* essential oil by supercritical carbon dioxide: influence of some process parameters and biological activity. *Flavour Frag. J.*1999, 14, 214.
64. SIMÕES, C. M. O. ; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O. ; SCHENCKEL, E.P.; GOSMANN, G. ; MELLO, J.C.P. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 5. ed. Porto Alegre/ Florianópolis: UFRGS/ UFSC, 2004, 467-495
-

65. FERRAZ, J.B.S.; BARATA, L.E.S.; SAMPAIO, P.B.; GIMARÃES, G.P. Perfumes da floresta Amazônica: em busca de uma alternativa sustentável. **Ciência e Cultura**, v. 61: 3, 45-53, 2009.
66. CASTRO, H. G.; FERREIRA, F. A.; SILVA, D. J. H.; MOSQUIM, P. R. Contribuição ao estudo das plantas medicinais: metabólitos secundários. Visconde do Rio Branco-MG: **Editora Suprema**, 2001, 104p.
67. SILVA, A. F. S. *Hippeastrum vittatum* (L'Hér) Herbert e *Hippeastrum striatum* (Lam.) Moore: análise química e avaliação biológica dos alcalóides isolados. 2005. 207 f. Tese de Doutorado, Faculdade de Farmácia, Univ. Federal do Rio Grande do Sul - RS.
68. ADAMS, R.P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy**. Illinois EUA: Allured Publishing Corporation, Carol Stream, 804p.
69. CLSI- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Normas de desempenho para testes de sensibilidade antimicrobiana. 15º suplemento informativo. ANVISA, 2008. Disponível em : <[http:ANVISA.com.br](http://ANVISA.com.br)> Acesso em:27 dez.2015.
70. HABBAL, O.; EL-HAG, A. H.; AL-MAHROOQI, Z.; AL-HASHMI, N.; AL-BIMANI, Z.; AL-BALUSHI, M. S.; AL-JABRI, A. A. Antibacterial activity of Lawsonia inermis Linn (Henna) against Pseudomonas aeruginosa. **Asian Pac J Trop Biomed**, vol. 1, n. 3, p. 173-176, 2011.
71. FANKAM, A. G.; KUETE, V.; VOUKENG, I. K.; KUIATE, J. R.; PAGES, J. M. Antibacterial activities of selected Cameroonian spices and their synergistic effects with antibiotics against multidrug-resistant phenotypes. **BMC Complement Altern Med**, vol. 11, p. 104, 2011.
-

72. AKERELE, O.; Summary of WHO guidelines for assessment of herbal medicines. **Herbal Gram** 1993, 28, 13.

73. SILVA, D. T. **Óleos essenciais de Nectandra grandiflora e Ocotea acutifolia: rendimento, composição química e atividades biológicas.** Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), 2013.

74. VITTI, A. M. S.; BRITO, J. O. Avaliação do rendimento e do teor de citronelal do óleo essencial de procedências e raças locais de *Eucalyptus citriodora*. **Scientia Florestalis**, n.56, p. 145-154, 1999.

75. TAVEIRA, F. S. N. et al. Seasonal essential oil variation of *Aniba canelilla*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 25, p. 222-232, 2007.

76. CASTELLANI, D. C. et al. Produção de óleo essencial em canela (*Ocotea odorifera* Vell) e guaçatonga (*Casearia sylvestris* Swarts) em função da época de colheita. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.8, n.4, p. 104-107, 2006.

77. BRITO, A. F. R. **Análise da variação sazonal e das atividades antifúngica e antimicrobiana em óleos essenciais de *Ocotea porosa* (Nees) Barroso e *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez.** 2009. 121 f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

78. VALENTINI, C. M. A. et al. Variação annual do rendimento e composição química dos componentes voláteis da *Siparuna guianensis* Aublet. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p.1506-1509, 2010.

79. PATTNAIK, S. et al. Antibacterial and antifungal activity of aromatic constituents of essential oils. **Microbios**, v.89, n.358, p.39-46, 1997.

80. VAN ZYL, R.L. et al. The biological activities of 20 nature identical essential oil constituents. **Journal of Essential Oil Research**, v.18, p.129-33, 2006.
81. DUARTE, M.C.T. et al. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.111, p.197-201, 2007.
82. JIROVETZ, L. et al. Purity, antimicrobial activities and olfactic evaluations of geraniol/nerol and various of their derivatives. **Journal of Essential Oil Research**, v.19, n.3, p.288-91, 2007.
83. WANG, R.; YANG, B. Extration of essential oils from five Cinnamon leaves and identification of their volatile compound compositions. **Innovative Food Science and Emerging Technologies** v.10 p. 289-292, 2009.
84. MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods** v.65, p.55-63, 1983.
85. RUBINSTEIN, L.V.; SHOEMAKER, K.D.; PAULL, R.M.; SIMON, S.; TOSINI, P.; SKEHAN, D.A.; SCUDIERO, A.; MONKS, M.; BOYD, M.R. Comparison Of In Vitro Anticancer-Drug-Screening, **Journal of The National Cancer Institute**. v.82, p.1113-1118, 1990.
86. HOUGHTON, P.; FANG, R.; TECHATANAWAT, I.; STEVENTON, G.; HYLANDS, P. J.; LEE, C.C. The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity. **Methods**, v. 42: 377-387, 2007.
87. RUFINO, M.S.M., ALVES, R.E.; BRITO, E.S.; MORAIS, S.M.; SAMPAIO, C.G.; JIMENEZ, J.P.; CALIXTO, F.D.S. Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. **Comunicado Técnico Embrapa**, 127: 1-4, 2007.
-

88. SOUSA, C.M.M.; SILVA, H.R.; VIEIRA, G.M.; AYRES, M.C.C.; COSTA, C.S.; ARAÚJO, D.S. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, 30(2): 351-355, 2007.
89. COLLINS, H.C.; BRAGA, L.G.; BONATO, S.P. Fundamentos de Cromatografia. 6. ed, Campinas: **Ed. Unicamp**, 2006, p.17-275.
90. SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. Tradução de Paula Fernandes de Aguiar e Ricardo Bicca de Alencastro. Rio de Janeiro: LTC, 2000, 508p.
91. SOUZA, G.H.B.; MELLO, J.C.P.; LOPES, N.P.; Revisões em Processos e Técnicas Avançadas de Isolamento e Determinação Estrutural de Ativos. **Plantas Mediciniais**, Ouro Preto: UFOP, 2012, 312p.
92. DEROGIS, P.B.; MARTINS, F.T.; SOUZA, T.C.; MOREIRA, M.E.; SOUZA, F.J.D.; DORIGUETTO, A.C.; SOUZA, K.R.; VELOSO, M.P.; SANTOS, M.H. Complete assignment of the ¹H and ¹³C-NMR spectra of garciniaphenone and keto-enol equilibrium statements for prenylated benzophenones. **Magnetic resonance in chemistry**, v. 46, 278–282, 2008.
93. LUZYANIN K, ABRANTES M. Ressonância magnética nuclear – ferramenta versátil em química farmacêutica e imagiologia médica. **Química**, v. 117, 25-30, 2010.
94. MORAIS, A. A.; MOURÃO, J. C.; GOTTLIEB, O. R.; KOKETSU, M.; MOURA, L. L.; SILVA, M. L.; MARX, M. C.; MENDES, P. H.; MAGALHÃES, M. T. Óleos terpênicos do Estado do Rio de Janeiro. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 44, supl., p. 320-322, 1972.
95. TORRES, A. M.; RICCIARDI, G. A. L.; AGRELO, D. E.; NASSIF, A. E.; RICCIARDI, A. I. A.; DELLACASSA, E. **Examen del aceite esencial de Nectandra angustifolia**
-

(Schrad.) Nees & Mart. ex Nees. Argentina: Universidad Nacional de Nordeste, 2005. (Comunicaciones Científicas y Tecnológicas, E-013).

96. CHAVERRI, C.; CICCIO, J.F. Essential oils of the genus *Ocotea* (Lauraceae) in Costa Rica. I. *Ocotea brenesii*. **Revista de Biología Tropical**, v. 53 p. 431-436. 2005

97. PESSOA, O. D.; CARVALHO, C. B. M.; SILVESTRE, J. O. V. L.; LIMA, M. C. L.; NETO, R. M.; MATOS, F. J. A.; LEMOS, T. L. G. Antibacterial activity of the essential oil from *Lippia aff. gracillis*. **Fitoterapia**, vol. 76 n. 7-8, p. 712-714, 2005.

98. KUETE, V.; POUMALE, H.M.; GUEDEM, A.N.; SHINO, Y.; RANDRIANASOLO, R.; NGADJUI, B.T. Evaluation of *Antiaris africana* methanol extract and compounds for antioxidant and antitumor activities. **Pharm. Biol.** v. 76, 536-542, 2010.

99. SIKKEMA, J.; DE BONT, J. A. M.; POOLMAN, B. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. **The Journal of Biological Chemistry**, New York, v. 269, p. 8022-8028, 1994.

100. TROMBETTA, D. et al. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.49, n.6, p.2474-8, 2005.

101. SIMIÉ, A.; SOKOVIÉ, M. D.; RISTIÉ M.; GRUJIÉ-JOVANOVIÉ, S.; VUKOJEVIÉ, J.; MARIN, P. D. The chemical composition of some Lauraceae essential oils and their antifungal activities. **Phytotherapy Research**, London, v. 18, p. 713-717, 2004.

102. HAMMER, K. A.; CARSON, C.F.; RILEY, T.V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. **Journal of Applied Microbiology**, v. 86, 1999.

103. DE OLIVEIRA, M.M.J. **Atividade antitumoral do álcool e ácido perílico em células de leucemia mielóide crônica e glioblastoma multiforme.** Universidade Federal Fluminense. Dissertação de mestrado, 2010.

104. CANSIAN, R. L. et al. Atividade antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial de ho-sho (*Cinnamomum camphora* Ness e Eberm Var. *Linaloolifera fujita*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, n. 2, p. 378-384, 2010.
105. COLLINS, H.C.; BRAGA, L.G.; BONATO, S.P.; Fundamentos de Cromatografia. 6. ed, Campinas: Ed. Unicamp, 2006, p.17-275.
106. SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. Tradução de Paula Fernandes de Aguiar e Ricardo Bicca de Alencastro. Rio de Janeiro: LTC, 2000, 508p.
107. WAGNER, H.; BLADT, S. Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas. 2.ed. Berlin: Springer, 1996.
108. SANTOS, S. F.; NOVALES, M. G. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. **Current Opinion in Biotechnology**, 23, 1-6, 2011.
109. FERREIRA, P.M.P.; FARIAS, D.F.; VIANA, M.P.; SOUZA, T.M.; VASCONCELOS, I.M.; SOARES, B.M.; PESSOA,C.; COSTA-LOTUFO, L.V.; MORAES, M.O.; CARVALHO, A.F.U. Study of the antiploriferative potential of seed extracts from Northeastern Brazilian plants. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, v.83, p.1045-1058, 2011.
110. SKEHAN, P.; STORENG. R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; MCMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J.T.;BOKESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M.R.. New Colorimetric Cytotoxicity Assay For Anticâncer- Drug Screening. **Journal of The National Cancer Institute** v. 82, p. 1107-1112, 1990.
-

111. SUFFNESS M; PEZZUTO, J.M. (1991) In Assay Related to Cancer Drug Discovery. In Hostettmann, K., Ed., Methods in Plant Biochemistry. **Assays for Bioactivity** Vol. 6, Academic Press, USA.
112. YAMAGUCHI, K.K.L.; ALCANTARA, J.M.; VEIGA, J.F.V. Investigação do potencial antioxidante e anticolinesterásico de 20 espécies da família Lauraceae. **Acta Amaz.**, Manaus, v. 42, n. 4, p. 541-546, 2012 .
113. GARCEZ, R.F et al . Fenilpropanóides e outros constituintes bioativos de *Nectandra megapotamica*. **Química Nova**, São Paulo , v. 32, n. 2, p. 407-411, 2009 .
114. MILCHARD, M.J. et al. Application of Gas-Liquid Chromatography to the analysis of essential oils. Fingerprints of 12 essential oils. **Perfumer & Flavorist**, v.29, n.5, p. 28-36, 2004.
115. SINGH, M.; SHARMA, S.; RAMESH, S. Herbage, oil yield and oil quality of patchouli [*Pogostemon cablin* (Blanco) Beth.] influenced by irrigation, organic mulch and nitrogen application in semi-arid tropical climate. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 16, p. 101-107, 2002.
116. KHARE, C. P. **Indian Medicinal Plants: an illustrated dictionary**, Springer: New Delhi, 2007. 900p.
117. WEI, A.; SHIBAMOTO, T. Antioxidant activities and volatile constituents of various essential oils. **Journal of Agricultural And Food Chemistry**, v.55, n.5, p.1737-1742, 2007.
118. PAVELA, R. Insecticidal activity of some essential oils against larvae of *Spodoptera littoralis*. **Fitoterapia**, v.76, n.7-8, p. 691-696, 2005.
119. SALERNO, A.R.; REBELO, A.M.; SILVA JUNIOR, A.A. Plantas aromáticas para cultivo em Santa Catarina. **Agropecuária Catarinense**, v.17, n.2, p.46-49, 2004.
-

120. DEGUERRY, F. et al. The diverse sesquiterpene profile of patchouli, *Pogostemon cablin*, is correlated with a limited number of sesquiterpene synthases. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 37, p. 123-136, 2006.
121. HU, L.F. et al. GC-MS fingerprint of *Pogostemon cablin* in China. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 42, n. 2, p. 200-206, 2006.
122. BURÉ, C.M.; SELIER, N.M. Analysis of the essential oil of Indonesian patchouli (*Pogostemon cablin* Benth.) using GC/MS (EI/CI). **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 16, n. 1, p. 17-19, 2004.
123. PIRES, C. H., PAULA, J. A., TRESVENZOL, L. M. F., FERRI, P. H., PAULA, J. R., FIUZA, T. S., & BARA, M. T. F. (2014). Composição química e atividade antimicrobiana dos óleos essenciais das folhas e flores de *Callistemon viminalis* (sol. ex Gaertn.) G. Don ex Loudon (Myrtaceae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, 34(4), 597-601.
124. SARTORATTO, A.; MACHADO, A. L. M.; DELARMELINA, C.; FIGUEIRA, G. M.; DUARTE, M. C. T.; REHDER, V.L .G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 275-280, 2004.
-
-

8 APÊNDICE

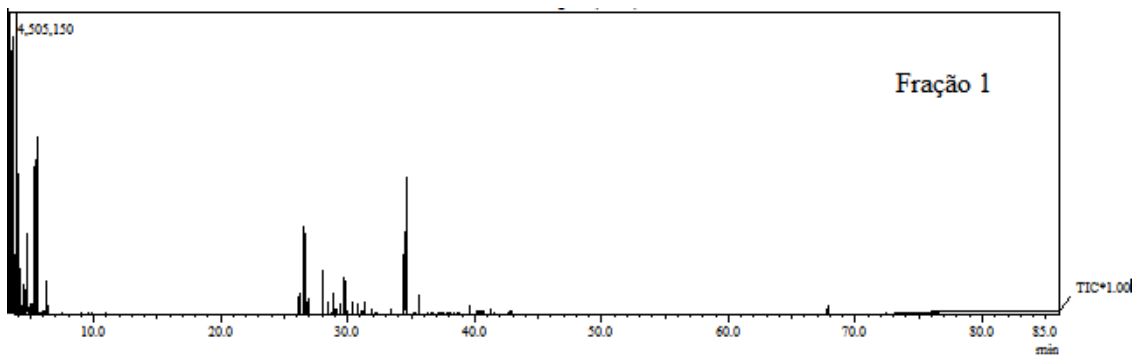


Figura 42. Cromatograma obtido por CG-EM para fração 1 do OE das folhas

Fonte: Acervo pessoal

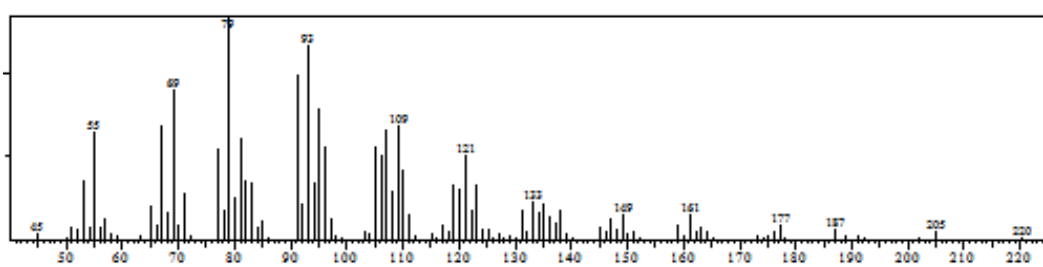


Figura 43. Espectro obtido por CG-EM para fração 1 do OE das folhas

Fonte: Acervo pessoal

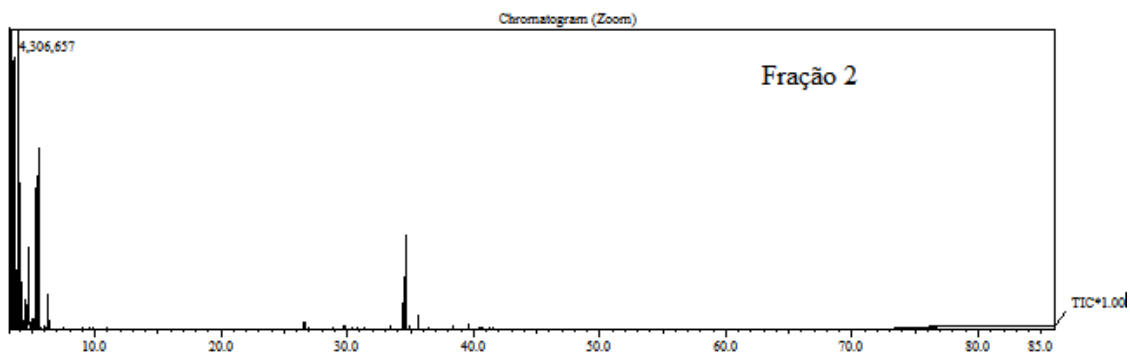


Figura 44. Cromatograma obtido por CG-EM para fração 2 do OE das folhas

Fonte: Acervo pessoal

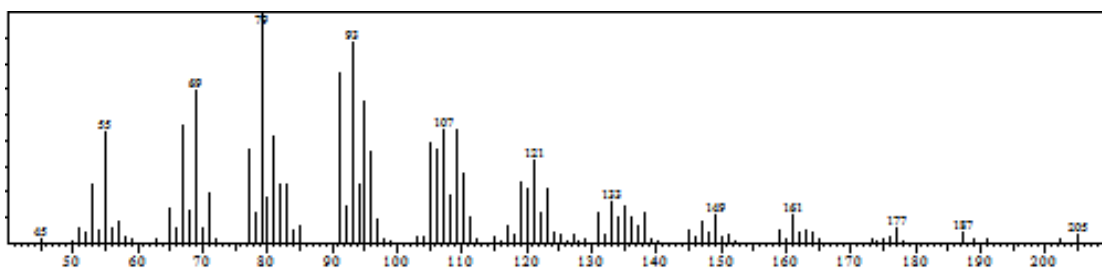


Figura 45. Espectro obtido por CG-EM para fração 2 dos OE das folhas

Fonte: Acervo pessoal

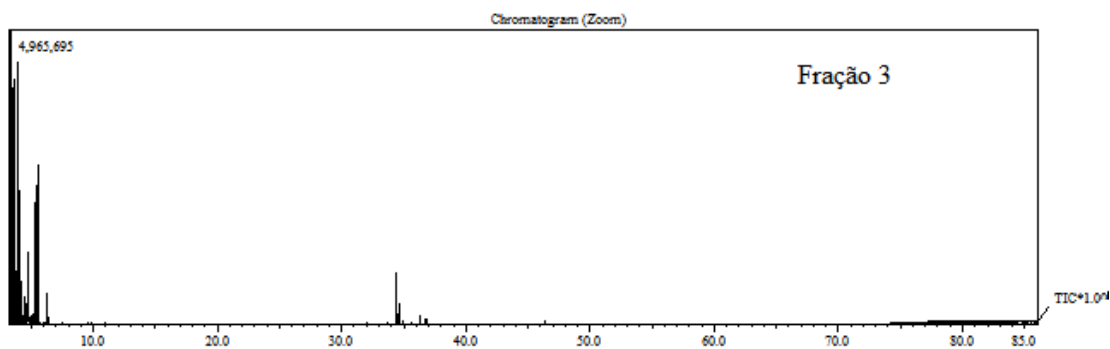


Figura 46. Cromatograma obtido por CG-EM para fração 3 do OE das folhas

Fonte: Acervo pessoal

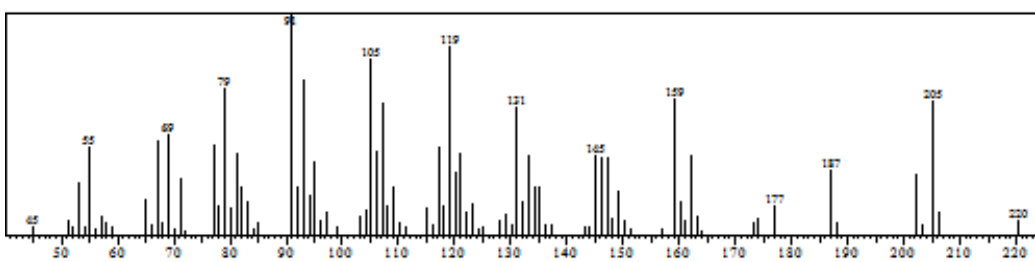


Figura 47. Espectro obtido por CG-EM para fração 3 do OE das folhas

Fonte: Acervo pessoal

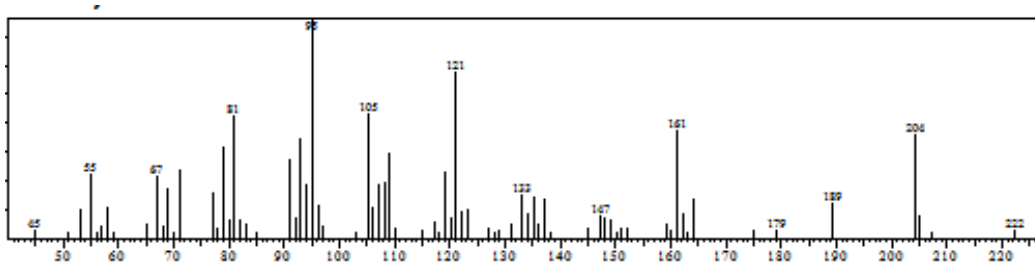


Figura 48. Espectro obtido por CG-EM para fração 5 do OE das folhas

Fonte: Acervo pessoal

