



Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul
Unidade Universitária de Dourados
Programa de Pós- Graduação em Recursos Naturais

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DA
OCOTEA DIOSPYRIFOLIA (MEZ) (LAURACEAE) E AÇÃO
SINÉRGICA**

Acadêmica: Elisandra de Oliveira Santos

Dourados – MS
Junho/2016



**COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DA
OCOTEA DIOSPYRIFOLIA (MEZ) (LAURACEAE) E AÇÃO
SINÉRGICA**

Acadêmica: Elisandra de Oliveira Santos
Orientador: Dr. Rogério César de Lara da Silva

“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
Junho/2016



Ficha catalográfica

S234c Santos, Elisandra Oliveira

Composição química do óleo essencial da *Ocotea diospyrifolia* (Mez) (Lauraceae) e ação sinérgica/ Elisandra de Oliveira Santos. Dourados, MS: UEMS, 2016.
67p. ; 30cm.

Dissertação (Mestrado) – Pós Graduação em Recursos Naturais – UEMS, 2016.

Orientador: Prof. Dr. Rogério César de Lara da Silva.

1. Óleo essencial 2. *Ocotea diospyrifolia* 3. Antibióticos 4. Índice de retenção I. Título

CDD 23.ed. 668.5

ELISANDRA DE OLIVEIRA SANTOS

COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DA *Ocotea diospyrifolia* (MEZ) (LAURACEAE) E AÇÃO SINÉRGICA

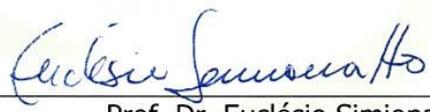
Este exemplar compreende a redação final da dissertação de mestrado defendida por Elisandra de Oliveira Santos.

Dourados/MS, 28 de julho de 2016.

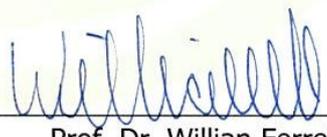
Banca Examinadora:



Prof. Dr. Rogério Cesar de Lara da Silva –
Presidente



Prof. Dr. Euclésio Simionatto



Prof. Dr. Willian Ferreira da Costa



Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul
Unidade Universitária de Dourados
Programa de Pós- Graduação em Recursos Naturais

DEDICATÓRIA

“Deus e a minha amada família”



AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus primeiramente que sempre me guiou nessa caminhada me dando força para continua-la.

Aos meus pais Eliseu Ferreira dos Santos e Maria do Socorro de Oliveira Santos que sempre deram apoio e amor incondicional em todos os momentos da minha vida, além de me ensinarem valores que sempre levarei comigo.

E meus avós Roque Ferreira dos Santos (*in memoriam*) e Zilda Alves Moreira dos Santos por serem pessoas tão carinhosas e atenciosas.

E minhas amigas de longa data Débora de Freitas Brotto e Deluana Martins Neto, Tatiane Azevedo Ferreira Jheyner Luzia Garutti por todo companheirismo e atenção de sempre.

E aos Amigos do laboratório 2 de Química Orgânica: Cleber Langalaite Nicolau, Gabriela Moessa Louro, Érica Rodrigues Costa, Valdete de Souza da Silva, Jaqueline Candido Machado da Silva e Viviane Malmann por todos os momentos de descontração e ajuda e a todos os amigos de mestrado e a Michela Holsback Nakasato pelas análises de sensibilidade antimicrobiano.

Aos Professores Dr. Rogério por ter me concedido a orientação no desenvolvimento da dissertação e ajuda ao Professor Dr. Euclésio Simionatto por todo o seu auxílio na pesquisa ao Prof. Dr. Willian Ferreira da Costa do COMCAP da Universidade Estadual de Maringá-PR pelas análises de CG-EM.



EPIÍGRAFE

“Podemos acreditar que tudo que a vida nos oferecerá no futuro é repetir o que fizemos ontem e hoje. Mas, se prestarmos atenção, vamos nos dar conta de que nenhum dia é igual a outro. Cada manhã traz uma benção escondida; uma benção que só serve para esse dia e que não se pode guardar nem desaproveitar.

Se não usamos este milagre hoje, ele vai se perder.

Este milagre está nos detalhes do cotidiano; é preciso viver cada minuto porque ali encontramos a saída de nossas confusões, a alegria de nossos bons momentos, a pista correta para a decisão que tomaremos.

Nunca podemos deixar que cada dia pareça igual ao anterior porque todos os dias são diferentes, porque estamos em constante processo de mudança.”

(Paulo Coelho)



RESUMO

Neste trabalho avaliou-se a composição química do óleo essencial da *Ocotea diospyrifolia* (Mez) (Lauraceae) através de técnicas cromatográficas e sua atividade antimicrobiana frente a quatro bactérias sendo duas gram-positivas *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* e duas gram-negativas *Escherichia coli* e *Acinetobacter baumannii*. As amostras de folhas e cascas do material biológico foram coletadas na região do município de Japorã - MS. A extração do óleo essencial foi realizada em extrator de Clevenger por 6 h possibilitando um rendimento de 2,31% para folhas e 0,22% para as cascas. Análises cromatográficas foram realizadas por cromatografia gasosa com detecção por ionização em chama e por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas para a identificação dos constituintes químicos por meio da biblioteca Nist Search e pela determinação do índice de retenção. Nas folhas os compostos majoritários foram identificados como β elemeno (12,40%) e o espatulenol (21,79%) que são comuns ao gênero. Para as cascas foram identificados como majoritários os sesquiterpenos α - copaeno (8,01%) e γ - cadineno (8,51%). O teste de sensibilidade antimicrobiano mostrou uma eficácia perante as bactérias gram-positivas *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus* diferentemente da bactéria gram-negativa *Escherichia coli* que não mostrou nenhuma inibição por parte do óleo essencial testado. Para a *Acinetobacter baumannii* houve uma fraca atividade em relação ao óleo essencial da casca testada. O teste de sinergismo mostrou uma eficiência por parte do óleo essencial das cascas frente á bactéria gram- negativa *Acinetobacter baumannii*, portadora do gene de resistência *bla_{oxa-23}*. Houve uma redução de 4 horas no crescimento bacteriano em combinação entre o óleo e o antibiótico polimixina B.

Palavras chaves: óleo essencial, *Ocotea diospyrifolia*, antibióticos, índice de retenção.



ABSTRACT

This study evaluated the chemical composition of the essential oil of *Ocotea diospyrifolia* (Mez) (Lauraceae) via chromatographic techniques and their antimicrobial activity against two gram-positive bacteria (*Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus*) and two gram-negative bacteria (*Escherichia coli* and *Acinetobacter baumannii*). Samples of leaves and bark of the biological material were collected in the region of Japorã - MS. The oil extraction was performed in Clevenger extractor for 6 h allowing a yield of 2.31% to 0.22% for leaves and bark. Chromatographic analyzes were conducted by gas chromatography with flame ionization detection and gas chromatography-mass spectrometry for the identification of chemical constituents through the NIST library search and determining the retention index. For leaves the major compounds were identified as β - elemene (12.40%) and spathulenol (21.79%) that are common to the genre. For the majority shells were identified as the α -copaene sesquiterpenes (8.01%) and γ - cadinene (8.51%). The antimicrobial susceptibility test was effective against gram-positive bacteria *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus* in contrast to Gram-negative bacterium *Escherichia coli* showed no inhibition of essential oil tested. For the *Acinetobacter baumannii* showed a low activity compared to the essential oil test. Synergism testing showed an efficiency of the essential oil from the peels against Gram-negative bacteria *Acinetobacter baumannii*, carrier-resistance of gene *bla_{oxa-23}*. There was a reduction of 4 hours in bacterial growth in combination of the oil and the antibiotic polymyxin B.

Key words: essential oil, *Ocotea diospyrifolia*, antibiotics, retention index, synergism;

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mostra a origem dos fenilpropanóides e terpenóides.	16
Figura 2. <i>Ocotea diospyrifolia</i> (Lauraceae).	25
Figura 3. (a) cascas e (b) folhas da <i>Ocotea diospyrifolia</i> utilizadas na hidrodestilação.	27
Figura 4. Aparelho tipo Clevenger acoplado a um balão de fundo redondo.	28
Figura 5. Óleos essenciais (a) folhas e (b) cascas.	34
Figura 6. Cromatograma obtido por CG-DIC para o óleo das cascas da <i>Ocotea diospyrifolia</i> em coluna 5% fenil e 95% de polidimetilsiloxano.	35
Figura 7. Cromatografia obtido por CG-DIC para o óleo das folhas da <i>O. diospyrifolia</i> em coluna 5% fenil e 95% de polidimetilsiloxano.	35
Figura 8. Perfil cromatográfico das folhas via CCD com diferentes proporções de fase móvel (hexano/acetato de etila): (a) 90:10 ; (b) 80:20 e (c) 85:15.	36
Figura 9. Perfil de separação das cascas via CDD com proporções diferentes (hexano /acetato de etila): (a) 85:15; (b) 80:20 e (c) 90:10.	37
Figura 10. Cromatograma de íons totais obtidos por CG-EM para o óleo das folhas da <i>O. diospyrifolia</i>	38
Figura 11. Cromatograma de íons totais obtidos por CG-EM para o óleo essencial das cascas	41
Figura 12. Cromatogramas obtidos por CG-EM para as frações das folhas.	44
Figura 13. Cromatogramas obtidos por CG-EM para as frações das cascas.	45
Figura 14. Curvas de sobrevivência adquiridas para a bactéria <i>Acinetobacter baumannii</i> contra o óleo da casca da <i>O. diospyrifolia</i> (4) x IPM durante o período de 24 horas. Com interação do óleo essencial e o antibiótico Imipenem.	52
Figura 15. Curvas de sobrevivência adquiridas para a bactéria <i>Acinetobacter baumannii</i> contra o óleo da casca da <i>O. diospyrifolia</i> (4) x IPM durante o período de 24 horas. Com interação do óleo essencial e o antibiótico Imipenem.	52



LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação de quantidades de átomos de carbono e suas unidades de isopreno e respectivamente suas nomenclaturas.	17
Tabela 2. Os 18 principais óleos essenciais no mercado mundial.	19
Tabela 3. Relação dos compostos identificados para o O.E da folha com índice de retenção e suas respectivas concentrações no CG-EM e CG-DIC.	38
Tabela 4. Relação dos compostos identificados para o O.E da casca com o índice de retenção e suas respectivas concentrações no CG-EM e CG-DIC.	41
Tabela 5. Compostos majoritários para as frações das folhas analisadas por CG-EM. ...	45
Tabela 6. Compostos majoritários para as frações das cascas analisadas por CG-EM. .	47
Tabela 7. Valores do halo de inibição (mm) nas três bactérias analisadas frente ao óleo da <i>O. diospyrifolia</i> (5 µL) contra ao padrão de cloranfenicol. (n=3).....	49
Tabela 8. Associação óleo essencial da <i>Ocotea diospyrifolia</i> e antibióticos e a bactéria <i>Acinetobacter baumannii</i>	51



LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

O.E: Óleo essencial

CG-DIC: Cromatografia gasosa de ionização em chama

CCD: Cromatografia em camada delgada

CG-EM: Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas

O. diospirifolia : *Ocotea diospyrifolia*

ATCC: *Americam Type Culture Collection*

E. coli: *Escherichia coli*

S. aureus: *Staphylococcus aureus*

S. faecalis: *Enterococcus faecalis*

cm⁻¹: centímetros⁻¹

µL: Microlitros

Swab: haste com algodão

UFC: Unidade formadora de colônias

mL: mililitros

AB: Antibiótico

CLSI: Laboratory Standards Stitute

Log : Logaritimo



SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1.Óleos Essenciais (O.E)	15
2.2 Classificação	15
2.3 Tipos de Extração	17
2.4 Histórico de Óleos Essenciais no Brasil	18
2.5 Mercado e Aplicações dos Óleos Essenciais	19
2.6 Atividade Antimicrobiana dos Óleos Essenciais	22
2.7 <i>Ocotea Diospyrifolia</i> (meisn.) Mez (Lauraceae).....	23
3. OBJETIVOS GERAIS	26
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
4. MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1 Materiais e Reagentes	27
4.2 Coleta e Preparo do Material botânico	27
4.2.1 Extração do óleo essencial.....	27
4.2.2 Cromatografia Gasosa (CG-DIC)	28
4.2.3 Cromatografia de Camada Delgada (CCD).....	29
4.2.4 Cromatografia em Camada Delgada Preparativa	29
4.2.5 Cromatografia Acoplada á Espectrometria de Massas (CG-EM)	30
4.2.6 Cálculo do Índice de Retenção.....	30
4.2.7 Teste de Sensibilidade Antimicrobiano.....	30
4.2.8 Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	31
4.2.9 Teste de Sinergismo Utilizando o Método Time-kill.....	32
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1 Extração do Óleo Essencial.....	34
5.2 Cromatografia Gasosa (CG-DIC)	34
5.3 Cromatografia de Camada Delgada (CCD).....	36
5.4 Cromatografia gasosa acoplada á espectrometria de massas (CG-EM) e calculo do índice de retenção índice de retenção (IR).....	37



5.5 Análise das frações	43
5.6 Teste de Sensibilidade Antimicrobiano	48
5.7 Concentração Inibitória Mínima (CIM)	50
5.8 Sinergismo Entre Óleo Essencial e Antibiótico pelo Método Time-kill	50
6. CONCLUSÃO	53
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

1. INTRODUÇÃO

As plantas apresentam compostos químicos que exibem atividades biológicas diferentes, resultantes do metabolismo secundário, sendo alguns principais compostos bioativos desses metabolitos os terpenos, fenóis e alcalóides (BOBACH *et al.*, 2014). Apresentam uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais constituem modelos para síntese de um grande número de fármacos. O fato que gera interesse nos produtos encontrados na natureza é que esses apresentam enorme diversidade em termos de estrutura e de propriedades físico-químicas e biológicas que podem ser aplicados na indústria farmacêutica e cosméticos (NISBET & MOORE, 1997).

O metabolismo das plantas divide-se em dois: primário e secundário. O primário corresponde ao processo de manutenção celular, essencial a todas as plantas, algumas substâncias como: carboidratos, lipídeos, proteínas e clorofila participam desse processo. Já o metabolismo secundário é relativo aos compostos que são vantajosos a alguns processos. Inclui nestes a defesa contra patógenos e herbívoros, atrativos de polinizadores, permitindo tolerâncias como: temperaturas extremas, adaptação e estresse hídrico ou deficiência de nutrientes e minerais do solo (PROBST, 2012).

Os óleos essenciais (O.E) são oriundos do metabolismo secundário das plantas. Constituem os elementos voláteis contidos em muitos órgãos vegetais como: flores, caules, folhas, cascas, ramos e raízes, e estão relacionados com diversas funções necessárias à sobrevivência vegetal, exercendo papel fundamental na defesa contra microrganismos, óleos essenciais possuem propriedades químicas que podem ser utilizadas como inseticidas, além do uso na indústria de cosméticos e perfumaria (GONZALEZ, *et al.*, 2014). Apresentam respostas a estímulos ambientais diversificados que podem ser de natureza física, química ou biológica. Alguns fatores como fertilidade, tipo de solo, radiação solar, temperatura e poluição atmosférica, dentre outros podem influenciar e alterar a composição química dos vegetais. (ANGNES, 2005).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Óleos Essenciais (O.E)

Os óleos essenciais são líquidos voláteis aromáticos, obtidos a partir de material vegetal por meio de destilação a vapor, são também denominados óleos voláteis, óleos éterios e essência, apresentando solubilidade em solventes orgânicos (TRIPATHI *et al.*, 2006). Os O.E são compostos constituídos quimicamente por substâncias terpênicas ou fenilpropanóides. Apresentam como características principais:

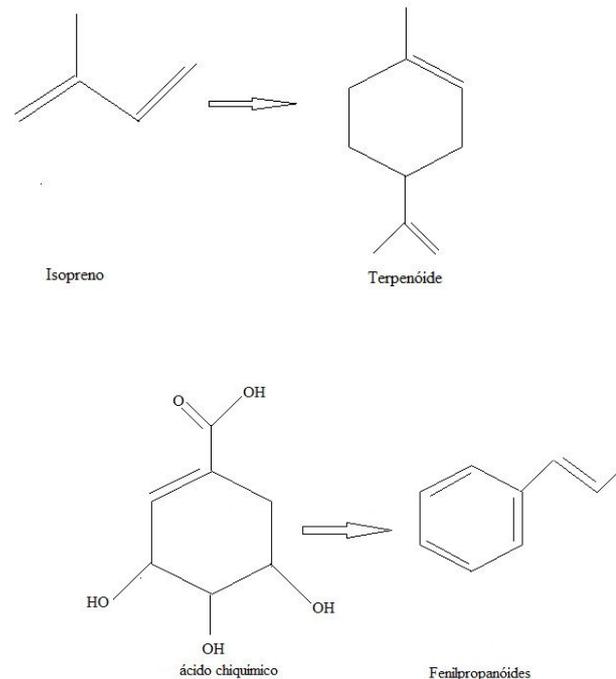
- aparência oleosa à temperatura ambiente;
- aroma intenso podendo ser de característica agradável ou não;
- solubilidade em solventes orgânicos apolares. Em água apresentam solubilidade limitada, mas suficiente para aromatizar as soluções aquosas, que são denominadas hidrolatos;
- sabor: geralmente acre (ácido) e picante;
- cor: quando recentemente extraídos são geralmente incolores ou ligeiramente amarelados;
- estabilidade: em geral não são muito estáveis, principalmente na presença de ar, calor, luz, umidade e metais;

seus constituintes variam desde hidrocarbonetos terpênicos, alcoóis simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas, e até compostos com enxofre (SIMÕES *et al.*, 2003).

2.2 Classificação

Em relação a suas estruturas podem apresentar moléculas de fenilpropanóides e isopreno (Figura 1) sendo esta última à base para os terpenóides que fazem parte de cerca de 90% da composição química dos óleos essenciais (SIMÕES *et al.*, 2010).

Figura 1.Mostra a origem dos fenilpropanóides e terpenóides.



FONTE: LUPPE, 2007

Em relação à origem de todos os metabólitos secundários, pode ser resumida por meio de dois intermediários, que são derivados da glicose: o ácido chiquímico e o acetil-CoA. O ácido chiquímico origina os aminoácidos aromáticos, fenilalanina e tirosina, que ao passar por várias reações, irão resultar na formação dos fenilpropanóides e o acetil-CoA, que são precursores de vários tipos de substâncias, como terpenóides, esteróis, ácidos graxos entre outras (SIMÕES *et al.*, 2003). A Tabela 1 mostra as nomenclaturas derivadas das unidades de isopreno.

A formação da unidade isoprênica ocorre pela desidratação do ácido mevalônico e assim é produzido o isopentil difosfato (IPP), onde ocorre por meio de isomerização ocorrendo a transformação em dimetilalil difosfato (DMAPP). Pelo intermediário 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato (DXPS), origina-se o 2-c-metil-D-eritritol-4-fosfato, por meio das consecutivas reações que sofre forma o isopentenildifosfato (IPP) e o dimetilalil difosfato (DMAPP). As reações de condensação de unidades pentacarbonadas formadas (IPP e DMAPP), forma á síntese de outros constituintes terpênicos. A partir do ácido chiquímico formam-se os fenilpropanóides, que resultam os aminoácidos fenilalanina e tirosina que por

ação da enzima fenilalanina amonialiase (FAL) ocorre a perda de uma molécula de amônia, que por sua vez formam os ácidos cinâmico e p-cúmarico (GOMES, 2014).

Tabela 1. Relação de quantidades de átomos de carbono e suas unidades de isopreno e respectivamente suas nomenclaturas.

Átomos de carbono	Unidades de isopreno	Nomenclatura
10	2	Monoterpenos
15	3	Sesquiterpenos
20	4	Diterpenos
25	5	Sesterterpenos
30	6	Triterpenos
40	8	Tetraterpenos

FONTE: adaptado de BAKKALI *et al.*, 2008

2.3 Tipos de Extração

Enfloração: método utilizado geralmente por algumas indústrias de perfumaria. É principalmente aplicado em algumas plantas com baixo teor de óleo, porém com alto valor comercial, como as pétalas de flores, o processo consiste em depositá-las a uma temperatura ambiente sobre uma camada de gordura, durante certo período. Após este período, as pétalas esgotadas são substituídas por novas até a total saturação, a gordura é tratada com álcool. Para obter o óleo essencial, o álcool é destilado a baixa temperatura e o produto é assim obtido;

Prensagem: empregado normalmente para a extração dos óleos essenciais de frutos cítricos. Os pericarpos desses frutos são prensados e a camada que contém óleo essencial, é então separado da emulsão formada com a água por decantação, centrifugação ou destilação fracionada;

Extração com solventes orgânicos: neste tipo de extração os óleos essenciais são obtidos geralmente com solventes apolares que, entretanto, extraem outros compostos lipofílicos, além dos óleos essenciais. Por este motivo, os produtos obtidos raramente possuem um alto valor comercial agregado;

Extração por CO₂ super crítico: este método permite uma maior eficiência na recuperação os aromas naturais de vários tipos e não somente óleo essencial. É o método ideal

para extração em escala industrial de óleos essenciais. Não permanecem traços de solvente no produto obtido, tornando-o mais puro do que aqueles obtidos por outros métodos e assim agregando um bom valor comercial. O processo ocorre, quando o CO₂ é liquefeito através de compressão e, em seguida, aquecido a uma temperatura superior a 31 °C. Nessa temperatura, o CO₂ atinge um quarto estado, no qual sua viscosidade é compatível a de um gás, mas sua capacidade de dissolução é elevada como a de um líquido. Quando efetuada a sua extração, faz-se o CO₂ retornar ao estado gasoso, e assim eliminando-o;

Arraste por vapor d'água: os compostos do material vegetal apresentam pressão de vapor maior que a da água, sendo por isso, arrastados pelo vapor d'água. A sua utilização é geralmente empregada em pequena escala, utilizando um aparelho de Clevenger. O óleo essencial obtido, após separar-se da água, deve ser seco com sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄). Esse processo apesar de ser comum, pode levar à formação de artefatos em função da alta temperatura empregada. Esse método é utilizado para extrair óleos de plantas frescas (LUPPE, 2007).

2.4 Histórico de Óleos Essenciais no Brasil

O Brasil iniciou as suas atividades na indústria de óleos essenciais em 1925, quando ocasionou o começo da extração do óleo essencial do pau-rosa (*Aniba rosaedora*) em substituição a produção franco-guaianense que devido à intensa exploração da árvore houve uma queda na sua produção. Mas o impulsionamento da indústria brasileira ocorreu no final da década 30 com a segunda guerra mundial uma vez que a guerra desorganizou o mercado europeu, fortalecendo assim a nossa indústria já que possuía uma mão de obra barata e uma riqueza natural esplendida e passou a disponibilizar no mercado uma variedade considerável de óleos essenciais como: sassafrás, menta, laranja e eucalipto (AZAMBUJA, 2015).

Quando nós referimos a história dos óleos essenciais no Brasil não podemos deixar de citar a quase extinção da canela sassafrás (*Ocotea pretiosa* Mez), do qual se extrai o safrol que é utilizado nas indústrias de perfumes como um fixador de fragrâncias. O alto de sua exploração foi na região de Santa Catarina. Nas décadas de 40 a 60 o Brasil se tornou o maior produtor do safrol, porém em 1991 foi proibido o corte da planta. Dessa forma o Brasil deixou de ser exportador para se tornar importador do produto (MARR & ROSENBROCK, 2012). O pau rosa (*Aniba roseadora*) é o outro exemplo de exploração indiscriminada que quase

resultou na sua extinção, devido à mesma possuir o composto linalol que é muito utilizada na indústria de perfumaria (SANTOS & ALVES, 2012).

2.5 Mercado e Aplicações dos Óleos Essenciais

Flores, folhas, cascas, rizomas e frutos são matérias-primas para a produção de óleos essenciais, a exemplo dos óleos de rosas, eucalipto, canela, gengibre e laranja, respectivamente. Possui grande aplicação nas indústrias de perfumaria, cosmético, alimentos e farmacêutica como mostra a Tabela 2. São empregados principalmente como aromas, fragrâncias, fixadores de fragrâncias, em composições farmacêuticas e comercializados na sua forma bruta ou beneficiados, fornecendo substâncias purificadas (BIZZO *et al.*, 2009).

Atualmente, é crescente o mercado de óleos essenciais. Pesquisas mostram o grande número de aplicações possíveis de substâncias produzidas pelo metabolismo de plantas nativas de regiões tropicais. O mercado de óleos essenciais é próspero para países que dispõem de uma vasta biodiversidade, como o Brasil, e que possuem condições de acrescer valor às suas matérias-primas, ou seja, transformando-as em produtos beneficiados (SILVEIRA *et al.*, 2012).

Tabela 2. Os 18 principais óleos essenciais no mercado mundial.

Óleo essencial	Espécie
Laranja	<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck
Menta japonesa	<i>Mentha arvensis</i> L. f. <i>piperascens</i> Malinv. ex Holmes
Eucalipto (tipo cineol)	<i>Eucalyptus globulus</i> Labill., <i>E. polybractea</i> R.T. Baker e <i>Eucalyptus</i> spp.
Citronela	<i>Cymbopogon winterianus</i> Jowitt e <i>C. nardus</i> (L.) Rendle
Hortelã-pimenta	<i>Mentha x piperita</i> L
Limão	<i>Citrus limon</i> (L.) N.L. Burm
Eucalipto (tipo citronela)	<i>Eucalyptus citriodora</i> Hook.
Cravo da Índia	<i>Syzygium aromaticum</i> (L.) Merr. e L. M. Perry
Cedro (EUA)	<i>Juniperus virginiana</i> L. e <i>J. ashei</i> Buchholz
Lima destilada	<i>Citrus aurantifolia</i> (Christm. & Panz.) Swingle

Spearmint	<i>Mentha spicata</i> L.
Cedro (China)	<i>Chamaecyparis funebris</i> (Endl.) Franco
Lavandim	<i>Lavandula intermedia</i> Emeric ex Loisel
Sassafrás	<i>Cinnamomum micranthum</i> (Hayata) Hayata
Cânfora	<i>Cinnamomum camphora</i> (L.) J. Presl.
Coentro	<i>Coriandrum sativum</i> L.
Grapefruit	<i>Citrus paradisi</i> Macfady
Patchouli	<i>Pogostemon cablin</i> (Blanco) Benth.

FONTE: BIZZO, 2009.

A busca por produtos que agridem menos o meio ambiente e conseqüentemente a nós seres humanos vem despertando cada vez mais interesse em produtos de origem natural, inseticidas à base de plantas podem ser menos tóxico para os seres humanos, facilmente biodegradáveis (PEREIRA *et al.*, 2014). Os óleos essenciais derivados de plantas aromáticas é uma classe promissora de produtos ecológicos para o controle de pragas e insetos. Eles são constituídos principalmente por misturas de monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides; metabólitos que conferem as misturas com características organolépticas e atividades biológicas (STEFANELLO *et al.*, 2011).

As pesquisas sobre os benefícios dos óleos essenciais em manejo de animais comprovou que os mesmos interferem na microbiota intestinal (efeito antimicrobiano), melhoram a digestibilidade e a absorção dos nutrientes, além de estimular a resposta imune e induzir modificações morfo-histológicas do trato gastrintestinal (COSTA *et al.*, 2007 ; ROSSI & SOARES, 2013;) . Alguns óleos essenciais possuem propriedades anestésicas como é o caso da *Nectandra megapota mica* pertencente à família Lauraceae que pode ser utilizado na piscicultura evitando a utilização de anestésicos sintéticos (TONDOLO *et al.*, 2013).

Segundo o relatório de aromas, sabores e fragrâncias, (BAIN, 2014) a indústria de cosméticos e de higiene pessoal vem aumentando nos últimos anos, em 2012 movimentou 41,8 bilhões de dólares, deve manter altas taxas de crescimentos, cerca de 8,9% ao ano até 2017, com o aumento progressivo desse segmento de mercado cada vez mais se faz necessário a descoberta por novas essências para atender o público que vem em uma crescente.

Os produtos alimentares são frequentemente contaminados por bolores e as toxinas associadas geradas por alguns deles durante o armazenamento, transporte e processamento pós-colheita provocam perdas significativas na qualidade, quantidade, composição de nutrientes, e, assim, reduz o valor de mercado. A situação é mais crônica e crítica nas áreas tropicais e subtropicais devido às suas condições ambientais favoráveis para o crescimento de fungos. Apesar do uso de todos os meios de proteção e práticas modernas de armazenamento, bem como a deterioração oxidativa é ainda um grande problema em diferentes partes do mundo.

Os métodos físicos de controle de pragas como baixa temperatura, refrigeração, ventilação, embalagem a vácuo, rápida secagem, embalagem em atmosfera modificada (MAP) não são aplicadas de forma significativa em larga escala para o armazenamento de grandes quantidades de produtos alimentares e eles têm suas próprias limitações (PRAKASH *et al.*, 2015). A atividade antioxidante presente nessas substâncias etéreas, desperta interesse na indústria alimentícia, que busca alternativas de conservação em alimentos, diante da suspeita que alguns conservantes sintéticos são carcinogênicos. Pesquisas em relação a essas propriedades de conservação que os O.E apresentam vêm notoriamente enriquecendo a importância dos mesmos (KFOURY *et al.*, 2015).

Na medicina os óleos essenciais tem posição de destaque já que alguns compostos apresentam atividades anti-inflamatórias (ZHOU *et al.*, 2015) e carcinogênicas. Um exemplo é o óleo de canela, que é rico em eugenol, obtido a partir de *Cinnamomum verum*, é um exemplo importante da família Lauraceae. Ele exibe potencial antimicrobiano e anti-cancerígeno um dos desafios mais difíceis da quimioterapia é o tratamento de crescimento de células malignas levando ao câncer. Compostos presentes nas plantas, como por exemplo, o taxol apresenta ser eficaz contra a proliferação de células cancerosas. Vários tipos de doenças malignas, como: glioma, câncer de cólon, câncer gástrico, tumor no fígado humano, tumores pulmonares, câncer de mama, leucemia tiveram uma diminuição significativa após o tratamento com óleo essencial (RAUT & KARUPPAYIL, 2014).

Um estudo realizado por Fauth e colaboradores, (2002) mostrou a eficiência dos óleos essenciais de *Psidium guyanensis* (Araçá azedo), *Psidium pohlianum* (Araçá doce), *Psidium guajava* (Araçá goiaba), *Rosmarinus officinalis* (Alecrim) e *Lippia alba* (Cidreira) em associação com a cetamina que é uma droga que possui propriedades especiais que fazem dela o único agente que serve como anestésico, sedativo, amnésico e analgésico. Essa associação

permite uma indução maior na sedação, corroborando assim com a diminuição da droga e minimizando os efeitos colaterais. A aromaterapia é uma técnica que vem sendo utilizada no tratamento na diminuição do stress através da inalação dessas essências, como a lavanda que mostrou uma eficácia no tratamento de pessoas com doenças com risco de infarto (BIKMORADI *et al.*, 2015).

2.6 Atividade Antimicrobiana dos Óleos Essenciais

Estudos que abordam propriedades antimicrobianas das plantas para produção de novos fármacos vêm sendo cada vez mais impulsionados. Pois o surgimento de novas bactérias e a resistência que algumas apresentam aos antibióticos, se fazem cada vez mais presente, principalmente em países subdesenvolvidos (ESTANISLAU *et al.*, 2001).

Nos anos 80 houve uma queda significativa na produção de antimicrobianos, porém, o aumento de resistência dos microrganismos aos medicamentos tem crescido de forma imensurável, o fato que explicaria seria que estes organismos estão cada vez mais aumentando e desenvolvendo novas series mecanismos de resistência (ANTUNES *et al.*, 2006).

Componentes lipídicos da membrana celular das bactérias são realmente importantes para o seu funcionamento; na verdade, eles fornecem para membrana a função de barreira e desempenham um papel numa variedade de processos na célula (TROMBETTA *et al.*, 2007).

A resistência microbiana e a busca por novas substâncias que combatam esses microrganismos a partir de produtos naturais tem aumentado o interesse das indústrias farmacêuticas, principalmente por espécies de plantas utilizadas na medicina popular no combate a doenças. As propriedades antimicrobianas de substâncias presentes em extratos e óleos essenciais produzidos pelas plantas, como consequência do seu metabolismo secundário, também são reconhecidas empiricamente há séculos. Mas seus benefícios foram comprovados cientificamente nos últimos anos (AHMAD & BEG, 2001; BUR & REINDERS, 2003; PEREIRA *et al.*, 2004; NASCIMENTO *et al.*, 2010;).

As prospecções de estudos em relação á ação antimicrobiana para derivados vegetais e a possibilidade de sinergismos com drogas antimicrobianas convencionais tem sido frequentemente avaliadas (BETONI *et al.*, 2006). Sendo que a interação sinérgica para associações de antibióticos com extratos de plantas medicinais sobre linhagens microbianas

resistentes pode ser uma nova possibilidade para o tratamento de infecções, viabilizando o uso de drogas antimicrobianas quando esta de forma isolada não apresentar-se eficaz sobre determinadas linhagens bacterianas (KUMAR *et al.*, 2009).

O uso associado dos antibióticos com as plantas medicinais ou seus subprodutos podem atuar inibindo ou intensificando o efeito terapêutico dos medicamentos convencionais, bem como não interferir na resposta esperada (NASCIMENTO *et al.*, 2000; OLIVEIRA *et al.*, 2006). Avanços nos estudos relacionados à combinação de produtos naturais aos de plantas e drogas sintéticas são limitados, contudo, os resultados apresentados são muitas vezes positivos (SILVA, 2010). Logo, a utilização de agentes antimicrobianos naturais como óleos essenciais de plantas, vem a ser uma alternativa eficaz no controle de bactérias resistentes a antibióticos, seja na inibição do microrganismo, seja na interação sinérgica com os antibióticos (RIBEIRO *et al.*, 2013).

As bactérias utilizadas como a gram-positiva *Staphylococcus aureus* é geralmente encontrada na pele e mucosa de pessoas e animais, quando localizada na corrente sanguínea e no trato respiratório pode causar infecções. Também é responsável por doenças como: endocardite, meningite e abscessos musculares (NAIR *et al.*, 2016). A *Enterococcus faecalis* é uma bactéria gram-positiva que pode causar doenças principalmente no trato urinário geralmente seu contágio se dá por contato por indivíduo infectado (KAU *et al.*, 2005). Já a bactéria gram-negativa *Escherichia coli* é encontrada na flora intestinal de ser humanos e animais quando em contato por outras vias como boca, por exemplo, pode causar diarreia e infecções na urina (MINH *et al.*, 2016). *Acinetobacter baumannii* é um agente gram- negativo responsável pela maior parte dos problemas de infecções hospitalares atualmente, pois o mesmo apresenta genes de resistência diferentes dificultando assim o tratamento por antibióticos (SADEGHI *et al.*, 2016).

2.7 *Ocotea diospyrifolia* (Meisn.) Mez (Lauraceae)

A família Lauraceae é constituída por 52 gêneros e 2500 á 3500 espécies distribuídas amplamente nas regiões tropicais e subtropicais do planeta. No Brasil é representada por 23 gêneros e aproximadamente 420 espécies. A Floresta Atlântica é considerada como um dos centros de diversidade para a família. Do ponto de vista econômico, as Lauraceas formam um

importante grupo, pois muitas de suas espécies fornecem óleos aromáticos e alcalóides usados na perfumaria e na indústria farmacêutica (SANTOS & ALVES, 2012).

A atividade antimicrobiana é relatada na família como é o caso da *Aniba riparina* (SOUSA *et al.*, 2007). O potencial anti-inflamatório também ocorre em alguns compostos dos óleos essenciais da família, exemplos dessa classe é *Pleurothyrium cinereum* e *Ocotea macrophylla* (COY-BARRERA & CUCA-SUÁREZ, 2011). A espécie *Ocotea Duckei* apresentou eficácia no controle de doenças cardiovasculares (CHAVERRI *et al.*, 2011).

Pesquisas direcionadas a espécies do gênero *Ocotea* têm comprovado que o mesmo apresenta uma rica diversidade na mata atlântica. São comumente encontradas nessa unidade fitogeográfica, apresenta cerca de 350 espécies é um dos maiores gênero da família Lauraceae no Neotrópico. A lista de espécies da flora do Brasil consta que no estado do Paraná encontra-se 66 espécies de Lauraceae, distribuídas em 12 gêneros (QUINET *et al.*, 2012). A *Ocotea* ocorre no bioma Mata Atlântica e no bioma Cerrado (BROTTO & BAITTELO, 2012). O gênero pode ser encontrado no Pantanal do Mato Grosso do Sul como é o caso da *Ocotea lancifolia* que é recorrente em matas ciliares. Plantas pertencentes ao gênero *Ocotea* geralmente apresentam metabólitos secundários das seguintes classes: alcaloides aporfínicos, lignanas e neolignanas, benzopiranos, monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides, algumas espécies pertencentes a este gênero são comumente empregadas na medicina popular, atribuindo-se propriedades anti-reumáticas, depurativas, tônicas, estomáquicas e contra abscessos (CAMARGO *et al.*, 2013). Alguns alcalóides aporfínicos comumente encontrados no gênero *Ocotea* apresentam pronunciada bioatividade, como a nantenina (bloqueador de contração muscular e translocação de Ca^{2+}), os derivados da nantenina, (antagonista α 1-adrenoreceptor), a coclaurina (anti-HIV); a glaucina (citotóxica) (ZANIN *et al.*, 2011).

Conhecida popularmente por canela-amarela e canela-preta a *Ocotea diospyrifolia* (Meisn.) Mez (Figura 2) ocorre nos estados de Mato Grosso do Sul, Rio de Janeiro, Minas Gerais e Santa Catarina, sua altura média atinge 20 metros e seu diâmetro é de 60 cm. O período de floração é de novembro a dezembro e frutificação de abril a maio, possui flores masculinas e femininas seu fruto é uma baga globosa, em relação a apícola são amarelas e perfumadas atraindo assim muitos insetos, possui grande interesse por parte da construção civil (LORENZI, 1998). Não há relatos na literatura de trabalhos relacionada com óleos

essenciais. Um trabalho de 2013 realizado no pantanal sul mato grossense a mesma apontou atividade acaricida dos extratos das folhas e galhos (DOS SANTOS *et al.*, 2013).

Figura 2. *Ocotea diospyrifolia* (Lauraceae).



FONTE: SANTOS, 2015.

3. OBJETIVOS GERAIS

- ✓ A presente pesquisa teve como âmbito realizar a extração do óleo essencial das folhas e cascas da *Ocotea diospyrifolia* e analisar sua composição química.
- ✓ Uma vez que não há relatos abordando o estudo do óleo essencial em literatura.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Neste contexto, vista a importância das propriedades dos compostos presentes no gênero *Ocotea* e a ausência de relatos na literatura abordando estudos da composição química do óleo essencial da espécie *Ocotea diospyrifolia*.
- ✓ Teve-se como objetivo a avaliação da composição química para o óleo essencial através de técnicas cromatográficas e determinação dos constituintes químicos por meio da determinação do índice de retenção.
- ✓ Também foram avaliadas as ações dos óleos essenciais em cepas bacterianas gram-positivas e gram-negativas e avaliar a interação dos óleos com os antibióticos a fim de verificar um possível efeito sinérgico.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais e Reagentes

Os solventes e reagentes utilizados foram: acetato de etila (P.A.), água destilada, éter etílico (P.A.), hexano (P.A.), sulfato de sódio anidro (P.A.), sílica gel 60 para TLC preparativa com UV 250 nm, vanilina (P.A), etanol (P.A) e ácido sulfúrico (P.A).

4.2 Coleta e Preparo do Material botânico

As amostras da espécie *Ocotea diospyrifolia* (Meisn.) Mez foram coletadas na zona rural da região do município de Japorã – Mato Grosso do Sul no mês de agosto de 2014 em período vespertino, o material vegetal coletado foi encaminhado para identificação no herbário DDMS da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), o número de identificação da espécie é 3762, o reconhecimento da espécie coletada foi realizada pelo botânico prof. Dr. Etenaldo Felipe da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul (UEMS).

Tanto as folhas como as cascas (Figura 3) foram utilizadas frescas para extração realizadas no laboratório de química orgânica da Unidade universitária de Naviraí. O material vegetal foi pesado para posterior cálculo do rendimento.

Figura 3.(a) cascas e (b) folhas da *Ocotea diospyrifolia* utilizadas na hidrodestilação.



(a)

(b)

FONTE: SANTOS, 2015

4.2.1 Extração do óleo essencial

Dos materiais vegetais coletados, as folhas e cascas foram pesadas e processadas para extração dos óleos essenciais por hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger acoplado a um balão de fundo redondo com capacidade de 5L por 6 horas como mostrado na Figura 4.

O óleo essencial obtido na extração foi coletado com éter etílico, sendo posteriormente evaporado á temperatura ambiente, a remoção da água residual foi realizada utilizando sulfato de sódio anidro. Os óleos livres de umidade foram acondicionados e pesados em frascos envoltos de papel alumínio e guardados sob a refrigeração de 4° C com a finalidade de protegê-los de possíveis alterações que podem ocorrer caso O.E seja exposto á luz ou a umidade durante um longo período.

Figura 4. Aparelho tipo Clevenger acoplado a um balão de fundo redondo.



FONTE: SANTOS, 2015.

4.2.2 Cromatografia Gasosa (CG-DIC)

As análises foram realizadas utilizando duas colunas capilares, uma coluna capilar Zebron (30 m x 0,25 μ m, 0,25 mm) 5% fenil com 95% de polidimetilsiloxano e outra de 100% de polietilenoglicol. O equipamento utilizado foi um cromatógrafo (HP-5890) a gás com detecção por ionização de chama (CG-DIC). As condições cromatográficas das análises foram: injetor 250 °C, detector 250 °C, temperatura inicial de 60 °C com elevação de 3 °C por minuto e final de 248 °C. O tratamento dos dados foi realizado por meio do software da N2000 da ChromatoStation. O gás de arraste utilizado foi N₂ (1.2 mL min⁻¹) com grau de pureza 5.0, H₂ (30 mL min⁻¹) e ar sintético (300 mL min⁻¹) para formação da chama. Para

injeção das amostras no equipamento a mesma foi preparada utilizando-se uma alíquota 2 μL do óleo essencial diluindo-se em 150 μL de acetato de etila e injetados 3 μL no equipamento.

4.2.3 Cromatografia de Camada Delgada (CCD)

Na realização da CCD usaram-se placas de alumina-sílica (Macherey-Nagel 250 UV) tanto para as cascas e folhas. O óleo essencial foi diluída em 50 μL de Acetato de etila e aplicado nas placas com o auxílio de um capilar. Posteriormente, as placas foram levadas a cubas cromatográficas, contendo como fase móvel uma mistura de hexano e acetato de etila em diferentes proporções: 90:10 ; 85:15 e 80:20. Decorrida a eluição das placas a visualização dos compostos foi verificada pela irradiação da luz ultravioleta no comprimento de onda 254 nanometro (nm), seguida da pulverização com uma solução de vanilina na proporção de 90% etanol e 10% ácido sulfúrico para um grama de vanilina e levado para secagem em chapa aquecedora.

4.2.4 Cromatografia em Camada Delgada Preparativa

Para as análises cromatográficas em camada delgada preparativa (CCDP) foram empregadas placas de vidro de 20 X 20 cm, e como fase estacionária, sílica gel para TLC preparativa Macherey-Nagel com refletância para luz ultravioleta 254 nanômetros. Para cada placa foi utilizado 15 gramas de sílica dissolvida em 30 mL de água destilada, posteriormente foram levadas para a secagem em estufa por 24 horas á uma temperatura constante 80 °C as placas foram preparadas no laboratório de orgânica seguindo a metodologia de preparo de placas de Collins e colaboradores, (2011) Com o auxílio de um capilar em cada placa foi aplicado 100 μL de óleo essencial. A revelação das cromatoplasas foi realizada em câmara com radiação ultravioleta de 254 (nm) e posteriormente com solução de vanilina como referido no subitem 4.2.3. As regiões de sílica contendo as subfrações foram retiradas das placas e as amostras solubilizadas em acetato de etila. Foi possível obter 5 frações da folha e 8 da casca. Cada mistura foi filtrada e o solvente evaporado em rota-evaporador. As análises para verificar se houve o isolamento de algum composto foi realizado em CG-DIC.

4.2.5 Cromatografia Acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM)

A amostra de óleo foi submetida à análise qualitativa por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) para identificação dos compostos. O cromatografo utilizado foi um Thermo Finigan, equipado com coluna capilar HP-5ms (30 m; 0,25 mm; 0,25 mm). As condições cromatográficas foram: injetor 250 °C, detector, 280 °C, linha de transferência 250 °C, vazão do gás de arraste 1 mL min⁻¹ (He) com grau de pureza 5.0, *split* 1:10. A rampa cromatográfica foi de 60 °C → 3 °C/min 240 °C. A identificação dos picos foi realizada através do uso da biblioteca Nist do equipamento e através do índice de retenção determinado pelo uso de uma solução homologa de hidrocarbonetos C₇-C₃₀. As amostras foram diluídas em clorofórmio/acetato de etila (CHCl₃/AcEt) e 3 µL injetados.

4.2.6 Cálculo do Índice de Retenção

No cálculo utilizou-se a determinação do índice de retenção, conforme a Equação 1 e comparados ao índice de retenção tabelado. O padrão de referência empregado foi uma série homologa de hidrocarbonetos C₇ e C₃₀. Usando a seguinte equação:

$$IR = 100 \cdot n + 100 \frac{(tr_1 - tr_2)}{tr_3 - tr_2} \quad \text{Equação 1}$$

Onde:

n: número de carbonos do alcanos eluídos antes do pico de análise.

*tr*₁: tempo de retenção do pico de análise.

*tr*₂: tempo de retenção do alcanos eluídos antes do pico de análise.

*tr*₃: tempo de retenção do alcanos eluídos depois do pico de análise.

4.2.7 Teste de Sensibilidade Antimicrobiano

O teste seguiu os parâmetros da Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, 2003. Foi preparado uma suspensão das cepas bacterianas a ser estudadas em solução salina (NaCl 0,9%) para obter aproximadamente 1,5 x 10⁸ UFC mL (escala de Mc Farland). Em

seguida pressionou-se o *swab* (haste de algodão) contra a parede do tubo para retirar o excesso e distribuir o inóculo sobre a superfície do meio de cultura. Foi utilizado como controle padrão um disco de antibiótico cloranfenicol (30µg). Em cada placa de petri foi colocado um disco de papel (6 mm) absorvente e impregnado duas concentrações diferentes, sendo uma de 1 µL e outra de 5µL de óleo essencial a ser estudado. As análises foram realizadas em duplicatas, e posteriormente efetuadas a média dos halos apresentados. Foram preparadas placas de petri contendo 20 mL de ágar Müller-Hinton como meio de cultura base. As placas foram incubadas em estufa a 35 °C por 24 horas. Após este período, realizou-se a análise dos resultados através da observação e medida dos halos de inibição, através de paquímetro digital considerou-se com atividade antibacteriana o óleo que apresentou halo de inibição igual ou superior a 10 mm (TRAJANO *et al.*, 2009).

As cepas bacterianas analisadas foram: *Escherichia coli* (ATCC SP 11229) *Enterococcus faecalis* (ATCC SP 19433) e *Staphylococcus aureus* (ATCC SP 25923). O teste com essas estirpes bacterianas foram realizadas na UEMS campus Naviraí

O teste realizado com bactéria gram-negativa a *Acinetobacter baumannii* produtora de carbapenemase, portadora do gene de resistência *bla_{oxa-23}* isolada de processo clínico humano foi caracterizada previamente no Laboratório de Microbiologia da UFGD. Os óleos das cascas e folhas foram testados pelo método de disco difusão em ágar segundo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2013), com adaptações de Habbal e colaboradores, (2011).

4.2.8 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

O teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizado com bactéria *Acinetobacter baumannii*, seguindo a metodologia de Fankam e colaboradores, (2011) pelo método de microdiluição em placas. Para efetivar-se o teste a suspensão bacteriana foi realizada em solução salina com turvação correspondente a 1×10^6 UFC/mL. Primeiramente os óleos foram diluídos em água destilada estéril no qual foi possível obter a concentração de 16%. Considerando para essas diluições a densidade das substâncias igual a 0,9 g/mL. Após este procedimento os mesmos 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 e agitados por 5 minutos obtendo-se a concentração de 16% que corresponde a 144 mg. mL.

Individualmente nos poços das placas de microdiluição adicionaram-se 100 μ L de caldo Müller-Hinton seguidamente inseriu-se 100 μ L das emulsões dos óleos para adquirir a concentração inicial que foi de 8% (72 mg. mL) para a primeira linha da placa de microdiluição. Para obtenção das concentrações seguintes dos óleos foram realizadas a partir da diluição seriada na própria placa, partindo-se da concentração inicial de 8% até 0,0625%, pela transferência de 100 μ L ao poço sucessor, para última linha retirou-se 100 μ L do conteúdo de forma a coincidir com os volumes de todos os poços. Todos os testes foram realizados em duplicata.

O controle de toxicidade foi realizado com Tween 80%, a concentração utilizada a emulsão, a fim de averiguar se o mesmo não apresentaria atividade inibitória para a bactéria, a esterilidade do óleo foi verificada juntamente com o mesmo óleo mais o meio de cultura, de maneira que o mesmo fosse o controle positivo, a suspensão bacteriana em solução salina com turvação correspondente a 0,5 da Escala McFarland adicionada de polimixina B (antibiótico comercial) o controle negativo utilizado foi a suspensão bacteriana mais meio de cultura.

As placas foram incubadas a uma temperatura de 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 pelo período de duas horas em estufa a 37 °C. 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 (PESSOA *et al.*, 2005).

4.2.9 Teste de Sinergismo Utilizando o Método Time-kill

Técnica de difusão em meio sólido: primeiramente foi realizado o teste de interação dos óleos com antibióticos disponíveis comercialmente para verificar possíveis sinergismos através da técnica de difusão em meio sólido utilizando discos de papel filtro conforme Pessoa e colaboradores, (2005). O ensaio realizado para confirmar o efeito sinérgico foi o Time-kill ou curva de sobrevivência bacteriana na qual foi utilizada a técnica de

microdiluição seguindo-se as diretrizes estabelecidas pelo Laboratory Standards Institute (CLSI).

A confirmação da microdiluição foi realizada através da contagem bacteriana durante o período de incubação que foi monitorada paralelamente em quatro tubos de ensaio contendo inicialmente apenas a bactéria (1×10^8 UFC mL⁻¹); No segundo tubo de ensaio continha a bactéria em uma concentração sub-inibitória de antibióticos que evidenciou um efeito sinérgico em combinação com óxido de etileno; No terceiro tubo possuía a bactéria em uma concentração sub-inibitória do óleo essencial que evidenciou um efeito sinérgico em combinação com o antibiótico (AB); E no quarto tubo continha a bactéria em uma concentração sub-inibitória de antibiótico juntamente com o óleo essencial.

O volume final de cada tubo foi de 10 mL e foram incubadas a 37 °C durante 24 h. As contagens bacterianas foram determinadas após 0, 4, 8, 12 e 24 h de incubação, espalhando diluições apropriadas em ágar de Muller Hinton (limite de detecção foi de 10^2 UFC.mL⁻¹). As placas foram incubadas a 37 °C e logo após as colônias bacterianas foram contadas. Os resultados das experiências foram realizados em triplicata.

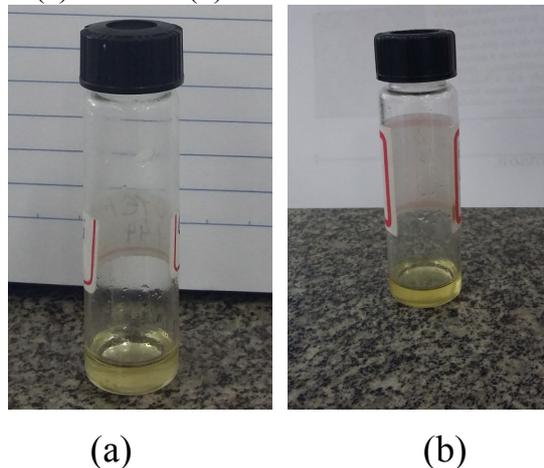
A interação é considerada como sendo eficaz e sinérgica, se a contagem de bactérias de partida (UFC.mL⁻¹) diminuiu após 24 h de incubação por ≥ 2 log para o óleo essencial e antibiótico em combinação (KNEZEVIC *et al.*, 2013). Os antibióticos utilizados em associação aos óleos essenciais perante a bactéria *A. baumannii* foram: imipenem, piperacilina/tazobactam, ciprofloxacina, amicacina, polimixina B.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Extração do Óleo Essencial

O material proveniente da matriz foliar totalizou um peso bruto de 518,85 gramas, possibilitando a extração total de 12,03 gramas de óleo essencial, resultando dessa maneira em um rendimento de 2,31%. Das cascas o total de material bruto extraído foi de 438,52 gramas, totalizando uma quantia de 0,97 gramas de óleo com um rendimento de 0,22%. Comparando estes resultados de rendimento com um trabalho realizado por PRIETO, (2010) com as folhas de duas plantas do mesmo gênero a *Ocotea longifolia* apresentou um rendimento superior a 0,2% e a *Ocotea macrophylla* uma porcentagem de rendimento inferior a 0,1%. Podemos evidenciar assim que o rendimento da *O. diospyrifolia* foi superior aos parâmetros de rendimento de plantas deste gênero. As Figuras 5 (a) folhas e (b) cascas mostram os óleos essenciais oriundos da extração. O rendimento pode ser afetado por diversos fatores como: poluição atmosférica, tipo de solo, época de coleta e forma de extração (SILVA FILHO & RODRIGUES, 2012).

Figura 5. Óleos essenciais (a) folhas e (b) cascas.



FONTE: SANTOS, 2015.

5.2 Cromatografia Gasosa (CG-DIC)

Com o intuito de verificar uma melhor separação dos compostos presentes tanto no óleo das cascas como no das folhas foi realizada a cromatografia gasosa de ionização em

chama em diferentes colunas capilares a fim de estabelecer qual apresenta melhor afinidade com o óleo essencial analisado. Foi testada uma de 100% polietilenoglicol (30 m x 0,25 μm , 0,25 mm, zebron) e outra com 5% fenil e 95% polidimetilsiloxano (30 m x 0,25 μm , 0,25 mm, zebron), sendo que esta última coluna apresentou resultados satisfatórios, uma vez que comparando os cromatogramas obtidos das duas colunas, pode-se observar uma melhor separação dos constituintes, em virtude das características estruturais dos hidrocarbonetos das amostras apresentarem polaridades que permitem uma melhor interação com esta coluna. Uma vez observada essa interação pode-se estabelecer a melhor coluna para as análises em CG-EM. Os cromatogramas CG-DIC nas Figuras 6 e 7 mostram essa separação dos compostos para o óleo das cascas e folhas.

Figura 6. Cromatograma obtido por CG-DIC para o óleo das cascas da *Ocotea diospyrifolia* em coluna 5% fenil e 95% de polidimetilsiloxano.

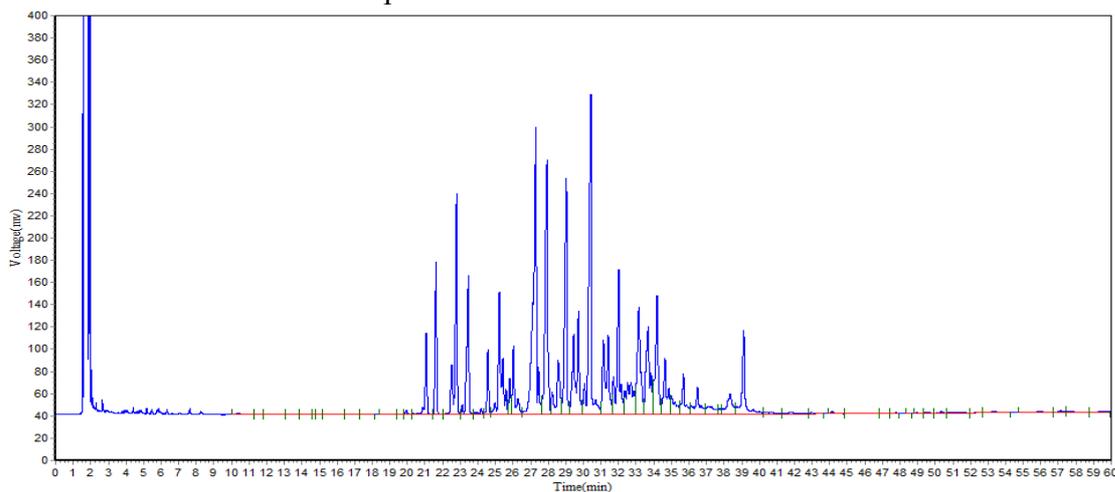
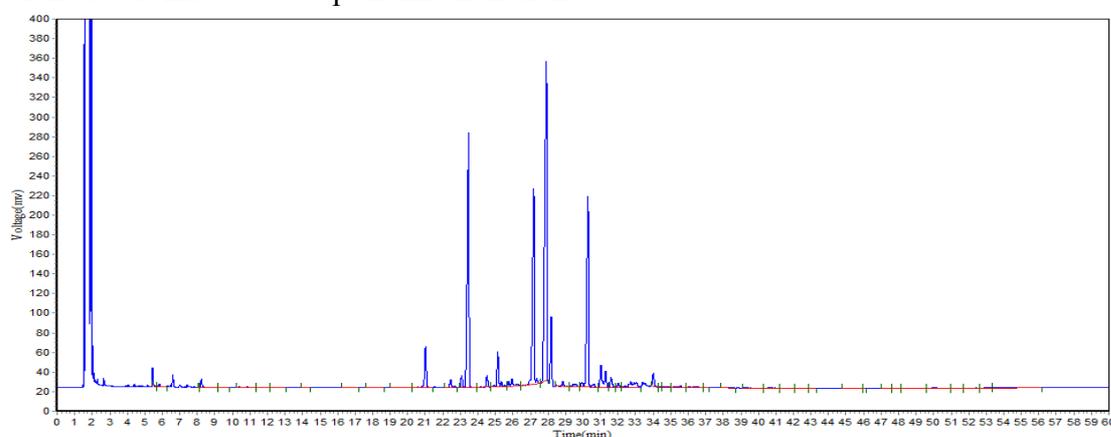


Figura 7. Cromatografia obtido por CG-DIC para o óleo das folhas da *O. diospyrifolia* em coluna 5% fenil e 95% de polidimetilsiloxano.

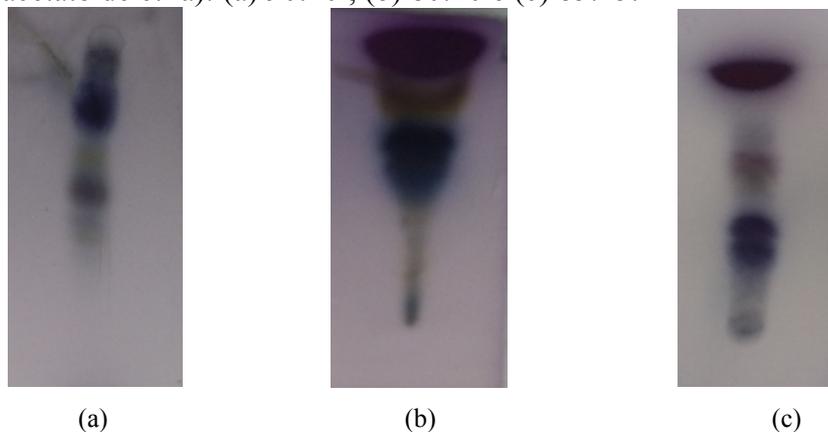


No cromatograma para o óleo da casca da *Ocotea diospyrifolia* foi verificado um maior número de compostos em sua composição química quando comparado ao óleo essencial das folhas. É possível avaliar na (Figura 6) que tanto os compostos mais voláteis aos menos voláteis obtiveram uma melhor separação. No cromatograma (Figura 7) pode ser observada uma eluição maior por parte de compostos sesquiterpenos, ou seja, constituintes menos voláteis que apresentam em sua estrutura uma conformação de até quinze carbonos.

5.3 Cromatografia de Camada Delgada (CCD)

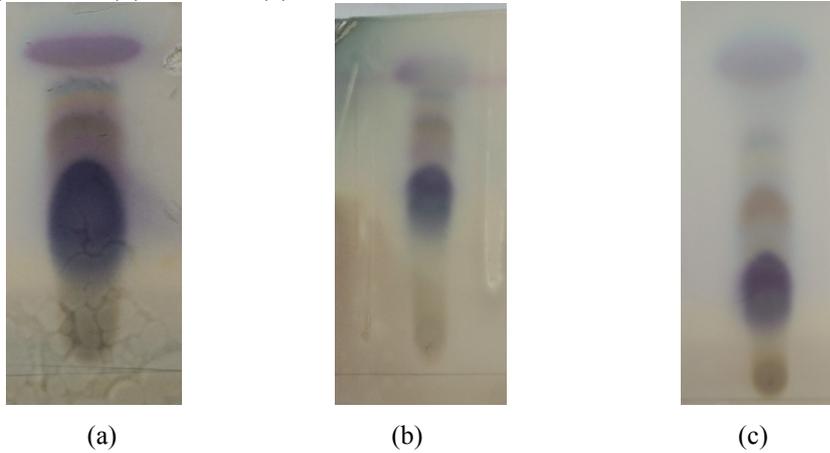
Na análise via CCD para o óleo das cascas e folhas (Figuras 8 e 9) foi avaliado que o melhor perfil de separação dos compostos das diferentes proporções da mistura de solventes da fase móvel, foi em 85:15 (hexano/acetato de etila) para as folhas, conforme pode ser visualizada na Figura 8(c). As cascas tiveram uma melhor eluição na proporção 90:10 (hexano/acetato de etila) como é observado na Figura 9(c).

Figura 8. Perfil cromatográfico das folhas via CCD com diferentes proporções de fase móvel (hexano/acetato de etila): (a) 90:10 ; (b) 80:20 e (c) 85:15.



FONTE: SANTOS, 2015

Figura 9. Perfil de separação das cascas via CDD com proporções diferentes (hexano /acetato de etila): (a) 85:15; (b) 80:20 e (c) 90:10.



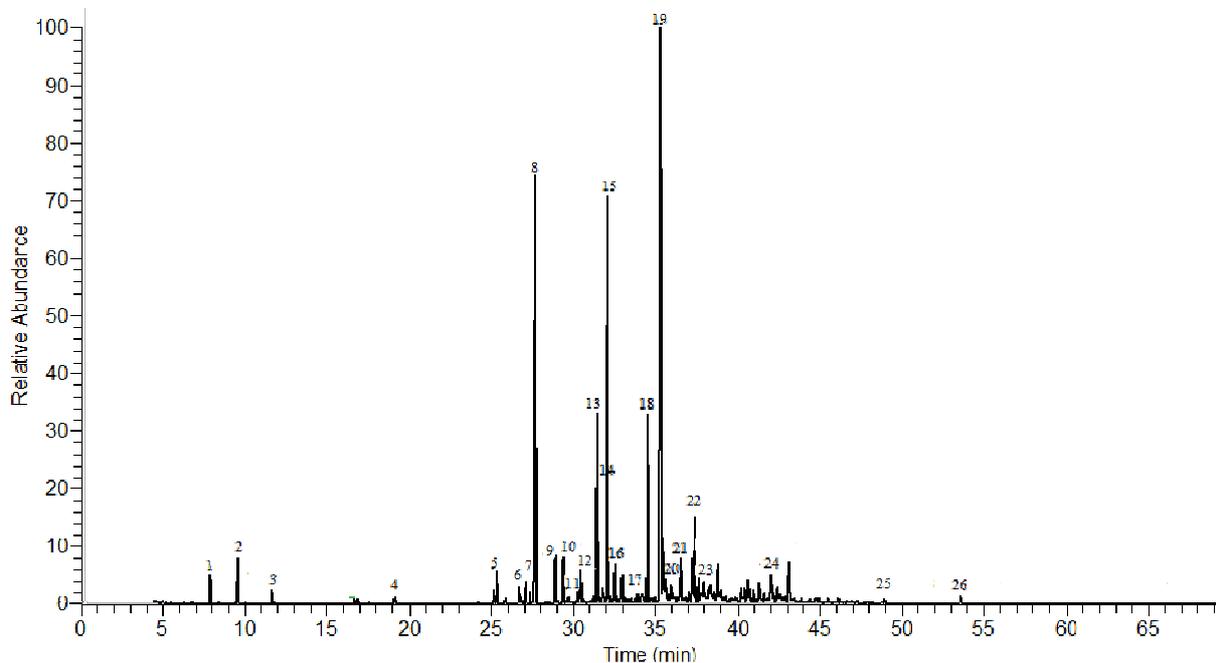
FONTE: SANTOS, 2015.

A investigação preliminar da constituição química da amostra permitiu, a partir do bom resultado da referida condição experimental, a realização da análise cromatográfica em placa preparativa, a fim de isolar princípios ativos. O método de cromatografia em camada delgada preparativa foi empregado para a separação dos compostos para realização do fracionamento e isolamento de constituintes puros, porém nenhum composto foi passível de isolamento.

5.4 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) e determinação do índice de retenção (IR)

O GC-EM é uma ferramenta de estudos muito importante para a elucidação estrutural de compostos orgânicos tendo em vista identifica-lós (ANGNES, 2005). A Figura 10 mostra o perfil cromatográfico adquirido para o óleo essencial das folhas obtido por CG-EM, um total de 25 compostos foram possíveis de identificação e comparados ao índice de retenção (MUHLEN, 2009).

Figura 10. Cromatograma de íons totais obtidos por CG-EM para o óleo das folhas da *O.diospyrifolia*



Na Tabela 3 estão relacionados os constituintes identificados com seus índices de retenção calculados e comparados com a literatura (ADAMS, 2007).

Tabela 3. Relação dos compostos identificados para o O.E da folha com índice de retenção e suas respectivas concentrações no CG-EM e CG-DIC comparados com a literatura ADAMS,2007.

Indicação numérica	Constituintes	Tr	CG-EM (%)	CG-DIC (%)	IR ^(cal)	IR ^(lit)
Hidrocarbonetos monoterpênicos						
1	α - pineno	7,87	0,53	0,58	927	932
2	β – pineno	9,54	0,96	0,44	973	974
3	β – terpinilacetato	11,64	0,33	0,32	1025	N
Monoterpeno oxigenado						
4	Mirtenol	19,11	0,28	0,93	1192	1195
Hidrocarbonetos sesquiterpênicos						
5	δ – elemeno	25,34	1,15	1,09	1331	1335
6	α –ylangeno	26,78	1,26	0,53	1364	1373

7	Copaeno	27,06	0,59	0,34	1371	1374
8	β – elemeno	27,71	12,40	7,37	1386	1389
9	Cariofileno	28,90	1,48	0,60	1536	N
10	1-metiletilideno	29,35	1,27	1,17	1422	N
11	β – chamigreno	30,27	1,27	0,48	1470	1476
12	α – cariofileno	30,39	1,53	0,19	1450	1464
13	Germacreno D	31,47	5,72	5,38	1476	1484
14	β – selineno	31,77	0,77	0,65	1483	1489
15	Elixeno	32,07	11,84	10,28	1491	N
16	α – bulneseno	32,50	1,20	1,32	1501	1509
17	δ – Cadineno	32,97	1,80	0,31	1513	1513
18	τ – elemeno	34,53	5,58	0,30	1553	N

Sesquiterpenos oxigenados

19	Espatulenol	35,32	21,79	7,12	1573	1577
20	Isoaromandendreno epóxido	36,52	1,94	1,97	1604	N
21	Viridiflorol	35,92	1,08	0,14	1588	1592
22	α – copaen-11-ol	37,65	0,65	0,29	1534	1539
23	Alloaromadendreno epóxido	38,36	1,82	0,45	1634	1639
24	Ledeno oxido- (II)	42,39	1,52	0,36	1764	N
25	3- deoxi estradiol	48,96	0,21	0,38	1959	N

Diterpeno oxigenado

26	Fitol	53,53	0,31	0,30	2105	1948
Total			79,28	43,29		

IR ^(cal): Índice de retenção calculado. IR ^(lit): Índice de retenção da literatura ADAMS, 2007. N: Não encontrado na literatura. Tr : Tempo de retenção.

Alguns dos compostos majoritários encontrados na folha quando isolados possuem um grande interesse de pesquisa como é o caso do espatulenol (21,79%), este pode de influir no aroma de muitos óleos de interesse comercial para a indústria de perfumes possui propriedade

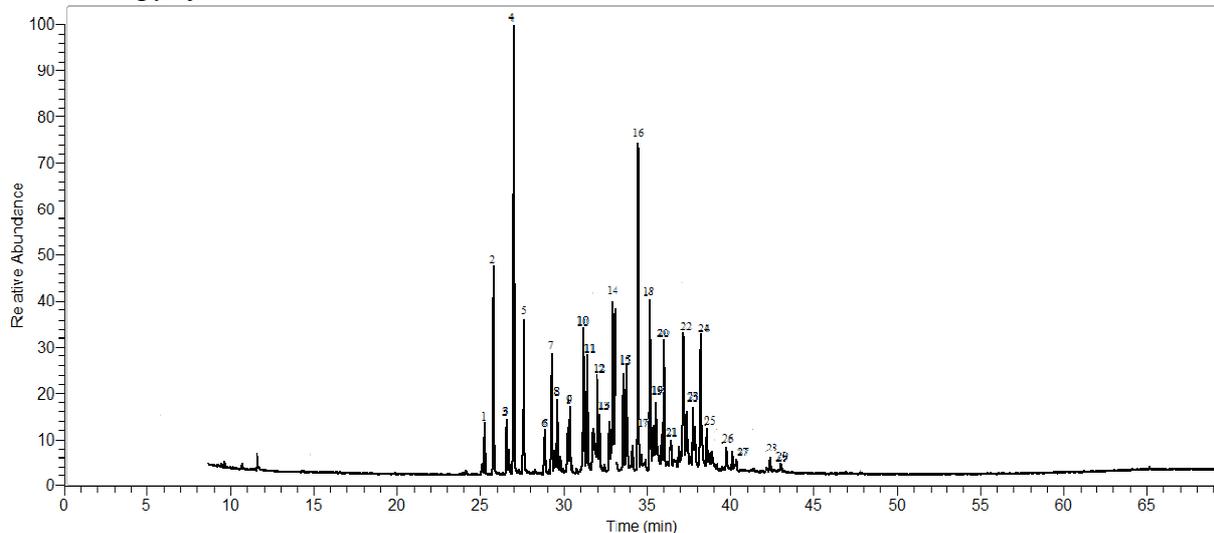
antibacteriana (ALCÂNTARA *et al.*, 2010). Um estudo realizado por (LI *et al.*, 2014) mostrou a eficácia do β -elemeno (12,40%) na diminuição de células tumorais do câncer de pulmão, mas também algumas evidências sugere que este novo medicamento anti-câncer trata eficazmente vários carcinomas, tais como: glioblastoma, do fígado, da laringe e carcinoma do ovário. Houve também um menor efeito secundário quando comparado com outras drogas utilizadas no tratamento de câncer. O germacreno D (5,72%) que apresenta efeitos relativamente altos sobre o comportamento de insetos e os genes que codificam enzimas que produzem este composto vem despertando grande interesse no estudo das interações planta-inseto em uma série de abordagens biotecnológicas para controle de pragas (PROSSER *et al.*, 2004).

A avaliação da composição química do O.E das folhas por CG-EM permitiu a constatação de vinte e seis compostos dentre eles a presença de dois monoterpenos o α -pineno e β - pineno que juntos perfazem cerca de 1, 49%, que são comuns ao gênero como já reportado em um estudo da composição química da *Ocotea duckei* por Barbosa-Filho e colaboradores, (2008). O total de monoterpenos oxigenados foi de (0,28%).

Contudo a presença de hidrocarbonetos sesquiterpênicos foi predominante (47,86%), a ocorrência de compostos desta classe em óleos essenciais extraídos principalmente das folhas está de acordo com dados da literatura para plantas deste gênero (COUTINHO *et al.*, 2007; BALABENI *et al.*, 2007). Os sesquiterpenos oxigenados totalizaram 29,01%, com predominância do constituinte espatulenol (21,79%) o mesmo apresentou uma concentração maior em outra planta do mesmo gênero *Ocotea nectandrafolia* (ARAÚJO *et al.*, 2001; RAGGI *et al.*, 2008).

O cromatograma de íons totais para o óleo das cascas (Figura 11) mostra os principais compostos encontrados com seus respectivos índices de retenção calculados com os tabelados.

Figura 11. Cromatograma de íons totais obtidos por CG-EM para o óleo essencial das cascas da *O. diospyrifolia*.



A Tabela 4 mostra os índices de retenção calculados para as cascas comparados com os da literatura ADAMS , 2007 respectivamente com a concentração de seus compostos.

Tabela 4. Relação dos compostos identificados para o O.E da casca com o índice de retenção e suas respectivas concentrações no CG-EM e CG-DIC.

Indicação numérica	Constituintes	Tr	CG-EM (%)	CG-DIC (%)	IR ^(cal)	IR ^{LIT}
Hidrocarbonetos sesquiterpênicos						
1	δ – elemeno	25,28	1,27	1,10	1330	1335
2	α – cubebeno	25,78	3,78	1,81	1341	1345
3	α – bulneseno	26,58	1,56	0,77	1360	1509
4	α – copaeno	27,00	8,01	2,79	1369	1374
5	β – elemeno	27,62	4,18	2,15	1384	1389
6	β – cariofileno	28,82	1,01	0,74	1412	1408
7	β - sesquifelandreno	29,28	2,26	1,70	1423	N
8	<i>allo</i> – romadendreno	29,61	2,60	0,80	1431	1458
9	α – humuleno	30,33	2,62	5,77	1448	1452
10	τ – muuruleno	31,17	3,40	4,40	1469	N
11	β – cubebeno	31,39	2,68	0,93	1482	1387
12	α – selineno	31,71	2,28	3,76	1482	1498

13	Patchouleno	31,99	3,83	1,49	1489	1502
14	γ - cadineno	32,92	8,51	5,42	1512	1513
15	Selina 3,7(11)-dieno	33,82	4,64	1,27	1535	N
16	Elixeno	34,46	6,45	1,18	1551	N

Sesquiterpenos oxigenados

17	Veltonal	34,64	1,05	0,49	1555	1555
18	Espatulanol	35,22	3,54	2,37	1570	1577
19	Globulol	35,54	3,35	4,14	1578	1590
20	Guaiol	36,02	3,27	2,44	1591	1600
21	Widdrol	36,46	1,36	2,51	1602	1599
22	Cubenol	37,17	6,46	0,92	1621	1645
23	τ - Cadinol	37,73	2,80	0,87	1636	1638
24	α - Cadinol	38,23	3,76	0,73	1650	1652
25	β - guaiaeno	38,59	1,23	0,53	1659	1502
26	Juniper canfora	39,29	0,74	0,72	1678	N
27	Ledeno oxido	41,89	0,63	0,24	1750	N
28	Óxido <i>allo</i> aromadendreno	42,19	0,56	1,46	1758	N
Total			87,83	53,5		

IR^(cal): Índices de retenção calculado. IR^(lit): Índice de retenção da literatura ADAMS, 2007. N: Não encontrado na literatura. Tr: Tempo de retenção.

A avaliação do O.E das cascas permitiu constatação de 28 compostos, não ocorreu à presença de hidrocarbonetos monoterpênicos. A presença de compostos hidrocarbonetos sesquiterpenos foi superior, em uma concentração total de 59,08% dentre eles os constituintes majoritários α - copaeno (8,01%) e γ - cadineno (8,51%) pesquisas recentes sobre estes dois compostos apresentam como função principal a defesa contra insetos invasores sendo que em períodos de infestação estes constituintes são liberados em maior concentração (SAAD *et al.*,2015).

A concentração de sesquiterpenos oxigenados resultou em um total de 28,75% dentre os compostos o cubenol apresentou ser predominante cerca de (6,46%) é citado em um estudo por Jiangseubchatveera e colaboradores, (2015), como detentor de atividade contra células

tumorais de pulmão. β - cariofileno é reportado em diversos óleos essenciais por apresentar um forte aroma e possuir uma diversidade de atividades biológicas que podem ser aplicadas como: anti-inflamatórias (FERNANDES *et al.*, 2007; PASSOS *et al.*, 2007), antialérgicas (GHELARDINI *et al.*, 2001), anestésica local (COSTA *et al.*, 2000), antifúngica (ZHENG *et al.*, 1992) e anticarcinogênica (CHINOUE *et al.*, 1996).

O perfil químico das cascas reforça a predominância de compostos sesquiterpenos estes resultados quando comparados com os da literatura que relata que plantas da família Lauraceae apresentam essa característica de compostos dessa classe (ALCÂNTARA *et al.*, 2010; CICCIO & CHAVERRI, 2008). Compostos como α -copaeno que mostrou ser um dos constituintes principais já fora relatado em outra planta do gênero a *Ocotea brenesii* estudada por CICCIO & CHAVERRI, (2005) como constituinte majoritário. Foi observado que os compostos encontrados nas cascas como: β - cubebeno, α - cadinol, β - selineno, globulol e β - cariofileno conferem com o O.E extraído da matriz foliar da *Ocotea gomezzi* (CHAVERRI *et al.*, 2011) .

A técnica de identificação CG-EM quando utilizada em óleos essenciais, pode ocorrer um problema devido ao fato que a identificação de terpenos é complexa, pois os mesmos apresentam espectros de massas semelhantes especialmente os sesquiterpenos e muitas co-eluições, podem ocorrer, prejudicando desta maneira a correta identificação e o processo de quantificação, fato este explicaria a razão de alguns índices de retenção tabelados e calculados quando comparados não serem semelhantes (NEGREIROS, 2014).

5.5 Análise das frações

As frações obtidas para as folhas e cascas foram analisadas primeiramente por CG-DIC para verificar se ocorreu o isolamento de algum composto e seu grau de pureza. Entretanto observou-se que todas estavam com dois ou mais constituintes em grande intensidade o que dificultaria sua identificação por outras técnicas espectroscópicas. Consequentemente as frações foram escaminhadas para as análises em CG-EM para avaliação da composição química (Figuras 12 e 13). Foi possível obter das cascas um total de 8 frações e para as folhas um total de 5. As Tabelas 5 e 6 mostram os compostos majoritários de cada fração analisada.

Figura 12. Cromatogramas obtidos por CG-EM para as frações das folhas.

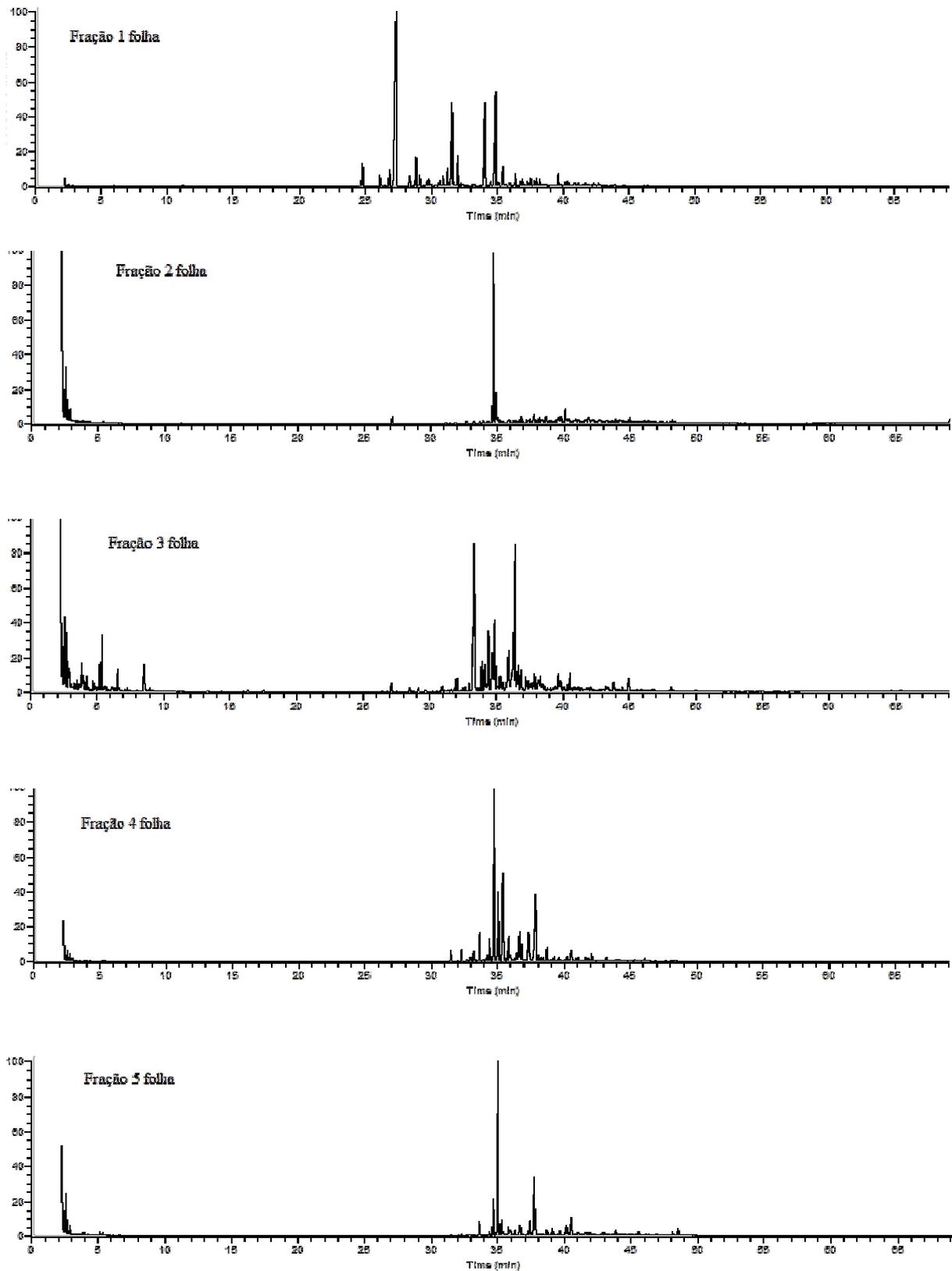
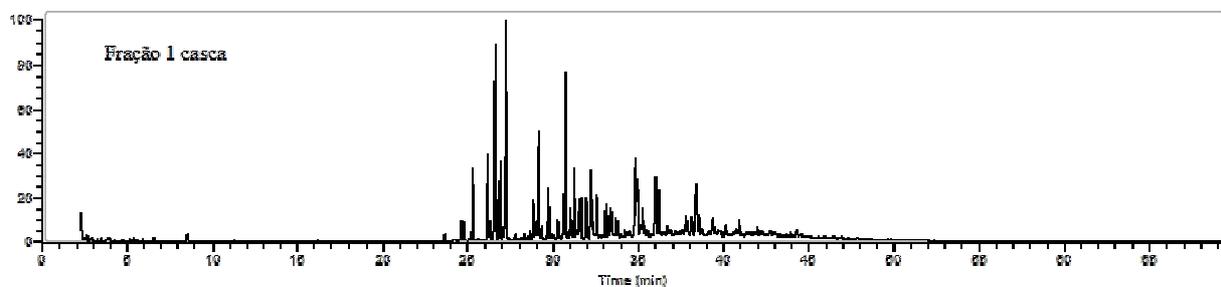


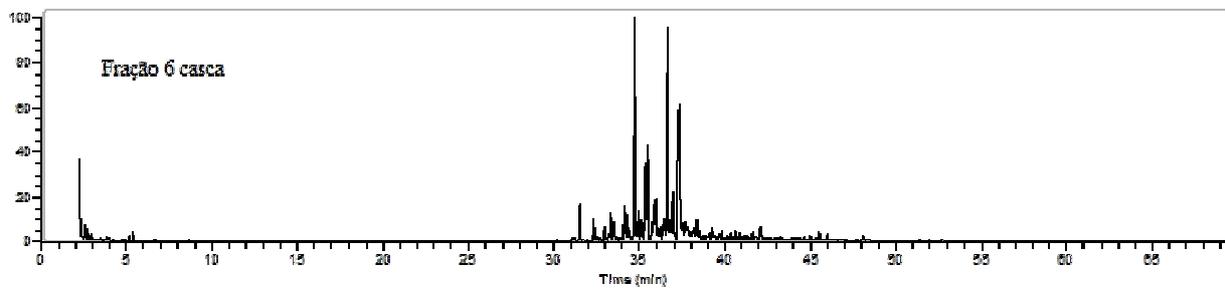
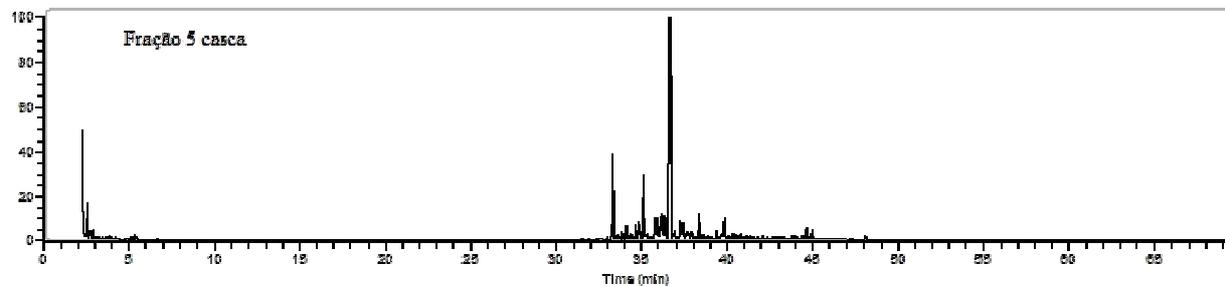
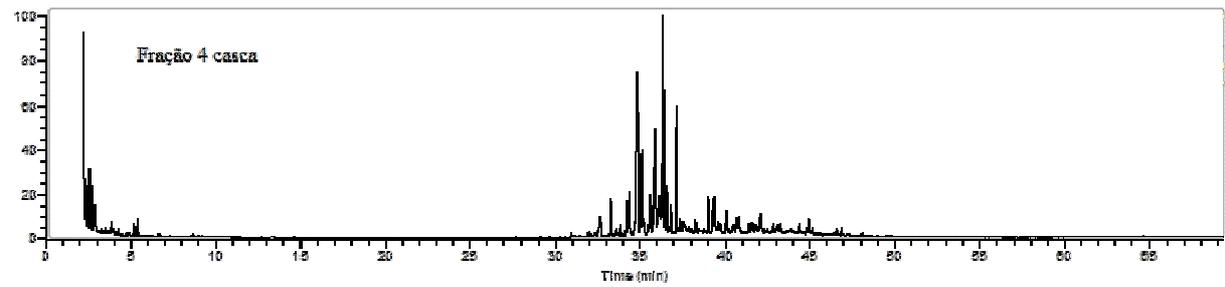
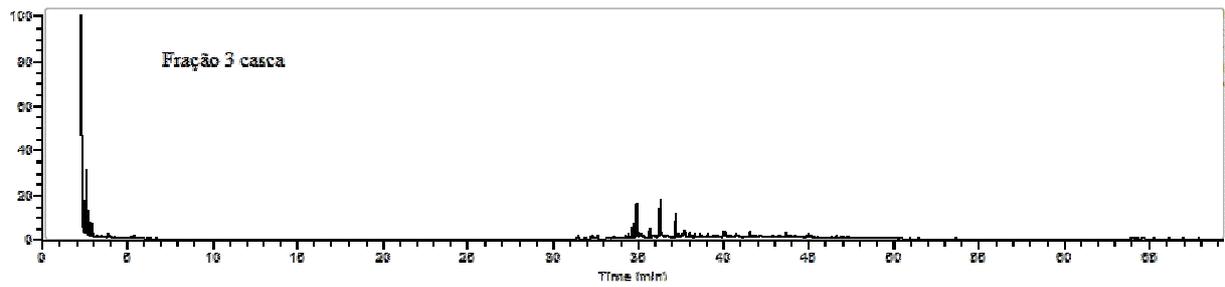
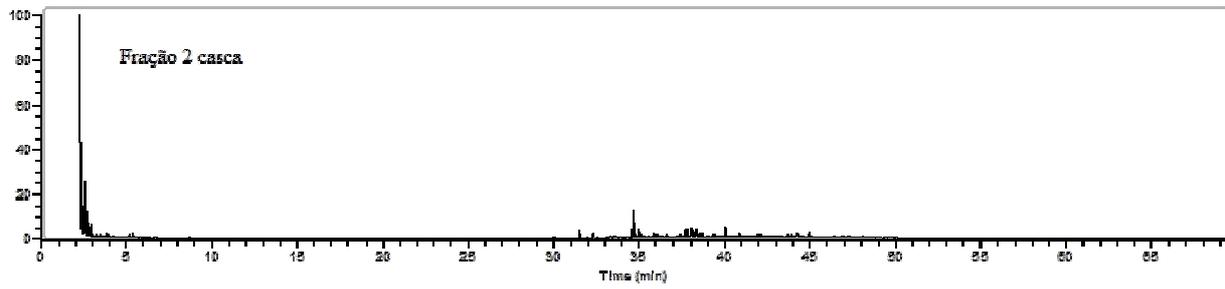
Tabela 5. Compostos majoritários para as frações das folhas analisadas por CG-EM.

Frações da folha	Composto	Tr	IR ^(cal)	IR ^(lit)	Peso (gr)	CG-EM (%)
1	β - elemeno	27.33	1377	1389	1,67	31,74
	τ - elemeno	31.57	1478	N		9,96
	Espatuleno	34.86	1561	1577		13,88
2	Espatuleno	34.74	1557	1577	1,55	38,13
3	Widdrol	33.31	1589	1599	1,82	3,62
	Palustrol	34.39	1549	1567		3,96
	Oxido de cariofileno	34.86	1561	1582		10,26
4	Elemol	33.65	1531	1548	1,53	3,03
	Globulol	35.07	1567	1590		8,23
	Ledol	35.40	1575	1602		11,40
	Espatuleno	34.78	1559	1577		23,25
	Juniper canfora	37.84	1639	N		11,49
5	Espatuleno	34,48	1556	1577	1,52	5,35
	Globulol	35,05	1566	1590		27,15
	α - cadinol	37,71	1636	1652		14,27

TR. Tempo de retenção. IR^{cal}: índice de retenção calculado. IR^{lit}: índice de retenção da literatura ADAMS,2007. Peso(gr): Peso de cada fração obtida.

Figura 13. Cromatogramas obtidos por CG-EM para as frações das cascas.





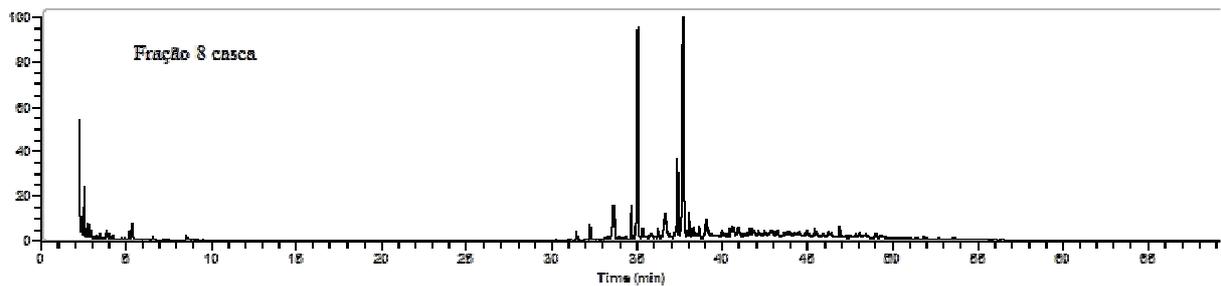
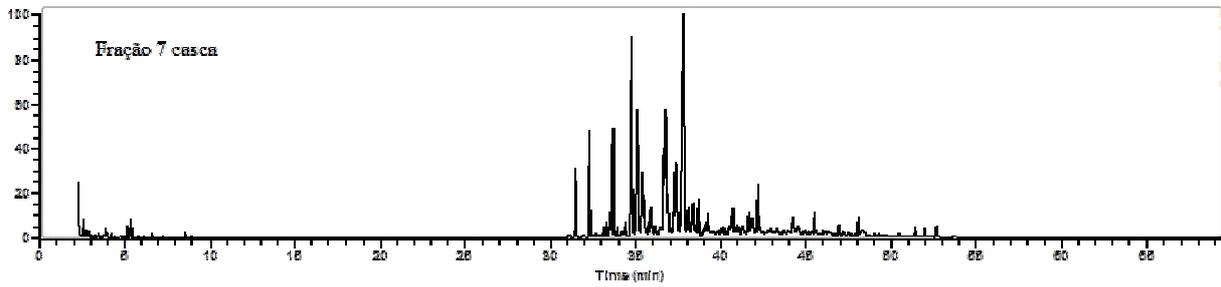


Tabela 6. Compostos majoritários para as frações das cascas analisadas por CG-EM.

Frações da casca	Composto	Tr	IR ^{cal}	IR ^{lit}	Peso(gr)	CG-EM (%)
1	Copaeno	26,58	1360	1374	0,09	7,65
	β - elemeno	27,22	1374	1389		9,58
	β - chamigreno	29,72	1434	1476		2,09
	muuroleno	30,75	1456	1478		7,47
	Calameneno	32,57	1503	1491		1,71
2	Espatuleno	34,68	1556	1577	0,09	8,49
3	Tetradecanal	36,25	1596	1611	0,07	10,22
	Cubenol	37,19	1622	1645		5,92
4	Cubenol	37,36	1621	1645	0,03	7,01
5	Widdrol	33,30	1521	1599	0,09	9,15
	Elixeno	35,13	1568	N		7,48
	Cubenol	36,69	1608	1645		29,99
6	Espatuleno	34,76	1559	1577	0,04	16,46
	Ledol	35,39	1575	1602		9,90
	Cubenol	36,70	1608	1645		17,64
	α - cadinol	37,35	1626	1652		14,74

7	Elemol	33,65	1530	1548	0,12	34,04
	Espatuleno	34,75	1559	1577		9,20
	α -cadinol	37,81	1638	1652		16,51
8	Globulol	35,02	1565	1590	0,10	15,77
	α -cadinol	37,71	1636	1652		19,23

TR: Tempo de retenção. IR^{cal}: índice de retenção calculado. IR^{lit}: índice de retenção da literatura ADAMS, 2007. Peso(gr): Peso de cada fração obtida.

As Tabelas 5 e 6 mostram as composições químicas determinadas para as frações dos óleos das cascas e folhas. Foi possível verificar que não houve diferença na composição quando comparada ao óleo bruto inicialmente analisado. Entretanto, alguns compostos químicos se destacam em relação ao seu percentual tanto para as frações das cascas como para folhas. Estes são o β - elemeno, estatuleno, cariofileno, Globulol, Ledol, Espatuleno, Juniper, Widdrol, Cubenol, Elemol e α - cadinol. Outros compostos que foram observados nas frações da folha mas que não foi quantificados no óleo foram os sesquiterpenos oxigenados ledol, palustrol (DAMPC & LUCZKIEWICZ, 2013) e globulol, sendo que este último foi possível verifica-lo somente na casca.

Na análise das cascas foi verificado a presença de dois compostos que não haviam sido descritos no óleo essencial como o aldeído tetradecanol (PIRES *et al.*, 2013) e o elemol (VELOSO *et al.*, 2012; BHATIA *et al.*, 2008).

5.6 Teste de Sensibilidade Antimicrobiano

Os óleos essenciais vêm sendo amplamente estudados em relação a suas propriedades antibacterianas e antifúngicas, tendo em vista a essas características, a avaliação por parte do teste antimicrobiano mostra-se de grande importância no estudo destes (GEROMINI *et al.*, 2012). O ensaio realizado para avaliar a inibição do crescimento de três bactérias foi do *American Type Culture Collection* (ATCC) sendo uma gram-negativa a *Escherichia coli* (ATCC SP 11229) e outras duas gram-positivas *Enterococcus faecalis* (ATCC SP 19433) e a *Staphylococcus aureus* (ATCC SP 2592), frente ao óleo essencial da *O. diospyrifolia*. Os

testes foram realizados tanto para cascas e folhas em comparação ao padrão de cloranfenicol. Os resultados são dispostos na Tabela 7.

Tabela 7. Valores do halo de inibição (mm) nas três bactérias analisadas frente ao óleo da *O. diospyrifolia* (5 μ L) contra ao padrão de cloranfenicol. (n=3)

Óleo <i>O. diospyrifolia</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Óleo da folha	-	23,28 \pm 6,14	14,67 \pm 3,16
Cloranfenicol	-	29,48	23,24
Óleo da casca	-	16,77 \pm 1,30	12,65 \pm 1,37
Cloranfenicol	-	28,66	24,83

(-) Não apresentou halo de inibição. \pm desvio padrão.

Somente a quantidade de 5 μ L do óleo foi significativa para os testes comprovando a ação antimicrobiana corroborando assim com o potencial de uso dessa planta como agente antibacteriano em bactérias gram-positivas. Os resultados obtidos mostraram uma eficácia frente às duas bactérias gram-positivas tanto para o óleo das folhas como para as cascas. Alguns fatores como sazonalidade e tipo de extração podem intervir na composição química (SIANI *et al.*, 2012), um fator preponderante no desempenho do O.E está na diferença da estrutura das bactérias gram-negativas e gram-positivas e assim bem como no desempenho da ação inibitória contra esses microrganismos.

Os compostos α - pineno, β - pineno, espatulenol e germacreno-D identificados no óleo da folha e β - cariofileno e espatulenol presentes no óleo da casca apresentam atividade antimicrobiana significativa frente a *S. aureus* (COSTANTIN *et al.*, 2001). Um trabalho sobre o óleo essencial da *Ocotea quixos* (Lauraceae) realizado por Bruni e colaboradores, (2004) a mesma mostrou ser eficaz na inibição de crescimento tanto nas bactérias gram-positivas *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis* e gram-negativa *Escherichia coli*. Um estudo realizado por Zhang e colaboradores, (2015) sobre o óleo essencial da canela utilizada como especiaria pertencente à família Lauraceae, mostrou que *E. coli* exerce uma maior resistência do que a *S. aureus*. Isso ocorre, provavelmente, devido às diferenças estruturais na membrana exterior das bactérias. As bactérias gram-negativas (*E. coli*) possuem uma camada espessa de lipopolissacárido da membrana externa que cobre a parede celular. Esta estrutura mostra ser mais resistente à substância hidrofóbicas no caso o O.E, em comparação com as gram-

positivas *S. aureus*, que possuem uma única camada de peptidoglicano. Esse fato explicaria a atividade apenas para os agentes gram-positivos testados.

5.7 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A Concentração Inibitória Mínima apresentada pelo óleo essencial da casca foi de 36000 µg/mL frente a bactéria *Acinetobacter baumannii*. A literatura descreve que os óleos essenciais com CIM até 500 µg/mL possuem atividade antimicrobiana forte, com CIM entre 600 e 1600 µg/mL apresentam atividade moderada e CIM acima de 1600 µg/mL é considerado com atividade fraca (SARTORATTO *et al.*, 2004; KUETE *et al.*, 2010;).

Acredita-se que essa fraca atividade seja atribuída a alguns compostos encontrados no O.E da casca como o α -copaeno (8,01%) (ALVES *et al.*, 2013), o mesmo pode ser encontrado no O.E dos frutos da *Pterodon emarginatus* (Fabaceae) este constituinte é detentor de atividade antifúngica e antibacteriana tanto em microrganismos gram-negativos e gram-positivos (GUIL-GUERRERO *et al.*, 2016). O α - cubenol (3,76%) é reconhecido como citotóxico e, portanto, explicaria a atividade antimicrobiana notada em um estudo sobre a *Campomanesia xanthocarpa* Berg, popularmente conhecida como guavirova, pertencente à família Myrtaceae utilizando o teste CIM (CAPELETTO *et al.*, 2015).

Um trabalho realizado por RAGGI, (2008) com espécies do mesmo gênero como a *Ocotea nectrandafolia* e *Ocotea puberula* que possui uma composição química semelhante a da planta estudada neste trabalho apresentaram atividade antimicrobiana contra *S.aureas* e *Pseudomonas aeruginosa*. Dados literários constam que plantas da família lauraceae como a *Cinnamomum filipedicellatum* apresentam atividade moderada frente às bactérias Gram+ e Gram- (RAMESHKUMAR *et al.*, 2006). Assim como a *Cinnamomum chemungianum* que apresenta moderada atividade frente às bactérias *S. aureus*, *Salmonella typhi*, *E. coli* e *Klebsiella pneumoniae* (BASKARAN & EBBIE, 2008).

5.8 Sinergismo Entre Óleo Essencial e Antibiótico pelo Método Time-kill

O teste inicial de sinergismo entre os óleos e antibióticos pela técnica de difusão em meio sólido utilizando discos de papel filtro. Pode ser observado na Tabela 8. Os antibióticos (AB) empregados no estudo foram: Imipenem, piperacilina/tazobactam, ciprofloxacina,

amicacina, polimixina B com a bactéria gram-negativa *Acinetobacter baumannii* portadora do gene de resistência *bla_{oxa-23}*.

Tabela 8. Associação óleo essencial da *Ocotea diospyrifolia* e antibióticos e a bactéria *Acinetobacter baumannii*.

O.E. da <i>O. diospyrifolia</i>	Antibióticos				
	IPM	PPT	CIP	AMI	POLB
Folha	-	1 mm	-	1 mm	-
Casca	4 mm	-	-	-	3 mm

IPM: imipenem, PPT: piperacilina/tazobactam, CIP: ciprofloxacina, AMI: amicacina, POLB: polimixina B.

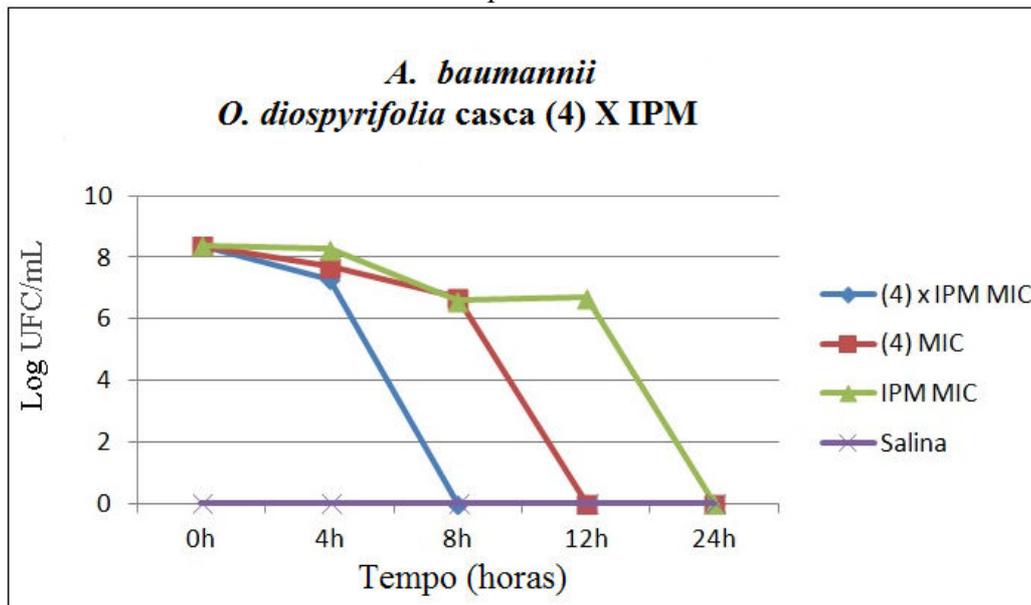
Foi considerado a ocorrência de sinergismo entre o óleo da casca com os antibióticos imipenem (IPM) apresentando um halo de inibição de 4 mm e com POLB com 3 mm. A folha apresentou resultados indiferentes, ou seja, nenhum efeito relevante. Este resultado mostra-se promissor quando observamos dados na literatura que relatam uma maior eficiência de sinergismo no controle de bactérias gram-positivas como é caso da *S.aureus* do que em bactérias gram-negativas *E.coli* (RIBEIRO *et al.*, 2013).

Perante a estes resultados preliminares foi realizado o teste de confirmação de sinergismo somente com o óleo da casca já que mesmo mostrou-se eficiente. Utilizando-se o ensaio Time-kill ou curva de sobrevivência bacteriana no qual foi utilizada técnica de microdiluição seguindo-se as diretrizes estabelecidas pelo CLSI. Nas Figuras 14 e 15, são observados os perfis de redução. O resultado utilizando o antibiótico imipenem em associação com O.E da casca *O. diospyrifolia* mostrou uma redução do crescimento em oito horas da bactéria *A. baumannii*. Quando comparamos a ação do antibiótico sozinho juntamente com a bactéria temos uma redução de crescimento bacteriano em 24 horas dessa maneira podemos afirmar que houve ação sinérgica do óleo essencial mais o antibiótico imipenem.

A associação do antibiótico polimixina B (POL) com o óleo possibilitou uma redução do crescimento bacteriano em quatro horas, o efeito antibiótico sozinho no controle da bactéria não se mostrou tão eficaz, diante deste resultado podemos constatar a ação sinérgica. Em relação á utilização do antibiótico polimixina B é devido o mesmo ser utilizado no tratamento contra a bactéria, porém a sua redução no crescimento bacteriano é baixo e muitas vezes pode não apresentar efeito no combate de crescimento do microrganismo *A. baumannii*, já que a mesma apresenta genes de resistência diferentes e dependendo do gene o antibiótico

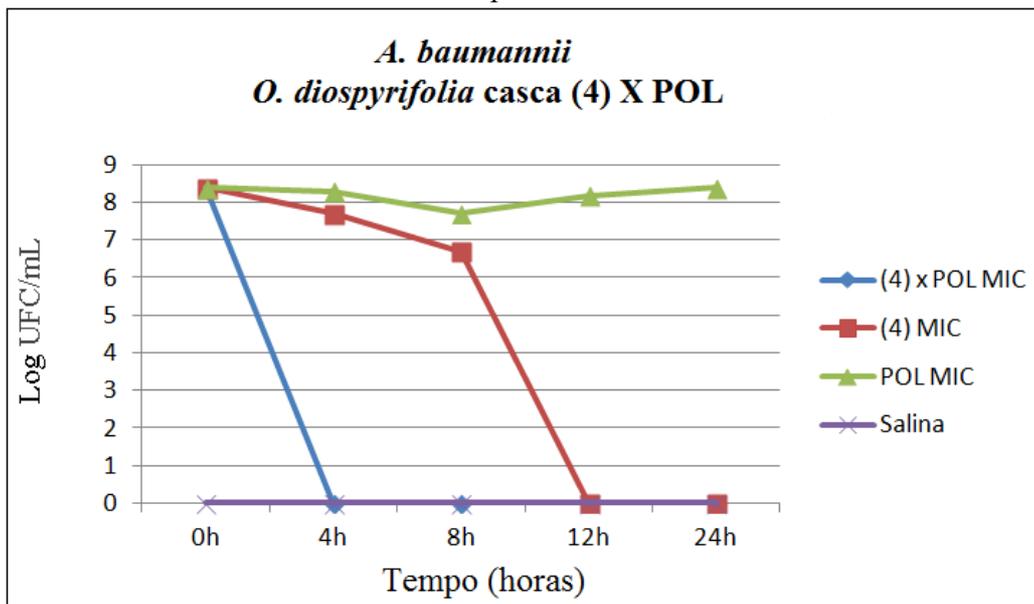
não surti efeito, drogas anteriormente rejeitadas como a própria POL estão novamente sendo colocadas em uso em combinação com óleo essencial (BOUCHER *et al.*, 2009).

Figura 14. Curvas de sobrevivência adquiridas para a bactéria *Acinetobacter baumannii* contra o óleo da casca da *O. diospyrifolia* (4) x IPM durante o período de 24 horas. Com interação do óleo essencial e o antibiótico Imipenem.



(4) x IPM MIC: Óleo essencial +Imipenem (antibiótico) em relação a bactéria *A.baumannii*. (4) MIC: Óleo essencial+ a bactéria. IPM MIC: Controle antibiótico + bactéria.

Figura 15. Curvas de sobrevivência adquiridas para a bactéria *Acinetobacter baumannii* contra o óleo da casca da *O. diospyrifolia* (4) x IPM durante o período de 24 horas. Com interação do óleo essencial e o antibiótico Imipenem.



(4) x POL MIC: Óleo essencial +Polimixina B (antibiótico) em relação a bactéria *A.baumannii*. (4) MIC: Óleo essencial+ a bactéria. POL MIC: Controle antibiótico + bactéria.

O sinergismo que ocorre entre o óleo essencial e antibiótico pode ter uma relação de interação do O.E com a membrana do microrganismo e por este motivo permitir que o antibiótico tenha uma maior interação com o agente bacteriano e sua ação seja mais eficaz (D'ARRIGO *et al.*,2010). Em um trabalho realizado por Harris e colaboradores, (2003) reporta que devido à natureza lipídica dos compostos terpênicos que estão presentes no óleo, resulta em um transporte melhor do antibiótico para dentro da célula bacteriana, alterando a permeabilidade da membrana citoplasmática.

Estudos em relação ao sinergismo entre antibióticos e O.E no controle da bactéria *A. baumannii* são de grande valia, já que o número de opções de tratamento com antibióticos disponíveis atualmente é limitado, para combater a multi-resistente *A. baumannii*. Os problemas relativos à aplicação de antibióticos convencionais, com exceção da resistência antimicrobiana, incluem efeitos colaterais (tóxicos, teratogênicos e / ou mutagênicos; reação de hipersensibilidade etc.), problemas como estes reforçam a busca por novas alternativas.

Teste de sinergismo com O.E+AB já foram descritos na literatura para inibir a *A. baumannii* como é o caso do O.E da *Myrtus communis* pertencente à família Myrtaceae (ALEKSIC *et al.*, 2014). *Coriandrum sativum* L. (Apiaceae) conhecida popularmente como coentro também teve sua atividade sinérgica estudada e eficácia comprovada (DUARTE *et al.*,2012).

6. CONCLUSÃO

O perfil cromatográfico para o óleo essencial da *Ocotea diospyrofolia* apresentou em sua composição química desde monoterpenos a sesquiterpenos oxigenados para as folhas e a ocorrência de compostos sesquiterpenos para casca.

Quando observamos os testes antimicrobianos frente às bactérias gram-positivas e negativas o O.E apresentou efeito somente para as bactérias gram-positivas *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus* resultado este que reforça o relato de que micro-organismos gram-negativos apresentam uma resistência maior perante óleos essenciais devido as suas estruturas celulares.

A realização do CIM perante a bactéria *Acinetobacter baumannii* apresentou uma fraca atividade com valor de 36000 µg/mL.

O teste de sinergismo para o óleo da casca se mostrou eficaz quanto ao potencial de redução de crescimento bacteriano em associação com antibióticos Polimixina B e Imipenem, resultados como estes corroboram para testes futuros como a realização dos ensaios “checkboard” para verificação das melhores combinações de concentrações entre os agentes e cálculo do FIC (Fractional Inhibitory Concentration) e a toxicidade. Através do sinergismo foi possível a redução de até 8 horas no crescimento bacteriano com a associação entre o óleo e o antibiótico imipenem e de 4 horas para polimixina B e óleo essencial.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R. P. Identification of essential oil components by gas chromatography / mass spectrometry, **Baylor University**, USA, 2007.

AHMAD, I.; BEG, A.Z. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. **Journal of Ethnopharmacology**, v.74, n.2, p.113-123, 2001.

ALCÂNTRA, J. M.; YAMAGUCHI, K. K. L.; JUNIOR, V, F. V. Composição química de óleos essenciais de espécies de *aniba* e *licaria* e suas atividades antioxidantes e antiagregante plaquetária. **Química Nova**, v.33, n.1, p.141-145,2010.

ALEKSIC, V.; MIMICA-DUKIC, SIMIN, N.; NEDELJKOVIC, N. S.; KNEZEVIC, P. Synergistic effect of *Myrtus communis* L. essential oils and conventional antibiotics against multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* wound isolates. **Phytomedicine**, v.21, n.12, p. 1666–1674, 2014.

ALVES, S. F.; BORGES, L. L.; DE PAULA, J. A. M.; VIEIRA, R. F.; FERRI, P. H.; COUTO, R. O.; PAULA, J. R.; BARA, M. T. F. Chemical variability of the essential oils from fruits of *Pterodon emarginatus* in the Brazilian Cerrado. **Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.23, n. 2, p. 224-229, 2013.

ANGNES, S. I. A. **isolamento, Caracterização Química e avaliação da propriedade inseticida do óleo essencial de *Piper amplum* Kunth**. 2005. 88 p. Dissertação (programa de pós-graduação em química) – Universidade Regional de Blumenau, 2005.

ANTUNES, R. M. P.; LIMA, E. O.; PEREIRA, M. S. V.; CAMARA, C. A.; ARRUDA, T. A.; CATÃO, R. M. R.; BARBOSA, T. P.; NUNES, X. P.; DIAS, C. S.; SILVA, T. M. S. Atividade antimicrobiana “in vitro” e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de fitoconstituintes e produtos sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.16, n.4, p.517-524, 2006.

AQUINO, F. T.; SANTIAGO-SILVA, M. Determinação de ácidos Carboxílicos em compostos resíduos sólidos urbanos por cromatografia gasosa com detector de ionização em chama. **SciELO**, v. 31, n. 2, p.25-30, 2006.

ARAUJO, A. J. ; LORDELLO, A. L. L.; MAIA, B. H. L. N. S. Comparative analysis of the essential oils from leaves and stems of *Ocotea puberula* (Lauraceae). **Visão Acadêmica** ,v. 2, n.2, p.81-84, 2001.

AZAMBUJA, W. óleos essenciais.org. óleos essenciais: O início de sua história no Brasil, 2015. Disponível em: <http://www.oleosessenciais.org/oleos-essenciais-o-inicio-de-sua-historia-no-brasil>. Acesso em: 10/12/2015.

BAIN.; COMPANY. Potencial de diversificação da indústria química Brasileira, Relatório 4-Aromas, sabores e fragrâncias. 1. ed. Rio de Janeiro, 2014.

BAKKALI, F. Biological effects of essential oils. **Food and chemical toxicology**, v.46,n. 2, p.446-475, 2008.

BALABENI, V.; TOGNOLINI, M.; BERTONI, S.; BRUNI, R.; GUERRINI, A.; RUEDA, G.M.; BAROCELLI, E. Antiplatelet and antithrombotic activities of essential oil from wild *ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. (Lauraceae) calices from Amazonian Ecuador. **Pharmacological Research**, v.55, n.1, p. 23-30, 2007

BARBOSA-FILHO , J. M; CUNHA, R.; DIAS, C. S.; ATHAYDE-FILHO, P. F.; SILVA, M. S.; DA-CUNHA, L.; EMIDIO, V.; MACHADO, M. I. L.; CRAVEIRO, A. A.; MEDEIROS, I. A. GC-MS analysis and cardiovascular activity of the essential oil of *Ocotea duckei*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.1, p.37-41, 2008.

BASKARAN, X.; EBBIE, M.G. Essential Oil Compounds and Antibacterial Activity of Leaves of *Cinnamomum chemungianum* Mohan et Henry (Lauraceae). **Ethnobotanical Leaflets**, v.12, p. 565-569, 2008.

BETONI, J. E. C.; MANTOVANI, R. P.; BARBOSA, L. N.; DI STASI, L. C.; Fernandes Junior A. Synergism between plant extract and antimicrobial drugs used on *Staphylococcus aureus* diseases. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.101, p.387-90, 2006.

BIKMORADI, A.; SEIFI, Z.; POOROLAJAL, J.; ARAGHCHIAN, M.; SAFIARYAN, R.; OSHVANDI, K. Effect of inhalation aromatherapy withlavender essential oil on stress and vitalsigns in patients undergoing coronary arterybypass surgery: A single-blindedrandomized clinical trial. **Complementary Therapies in medicine**, v.23, p.331-338, 2015.

BHATIA, S. P.; LETIZIA, C. S.; API, A. M. Fragrance material review on elemol. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p.147–S148, 2008.

BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: Aspectos gerais , desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**,v.32,n.3,p.588-594, 2009.

BOBACH, C.; SCHURWANZ, J.; FRANKE, K.; DENKERT,A.; VAN SUNG,T.;KUSTER, R.; MUTISO,P,C.; SELINGER, B.; WESSJOHANN, L, A. Multiple readout assay for hormonal (androgenic and antiandrogenic) and cytotoxic activity of plant and fungal extracts based on differential prostate cancer cell line behavior. **Journal of Ethnopharmacology**, v.155, p.721-730, 2014.

BOUCHER, H.W.; TALBOT, G. H.;BRADLEY, J.S.; EDWARDS JR, J. E.; GILBERT, D.; RICE, L.B.; SCHELD, M. SPELLBERG, B. BARTLETT, J. Bad Bugs , no drugs: no escape an update from the infectious diseases society of america (IDSA Report on Development Pipeline CID),v.48, p .1–12, 2009.

BROTTO, M. L.; BAITELLO, J. B.; Uma espécie nova de Lauraceae da floresta atlântica do Brasil. **Rodriguésia**, v.63, n3, p.579-585, 2012.

BRUNI, R.; MEDICI, A.; ANDREOTTI, E.; FATIN, C.; MUZZOLI, M.; DEHESA, M.; ROMAGNOLI, C.; SACCHETTI,G. Chemical composition and biological activities of Ishpingo essential oil, a traditional Ecuadorian spice from *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. (Lauraceae) flower calices. **Food Chemistry**, v.85, p.415–421, 2004.

BURT, S.A; REINDERS, R.D. Antibacterial of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. **Letters in Applied Microbiology**, v.36, p. 162-167, 2003.

CAMARGO, M. J.; MIRANDA, M. L. D.; KAGAMIDA, C. M.; RODRIGUES, E. D.; GARCEZ, F. R.; GARCEZ, W. S. Sesquiterpenos de *ocotea lancifolia* (Lauraceae). **Química Nova**, v.36, n.7, p.1008-1013, 2013.

CAPELETTO, C.; CONTERATO, G.; SCAPINELLO, J.; RODRIGUESA, F. S.; COPINIA, M. S.; KUHNA, F.; TRESCH, M. V.; MAGROA, J. D.; OLIVEIRA, J. V. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of guavirova (*Campomanesia xanthocarpa* Berg) seed extracts obtained by supercritical CO₂ and compressed n-butane. **The Journal of Supercritical Fluids**, v.110, p.32-38, 2015.

CHAVERRI, C.; CICCIO, J.F. Essential oil trees of the genus *Ocotea* (Lauraceae) in Costa Rica I. *Ocotea brenesii*. **Revista de BiologiaTropical**, v.53, n.3-4, p. 431-436

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

CHINOU, I.B.; ROUSSIS, V.; PERDETZOGLOU, D.; LOUKIS, A. Chemical and biological studies on two *Helichrysum* species of Greek origin. **Planta Medica**, v.62, n.4, p.377-379, 1996.

CICCIO, J.F.; CHAVERRI, C. Volatile constituents of the oils from *Povedadaphne quadriporata* (Lauraceae) from “Alberto M. Brenes” biological preserve, Costa Rica. **Química Nova**, v.31, n.3, p.605-609, 2008.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S.; **Fundamentos de Cromatografia**. 4. Ed. Campinas: Unicamp, 2011.

COSTA, L. B.; TSE, M. L.; MIYADA, V. S. Extratos vegetais como alternativas aos antimicrobianos promotores de crescimento para leitões recém desmamados. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, p.589-595, 2007.

COSTA, T.R.; FERNANDES, O.F.L.; SANTOS, S.C.; OLIVEIRA, C.M.A.; LIÃO, L.M.; FERRI, P.H.; PAULA, J.R.; FERREIRA, H.D.; SALES, B.H.N.; SILVA, M.R.R. Antifungal activity of volatile constituents of *Eugenia dysenterica* leaf oil. **Journal of Ethnopharmacology**, v.72, p.111-117, 2000.

COUTINHO, D.F.; DIAS, C.S.; BARBOSA-FILHO, J.M.; AGRA, M.F.; MARTINS, R.M.; SILVA, T.M.S.; DA CUNHA, E.V.L.; SILVA, M.S. Composition and molluscicidal activity of the essential oil from the stem bark of *ocotea bracteosa* (Meisn.) Mez. **Journal of Essential Oil Research**, v.19, n.5, p. 482-484, 2007.

COY-BARRERA, E. D.; CUCA-SAUÁREZ, L. E. *In vitro* anti-inflammatory effects of naturally-occurring compounds from two Lauraceae plants. **Anais da Acadêmia Brasileira de Ciências**, v.83, n.4, p. 1397-1402, 2011.

DAMPC, A.; LUCZKIEWICZ, MARIA. *Rhododendron tomentosum* (Ledum palustre). A review of traditional use based on current research. **Fitoterapia**, v. 85, p.130–143, 2013.

D'ARRIGO, M., GINESTRA, G., MANDALARI, G., FURNERI, P. M., & BISIGNANO, G. Synergism and postantibiotic effect of tobramycin and *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Phytomedicine**, v.17, n.5, p.317-322, 2010.

DOS SANTOS, L. B.; SOUZA, J. K.; PAPASSONI, B.; BORGES, D. G. L.; JUNIOR, G. A. D.; SOUZA, J. M. E.; CAROLLO, C. A.; BORGES, F. A. Efficacy of extracts from plants of the Brazilian Pantanal against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Revista brasileira de Parasitologia veterinária**, v.22, p.532-538, 2013.

DUARTE, A.; FERREIRA, S.; SILVA, F.; DOMINGUES, F.C.; Synergistic activity of coriander oil and conventional antibiotics against *Acinetobacter baumannii*. **Phytomedicine**, v. 19, p.236-238, 2012.

essential oil of *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. **Neotropical Ichthyology**, v.11,n.3, p.667-674,2013.

ESTANISLAU, A. A.; BARROS, F. A. S.; PENA, A. P.; SANTOS, S. C. FERRI, P. H. PAULA, J. R. Composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de cinco espécies de *eucaliptus* cultivadas em Goiás. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.11, n.2, p.95-100, 2001.

FAUTH, S.; CAMPOS, A. R.; SILVEIRA, E. R.; RAO, V. S. Efeitos de óleos essenciais de plantas no tempo de sono induzido por cetamina em Camundongos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.12, p.112-113, 2002.

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**, v.11,p. 104, 2011.

FERNANDES, E.S.; PASSOS, G.F.; MEDEIROS, R.; DA CUNHA, F.M.; FERREIRA, J.; CAMPOS, M.M.; PIANOWSKI, L.F.; CALIXTO, J.B. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. **European Journal of Pharmacology**, v.569, n.3, p.228-236, 2007.

GEROMINI, K. V. N.; RORATTO, F. B.; FERREIRA, F. G.; POLIDO, P. P.; SOUZA, S. G. H.; VALLE, J. S.; COLAUTO, N. B.; LINDE, G. A. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de plantas medicinais. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia**, v.15, n.2,127-131, 2012.

GHELARDINI, C.; GALEOTTI, N.; DI CESARE MANNELLI, L.; MAZZANTI, G.; BARTOLINI, A. Local anaesthetic activity of beta-caryophyllene. **II Farmaco**, v.56, p.387-389, 2001.

GOMES, S.M. **Atividades biológicas dos óleos essenciais de três espécies do gênero citrus e de seus componentes majoritários**. 2014, 126 p. Tese de Doutorado (Doutorado em Agroquímica) Lavras, 2014.

GONZALEZ, M. S.; LIMA, B.G., OLIVEIRA, A. F. R., NUNES, D.D.; FERNANDES, C. P.; SANTOS, M. G.; TIETBOHL, L. A. C.; MELLO, C. B.; ROCHA, L.; FEDER, D. Effects of essential oil from leaves of *Eugenia sulcata* on the development of agricultural pest insects. **Revista Brasileira de farmacognosia**, v.24, p.413-418, 2014.

GUIL-GUERRERO. J. L.; RAMOS, L.; MORENO, C.; ZÚÑIGA-PAREDES, J. C.; CARLOSAMA-YEPEZ, M.; RUALES, P. Antimicrobial activity of plant-food by-products: a review focusing on the tropics. **Livestock Science**, v.189, p.32-49, 2016.

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**, v.1, n.3, p.173-176, 2011.

HARRIS, R. Sinergism in the essential oil world. **The International Journal of Aromatherapy**, v.12, p.179-186, 2003.

JIANGSEUBCHATVEERA, N.;LIAWRUANGRATH, B.; LIAWRUANGRATH, S.; KORTH, J.; PYNE, S.G.The chemical constituents and biological activities of the essential oil and the Extracts from Leaves of *Gynura divaricata* (L.) DC. Growing in Thailand. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v.3, n.8, p.543-555, 2015.

KFOURY, M.; AUEZOVA, L.; GREIGE-GERGES, H.; FOURMENTIN, S. Promising applications of cyclodextrins in food: Improvement of essential oils retention, controlled release and antiradical activity. **Carbohydrate Polymers**, v.131, p.264-272, 2015.

KAU, A. L.; MARTIN, S. M.; LYON, W.; HAYES, E.; CAPARON, M. G.; HULTGREN, S. *Enterococcus faecalis* tropism for the kidneys in the urinary tract of C57BL/6J Mice, **Infection and immunity**, v.73, n.4, p.2461-2468, 2005.

KNEZEVIC, P.; ALEKSIC, V.; SIMIN, N.; SVIRCEV, E.; PETROVIC, A.; MIMICA-DUKIC, N. Antimicrobial activity of *Eucalyptus camaldulensis* essential oil and their interactions with conventional antimicrobial agents against multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.178, p.125-136, 2016.

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. **Pharmaceutical Biology**, v. 76, 536-542, 2010.

KUMAR, A. S.; VENKATESHWARAN, K.; VANITH, J.; SARAVANAN, V. S.; GANESH, M.; VASUDEVAN, M.; SIVAKUMAR T. Synergistic activity of methanolic extract of *Thespesia populnea* (Malvaceae) flowers with oxytetracycline. **Bangladesh J Pharmacol**, v.4, p. 6-13, 2009.

LI, J.; Y, J.; LIU, A.; WANG, Y.; β -Elemene against human lung cancer via up-regulation of P53 protein expression to promote the release of exosome. **Lung cancer**, v. 86, p.144-150, 2014.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 2ª ed. Nova Odessa, Plantarum, 1998.

LUPE, F. A. **Estudo da composição química de óleos essenciais de plantas aromáticas da Amazônia**. 2007. 120 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Unicamp, São Paulo - Campinas, 2007.

MAAR, J. H.; ROSENBROCK, L. C. C. A química fina que poderia ter sido: a extração de óleo de sassafrás e de safrol no alto e médio vale do Itajaí. **Scientia & Studia**, v.10, n.4, p.799-820, 2012.

MINH, D. H.; MINH, S. H.; HONJOH, K. I.; MIYAMOTO, T. Isolation and bio-control of extended spectrum beta-lactamase (ESBL)- producing *Escherichia coli* contamination in raw chicken meat by using lytic bacteriophages. **LWT- Food science and technology**, v.71, p.339-346, 2016.

MÜHLEN, C. V. Índices de retenção em cromatografia gasosa bidimensional abrangente. **Scientia Chromatographica**.v.1, 2009.

NAGATO, L. A. F.; DURAN, M. C.; CARUSO, M. S. F.; BARSOTTI, R. C. F.; BADOLATO, E. S. G. Monitoramento da autenticidade de amostras de Bebidas Alcoólicas enviadas ao Instituto Adolfo Lutz em São Paulo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.21, n.1, p.39-42, 2001.

NAIR, R.; WU, J.; CARREL,M.; O'BRIEN,A.; QUICK,M.; FARINA,S.; WARDYN,S.; THAPALIYA, D.; GRENIER,D.; SMITH, T, C. Prospective multicenter Surveillance identifies *Staphylococcus aureus* infections caused by livestock-associated strains in an agricultural state. **Diagnostic Microbiology and infectious disease**, v.85, p.360-366, 2016.

NASCIMENTO, A.R.; SERRA, J. L.; MARTINS, A. G. L. A.; MOUCHREK FILHO, J. E.; ARAGÃO, N. E.; ANDRADE, L.S. Efeito inibitório do óleo essencial do *eucalyptus* sp., puro e associado a antibióticos, frente a cepas de *escherichia coli* e *staphylococcus aureus* isoladas de manipuladores, alimentos, areia e água do mar. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 28, n. 1, p.141-148, 2010.

NEGREIRO, M. O. **Avaliação da atividade antimicrobiana e antibiofilme de óleos essenciais de *heteothalamus* SP. Sobre *Enterococcus faecalis***. 2014. 88 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia agrícola e do ambiente).Instituto de ciências básicas da saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul , Porto Alegre,2014.

NISBET, L. J.; MOORE, M. Will natural products remain an important source o drug research for the future? **Current Opinion in Biotechnology**, p.708-712, 1997.

OLIVEIRA, R.A.G.O.; LIMA, E.O.; VIEIRA, L.W.; FREIRE, K.R.L.; TRAJANO, V.N.; LIMA, I.O.; SOUZA, E.L.; TOLEDO, M.S.; SILVA-FILHO, R.N. Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. **Revista brasileira farmacognosia**, v.16, n.1, p.77-82, 2006.

Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão: Norma Aprovada – M2-A8 Vol. 23 No 1 - Oitava Edição, adaptação de NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eighth Edition. NCCLS document M2-A8 (ISBN 1-56238-485-6). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

PASSOS, G.F.; FERNANDES, E.S.; DA CUNHA, F.M.; FERREIRA, J.; PIANOWSKI, L.F.; CAMPOS, M.M.; CALIXTO, J.B. Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenacea*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.110, n.2, p.323-333, 2007.

PEDROZO, M. DE FATIMA. M.; SIQUEIRA, M. E. P. B. Determinação espectrométrica e cromatográfica em fase gasosa de ácido tricloroacético em urina. **Revista Saúde Pública**, v.30, n.3, p.261-6,1996.

PEREIRA, A. I. S.; PEREIRA, A. G. S.; SOBRINHO, O. P. L.; CANTANHEDE, E. K. P.; SIQUEIRA, L. F. S. Atividade antimicrobiana no combate as larvas do mosquito *Aedesaegypti*: homogeneização dos óleos essenciais do linalol e eugenol. **Educación Química**, v.25, n.4, p.446-449, 2014.

PEREIRA, R.S.; SUMITA, T.C.; FURLAN, M.R.; JORGE, A.O.C.; UENO, M. Antibacterial activity of essential oils on microorganisms isolated from urinary tract infection. **Revista de Saúde Pública**, n.2, v.38, p 326-328, 2004.

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**, v.76 n.7-8, p.712-714, 2005.

PIRES, C. R. F.; LIMA, J. P.; NASSUR, R. C.R.; LIMA, L. C.O .; VILAS BOAS, E.V.B. Caracterização do perfil volátil de abóboras comerciais brasileiras (*curcubita spp.*) utilizando HS/SPME e GC/MS. **Enciclopédia Biosfera**, v.9, n.17, p. 597- 609, 2013.

PRAKASH, B.; KEDIA, A.; MISHRA, P. K.; DUBEY, N. K. Plant essential oils as food preservatives to control moulds, mycotoxin contamination and oxidative deterioration of agri-food commodities e Potentials and challenges. **Food Control**, v.47, p.381-391, 2015.

PRIETO, J. A. Constituintes químicos, atividade antifúngica e inseticida de óleos essenciais de folhas de duas especies colombiano do gênero *ocotea* (lauraceae). **Revista Colombiana de Química** , v.39, n.2, p.199-209,2012.

PROBST, I. S. **Atividade antibacteriana de óleos essenciais e avaliação de potencial sinérgico**. 2012. 112 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biomoléculas), Universidade Estadual Paulista de Botucatu, 2012.

PROSSER, I.; ALTUG, I. G.; PHILLIPS, A. L.; KÖNIG, W. A.; BOUWMEESTER, J. H.; BEALE, M. H. Enantiospecific (+)- and (-)-germacrene D synthases, cloned from goldenrod, reveal a functionally active variant of the universal isoprenoid-biosynthesis aspartate-rich motif. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 432, n.2, p. 136-144, 2004.

QUINET, A.; BAITELLO, J. B.; MORAES, P. L. R. 2012. Lauraceae *In*: Forzza, R.C. (eds.). Lista de espécies da flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB008440>>. Acesso em: 08/11/ 2015.

RAGGI, L. **Estudo da Composição Química e das Atividades Biológicas de Óleos Voláteis de Espécies de Lauraceae, em Diferentes Épocas do ano**. 2008. 77 p. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) – Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente de São Paulo, 2008.

RAMESHKUMAR, K.B.; GEORGE, V. & SHIBURAJ, S.; Chemical constituents and antimicrobial activity of the leaf oil of *Cinnamomum filipedicellatum* Kostern. **Journal of Essential Oil Research**, v.18, p.234-236, 2006.

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

RIBEIRO, D. S.; VELOZO, E.S.; GUIMARÃES, A. G. Interaction between the rosemary essential oil (*rosmarinus officinalis* L.) and antimicrobial drugs in the control of bacteria isolated from foods. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v.4, n.1, p. 10-19, 2013.

ROSSI, C. A. R.; SOARES, M. Índices produtivos de fêmeas suínas alimentadas com dietas de gestação e lactação suplementadas com óleos essenciais de orégano e alecrim: avaliação de leitegadas. **Ciência Rural, Santa Maria**, v.43, n.11, p.2078-2084, 2013.

SADEGHI,P.; KHOSRAVI, A. D.; SHAHRAKI, A. H.; BEIRANVAND, M. Identification of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from iram and study of their heterogeneity. **Journal of the Chinese Medical Association**, v.79, p.382-386, 2016.

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.

SAAD, K.A.; ROFF, M.M.N.; HALLET, R.H.; IDRIS, A.B. Aphid-induced defences in chilli affect preferences of the whitefly, *benisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). **Scientific reports**, v.5, 2015.

SANTOS, S. O. ; ALVES, M. Flora da Usina São José, Igarassu, Pernambuco: Lauraceae. **Rodriguésia**, v.63, n.3, p.689-703, 2012.

SIANI, A.C.; SAMPAIO, A.L.F.; SOUZA, M.C.; HENRIQUES, M.G.M.O.; RAMOS, M.F.S. Óleos Essenciais. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 3, n.16, p.38-43, 2000.

SILVA FILHO, J. E.; RODRIGUES, S. S. F. B. Prospecção tecnológica do uso do óleo essencial de cravo-da-índia (*eugenia caryophyllata*) e do eugenol na formulação de produtos para higiene pessoal, alimentos e medicamentos. **Cadernos de Prospecção**, v.5, n.3, p.152-158, 2012.

SILVA, N. C. C. **Estudo comparativo da ação antimicrobiana de extratos e óleos essenciais de plantas medicinais e sinergismo com drogas antimicrobianas**. 2010. 75 p.. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, São Paulo - Botucatu, 2010.

SILVEIRA, J. C.; BUSATO, N. V.; COSTA, A. O. S.; JUNIOR, E. F. C. Levantamento e análise de métodos de extração de óleos essenciais. **Enciclopedia biosfera, centro científico**. v.8, n.15, p.2038, 2012.

SIMÕES, C. M. O. ; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da Planta ao Medicamento**. 5º ed. Editora da UFSC, 2003.

SIMÕES, C. M. O. **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. Universidade/ UFRGS / Ed. Da UFSC, 2003.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENCKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (Orgs.). **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. 6ª ed. Porto Alegre: Editorada UFRGS, Florianópolis: editora da UFSC ,1104, 2010.

SOUSA, F. C. F.; LEITE, C. P.; MELO C. T. V.; ARAÚJO, F. L. O.; GUTIERREZ, S. J. C.; BARBOSA-FILHO J. M.; FONTELES M. M. F.; VASCONCELOS, S. M. M.; VIANA, G.

S. B. Evaluation of Effects of *N*-(2-Hydroxybenzoyl) Tyramine (Riparin II from *Aniba riparia* (NEES) MEZ (Lauracea) in Anxiety Models in Mice. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.30, n.7, p.1212-1216, 2007.

STEFANELLO, M.E.A.; PASCOAL, A.C.R.F.; SALVADOR, M.J. Essential oils from neotropical Myrtaceae: chemical diversity and biological properties. **Chemistry & Biodiversity**. v8, p.73-94, 2011.

TONDOLO, J. S. M.; AMARAL, L. P.; SIMÕES, L. N.; GARLET, Q. I.; SCHINDLER, B.; OLIVEIRA, T. M.; SILVA, B. F.; GOMES, L.; BALDISSERATTO, B.; MALLMANN, C.A.; HEINZMANN, B. M. Anesthesia and transport of fat snook *Centropomus parallelus* with the essential oil of *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. **Neotropical Ichthyology**, v.11,n.3, p.667-674,2013.

TRAJANO, V. N.; LIMA, E. O.; SOUZA, E. L.; TRAVASSOS, A. E. R. Propriedade antibacteriana de óleos essenciais de especiarias sobre bactérias contaminantes de alimentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.29, n.3, p.542-545, 2009.

TRIPATHI P, KUMAR, DUBEY NK. Evaluation of some essential oils for their fungitoxicity against *Penicillium expansum* . **In Recent Advances in Mycological Research. I K International Publishing House**, p.119-128, 2006.

TROMBETA, D.; CASTELLI, F.;SARPIETRO, M. G.; VENUTI, V.; CRISTANI, M.; DANIELE, C.; SAIJA, A.; MAZZANT, G.; BISIGNADO, G. Mechanisms of Antibacterial Action of Three Monoterpene. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v.49, n.6, p.2474-2478, 2005.

VELOSO, R. A.; CASTRO, H. G.; CARDOSO, D. P.; SANTOS, G. R.; BARBOSA, L. C. A.; SILVA, K. P. Composição e fungitoxicidade do óleo essencial de capim citronela em função da adubação orgânica. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.47, n.12, p.1707-1713, 2012.

ZANIN, S. M. W.; LORDELLO, A. L. L. Mudanças de *Ocotea puberula* (LAURACEAE): identificação e monitoramento de alcalóides aporfinoídes . **Química Nova**, v.38, n.5, p.743-747, 2011.

ZHANG, Y.; LIU, X.; WANG, Y.; JIANG, P.; QUEK S.Y. Antibacterial activity and mechanism of cinnamon essential oil against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Food Control** , v.59, p.282-289, 2015.

ZHENG,G.Q.;KENNY, P.M.; LAM, L.K.T. Sesquiterpenes from clove (*Eugenia caryphyllata*) as potential anticarcinogenic agents. **Journal of Natural Products**, v.55, n.7, 999-1003, 1992.

ZHOU, Y.; LIU, H.; JIANG, N.; FENG, X.; FENG, X.; ZHANG, H.;WU , Z.; LIANG, H.; JIANG, Q.; CHEN, P. Elemene, the essential oil of *Curcuma wenyujin*, inhibits osteogenic differentiation in ankylosing spondylitis. **Em Consulte**, v.82, p.100-103, 2015.