

LUDMILA RAGGI

**ESTUDO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E DAS
ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE ÓLEOS VOLÁTEIS DE
ESPÉCIES DE LAURACEAE, EM DIFERENTES ÉPOCAS
DO ANO.**

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de MESTRE em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração de Plantas Vasculares em Análises Ambientais.

São Paulo
2008

LUDMILA RAGGI

**ESTUDO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E DAS
ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE ÓLEOS VOLÁTEIS DE
ESPÉCIES DE LAURACEAE, EM DIFERENTES ÉPOCAS
DO ANO.**

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de MESTRE em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração de Plantas Vasculares em Análises Ambientais.

ORIENTADORA: DR^a MARIA CLÁUDIA MARX YOUNG

Ficha Catalográfica elaborada pela Seção de Biblioteca do Instituto de Botânica

Raggi, Ludmila	
R142e	Estudo da composição química e das atividades biológicas de óleos voláteis de espécies de Lauraceae, em diferentes épocas do ano / Ludmila Raggi -- São Paulo, 2008. 67 p. il.
	Dissertação (Mestrado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2008 Bibliografia.
	1. Lauraceae. 2. Ocotea. 3. Espatulenol. I. Título
	CDU : 582.678.1

*Aos meus pais, Raggi e Fátima aos
meus irmãos, Hugo e Marco ao meu
marido, Ricardo e à minha filha Sofia,
dedico.*

*“Nossas dúvidas são traidoras e nos
fazem perder o que com frequência
poderíamos ganhar, por simples medo
de arriscar.”*

William Shakespeare

AGRADECIMENTOS

Agradeco

Aos meus pais, pessoas maravilhosas e mais que especiais, que sempre acreditaram em mim...eu os amo muito!!!

Ao meu querido irmão Hugo e minha cunhada Cláudia, agora mais do que nunca eternizados em meu coração. Obrigada pela força e pelo carinho.

Ao meu querido irmão Marco, sempre prestativo, me socorrendo nos momentos mais difíceis. Obrigada pelas caronas principalmente durante a gravidez. A minha cunhada Juliana, pela força e carinho. Vocês têm um espaço reservado em meu coração.

Ao meu eterno amor, companheiro e pai exemplar, Ricardo Skubs, obrigada pela força, pelo carinho e principalmente pela paciência.

À minha linda filha Sofia, a maior alegria da minha vida. Obrigada por você existir e transformar a minha vida nesse momento mágico. É impossível mensurar o amor que tenho por você.

À minha orientadora, Profa. Dr^a. Maria Cláudia Marx Young, pelos bons momentos de descontração e principalmente por confiar na minha capacidade.

Ao pesquisador Dr^o. João Batista Baitello por identificar as espécies estudadas.

Aos representantes do curso de Pós-Graduação do Instituto de Botânica de São Paulo, Dr^a. Sonia C. Campos Dietrich e Dr^a. Solange Mazzoni-Viveiros.

Aos pesquisadores da Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas, Dr^a. Ângela Maria Ladeira, Dr^a. Márcia Braga, Dr^a. Lillian Zaidan, Dr^a. Maria Ângela Carvalho, Dr^a. Marília Gaspar, Dra. Luce Brandão, Dr^a. Rita de Cássia Figueiredo, Dr^o. Edison Paulo Chu, Dr^o. Marco Aurélio Tiné, Dr^o. Emerson Alves da Silva, Dr^o. Marcos Aídar.

Ao coordenador do projeto “Flora aromática da Mata Atlântica no Estado de São Paulo: composição química dos óleos voláteis e análise da atividade biológica”, Prof. Dr^o. Paulo Roberto H. Moreno.

À Dr^a. /pós doc Elaine C. Lopes e Michelle Cristina pela amizade e ajuda na realização dos ensaios de atividade anticolinesterásica.

Ao mestrando Marcos Enoque L. Lima, pela ajuda na realização dos ensaios antimicrobianos.

Às pesquisadoras Dr^a. Carmen Lúcia Queiroga, Dr^a. Ângela Maria Ladeira, e Dr^a. Luciana Hetz de Carvalho, pelas sugestões, no exame de qualificação.

À curadoria do herbário, Dr^a. Maria Cândida Henrique Mamede, Ana Célia T. A. Calado e Regina Tomoko Shirasuna.

Aos funcionários da seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas, Mary Monteiro, Maria Aparecida, Ana Alice Martins Cardoso e Helena Cirilo.

Aos funcionários e amigos da pós-graduação, Márcia R. Ângelo "Marcinha", e Antonio Borges.

Aos funcionários da carreira de apoio Edmilson Vicente da Silva, sempre tão cuidadoso no manuseio do cesto elevatório, indispensável nas coletas, e Marco Antonio Machado e Ulisses do Carmo Peixoto (Bilú).

Aos funcionários da biblioteca, Maria Helena S.C.F. Gallo, Jefferson A. de Souza e Suelly P. de Caldas, pelo atendimento prestativo.

Ao amigo MSc. Paulo José Santana por me ajudar a procurar as espécies estudadas.

À amiga e praticamente co-orientadora MSc. Amanda de Souza, pelos bons momentos que passamos juntas ao longo desses três anos de amizade e principalmente, pela grande e valiosa ajuda durante todo o período do mestrado.

À amiga MSc. Juliana Iura, a quem serei eternamente grata! Obrigada por cada sorriso, pela super ajuda na dissertação, e principalmente por amar e cuidar tão bem do meu bem mais precioso. A Sofia também te ama, pode ter certeza!

Às amigas sempre presentes, Paola, Roberta, MSc. Tatiana "tortuguíta" e Vanessa Costa, pela amizade, confiança, força e especialmente pelo carinho. A porta da minha casa sempre estará aberta para vocês. Serei eternamente grata a vocês também!!!

À amiga PqC Vanessa Rebouças, sempre tão enrolada e tão eficiente. Você é uma grande amiga!

À grande amiga e “mãe” Mary Monteiro, sua amizade é muito importante para mim. Você é uma pessoa especial!

Aos amigos e colegas de laboratório, Marcelino, Nataly, Marina(s), Fernanda(s), Vanessa Oliveira, Grazielle, Patrícia Pinho, Giovanna, “Cláudinha”, Ricardo, Fabiano, Rodrigo(s), Márcia Débora, Aílton, Amanda Asega, Joãozinho, Kelly, Cristiane, Fabinho, Michele, Marcelo, James, pelos bons e “maus” momentos no laboratório.

Às “cheirosinha(o)s” Amanda Souza, Cynthia, Denise, Priscila, Rosilene, Anderson pelos bons momentos em coletas e laboratório.

Aos amigos PqCs Cláudio José Barbedo e João J.D. Parisi (Jão), pelos bons momentos de descontração e ensinamentos principalmente durante a disciplina.

Aos amigos do “Index”, Marcio, Carmen, Carol, Simone, Lamarca.

Ao amigo Maurício Pereira, pela grande ajuda no término da dissertação.

Ao amigo Gustavo pela impressão final do trabalho.

Às “meninas da bio” Alê Schunck, Luana, e Priscila, sempre presentes.

Às amigas e eternas goiabinhas, Cíntia Vieira e Luciana Fiorato.

Ao eterno orientador Prof. Drº. Marco Aurélio Sivero Mayworm, pessoa a quem tenho muito respeito e admiração. Serei eternamente grata a você.

Ao Instituto de Botânica e a Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas.

Ao CNPq, pela bolsa de mestrado concedida.

À FAPESP, pelo financiamento do projeto “Flora aromática da Mata Atlântica no Estado de São Paulo: composição química dos óleos voláteis e análise da atividade biológica”, ao qual este trabalho faz parte.

A todas as pessoas que de forma direta ou indireta ajudaram na concretização deste trabalho.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVO.....	12
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	13
3.1 Material.....	13
3.1.1. Material vegetal.....	13
3.1.2. Microrganismos.....	14
3.2. Extração de óleos voláteis.....	14
3.3. Identificação dos compostos dos óleos voláteis.....	15
3.4. Atividades Biológicas.....	15
3.4.1. Atividade antimicrobiana.....	15
3.4.1.1. Atividade antifúngica por bioautografia em placas de sílica gel.....	15
3.4.1.1.1 Preparo das amostras.....	15
3.4.1.1.2 Obtenção dos microrganismos.....	16
3.4.1.1.3. Ensaio antifúngico.....	16
3.4.1.2. Atividade antifúngica por diluição em microplaca.....	16
3.4.1.2.1 Preparo das amostras.....	16
3.4.1.2.2 Obtenção dos microrganismos.....	16
3.4.1.2.3. Ensaio antifúngico.....	17
3.4.1.3. Atividade antibacteriana por diluição em microplaca.....	17
3.4.1.3.1 Preparo das amostras.....	17
3.4.1.3.2 Obtenção dos microrganismos.....	17
3.4.1.3.3. Ensaio antibacteriano.....	18
3.4.2. Atividade anticolinesterásica.....	18
3.4.2.1. Preparo das amostras.....	18
3.4.2.2. Ensaio anticolinesterásico.....	18
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	48
6. CONCLUSÕES.....	49

7. RESUMO.....	50
8. ABSTRACT.....	52
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54
10. ANEXO	65

1. INTRODUÇÃO

Considerada, atualmente, como um dos mais ricos conjuntos de ecossistemas em diversidade biológica do planeta o domínio Mata Atlântica abrange diversas formações florestais como floresta ombrófila densa, floresta ombrófila mista, floresta ombrófila aberta, floresta estacional semidecidual, floresta estacional decidual, manguezais, restingas, campos de altitude e brejos interioranos. No Brasil, estende-se do Rio Grande do Norte ao Rio Grande do Sul (Rizzini 1997, Capobianco 2001, Schaffer & Prochnow 2002). Segundo Pivello & Peccinini (2002) a diversidade de formações florestais da Mata Atlântica decorre da grande variação latitudinal, altitudinal e geomorfológica criando assim grande quantidade de diferentes habitats com a capacidade de abrigar plantas e animais com diferentes adaptações e preferências de ambiente.

Inicialmente, a Mata Atlântica cobria cerca de 15% do território brasileiro, aproximadamente 1.300.000 Km², mas devido a exploração desordenada por várias décadas, atualmente restam menos de 7% (Capobianco 2001, Fundação SOS Mata Atlântica 2007). Em São Paulo, restam menos de 12% de cobertura florestal (INPE & Fundação SOS Mata Atlântica 2006).

Segundo Myers *et al.* (2000), a Mata Atlântica, considerada um “Hotspot”, ocupa a quarta posição no ranking prioritário de conservação, devido ao alto grau de endemismo de espécies vegetais e animais encontrados neste bioma. É considerada “Hotspot” uma área com pelo menos 1.500 espécies endêmicas de plantas e que tenha perdido mais de 3/4 de sua vegetação original (Conservação Internacional Brasil 2008). Existem no total vinte e cinco áreas consideradas prioritárias para a conservação (Myers *et al.* 2000).

O Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI) é um remanescente de Mata Atlântica em meio a uma área intensamente urbanizada. Está localizado na parte sudeste do município de São Paulo, entre os paralelos 23°38'08"S e 23°40'18"S e os meridianos 46°36'48"W e 46°38'00"W, fazendo divisa com o município de Diadema. O PEFI apresenta uma área total de 526,38 ha onde estão inseridas as seguintes instituições: Instituto de Botânica e Jardim Botânico de São Paulo; Secretaria da Agricultura e Abastecimento; Fundação Parque Zoológico; Zoosafari; Instituto Astronômico e Geofísico da USP; ex Fundação Estadual para o Bem Estar do Menor; 3º Batalhão da Polícia Militar; 97ª Delegacia de Polícia Civil; Centro de Exposições Imigrantes e Hospital Psiquiátrico da Água Funda (Fernandes *et al.* 2002).

Segundo Pivello & Peccinini (2002), a vegetação do PEFI pertence ao grupo das

florestas estacionais semidecíduais de planalto dentro do bioma Mata Atlântica. A Flora Fanerogâmica do PEFI é composta de 129 famílias, 543 gêneros e 1.159 espécies. As famílias Orchidaceae, Asteraceae, Fabaceae, Myrtaceae, Rubiaceae, Melastomataceae, Solanaceae, Poaceae, Bromeliaceae, Euphorbiaceae e Lauraceae são as possuem maior riqueza em espécies sendo Myrtaceae, Fabaceae, Lauraceae e Melastomataceae as famílias com maior representatividade em espécies arbóreas. Os gêneros *Solanum*, *Pleurothallis*, *Miconia*, *Eugenia*, *Myrcia*, *Ocotea*, *Tibouchina*, *Vriesea*, *Leandra*, *Maxillaria*, *Psychotria* e *Piper* destacam-se pelo maior número de espécies. Há também grande quantidade de espécies epífitas evidenciando assim a riqueza da flora do PEFI (Barros *et al.* 2002).

No estado de São Paulo, através de levantamentos florísticos realizados em florestas de encosta, a família Lauraceae figura entre as famílias que apresentam maior número de espécies nesse bioma (Tabarelli & Mantovani 1999). Esta família, segundo Baitello *et al.* (2003), é composta por árvores ou arbustos dióicos ou monóicos com folhas alternas, raramente opostas, sem a presença de estípulas. A inflorescência geralmente é axilar e flores em geral pequenas unissexuadas, bissexuadas ou polígamas com fruto bacáceo ou nucóide de semente única com ou sem cúpula.

A distribuição da família Lauraceae ocorre nas regiões tropicais e subtropicais do planeta sendo representada por 50 gêneros e cerca de 2500 espécies (Judd *et al.* 1999). No Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI) é representada por cerca de 8 gêneros: *Persea*, *Phoebe*, *Ocotea*, *Nectandra*, *Endlicheria*, *Beilschmiedia*, *Aniba* e *Cryptocarya*, e 25 espécies sendo o gênero *Ocotea* com o maior número de espécies (Baitello & Coe-Teixeira 1987).

O gênero *Ocotea* é caracterizado por árvores e arbustos com folhas em geral alternas, flores unissexuadas ou bissexuadas, inflorescência tirsóide-paniculada ou racemiforme, fruto do tipo baga com cúpula. *Ocotea nectandriifolia* (Figura 1 (A-B)), espécie típica da região Sul e Sudeste, conhecida popularmente como canela-burra ou canela-preta, é uma árvore dióica com folhas alternas sendo a face adaxial pouco brilhante e a face abaxial amarelo-ferrugíneo-tomentosa com presença de domáceas, flores unissexuais, inflorescência axilar do tipo panícula, fruto do tipo baga elíptica com cúpula de margem lobada aparando 1/3 de sua altura. *Ocotea puberula* (Figura 1 (C-D)), conhecida popularmente como canela-babosa, canela-gosmenta, canela-sebo, canela-guaicá, é uma árvore dióica com folhas alternas, flores unissexuais, inflorescência axilar do tipo panícula, fruto do tipo baga com cúpula. A cúpula do fruto de *Ocotea puberula* em material vivo é vermelha (Baitello & Coe-Teixeira 1987, Baitello *et al.* 2003).

A família Lauraceae é conhecida por apresentar grande importância econômica, seja

pelo uso da madeira, ou na culinária, na medicina popular, entre outros. Na indústria madeireira, o gênero *Ocotea* apresenta grande número de espécies utilizadas para os mais diversos fins. A madeira de *O. diospyrifolia* é considerada boa para postes e tábuas de assoalho. *O. puberula* é utilizada em caixotaria. A madeira de *O. aciphylla* é aromática e resistente a insetos, principalmente aos cupins, sendo própria para a construção civil e taboados de assoalho. *O. organensis* é usada em obras internas e carpintaria. *O. acutifolia*, *O. spectabilis*, *O. divaricata*, *O. elegans* e *O. porosa* são empregadas em marcenaria e construções em geral. Além das do gênero *Ocotea*, as madeiras de outras espécies dos demais gêneros da família são utilizadas na marcenaria e construção como, *Aniba terminalis*, *A. firmula*, *A. parviflora*, *Nectandra megapotamica*, *N. amazonum*, *N. angustifolia*, *Beilshmiadia rigida*, *B. emarginata* (Marques 2001, Wanderley *et al.* 2003).

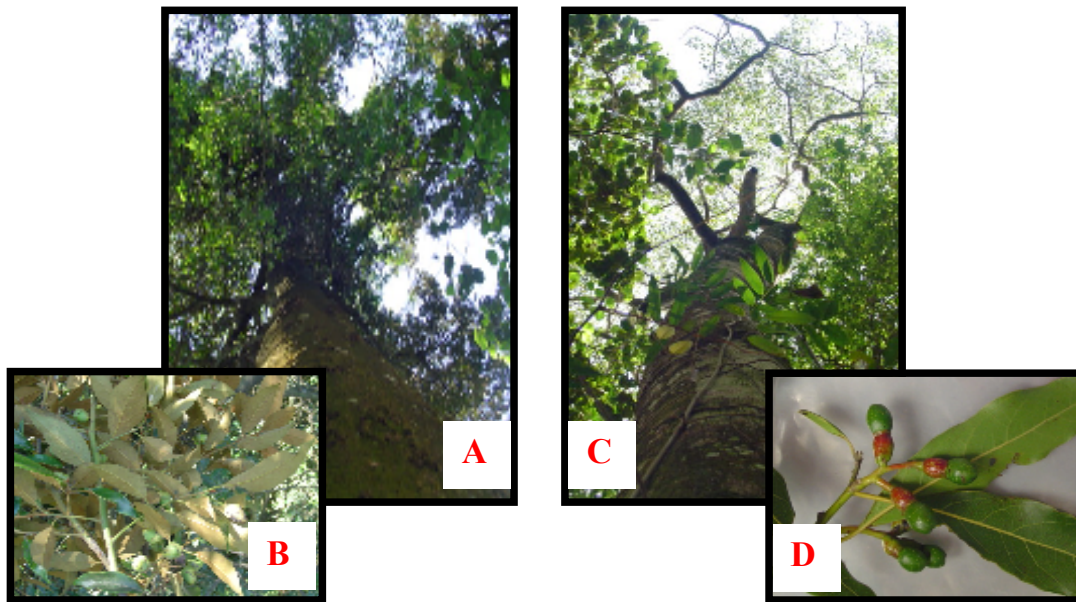


Figura 1. Espécies de Lauraceae presentes no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI). (A) *Ocotea nectandrifolia*; (B) frutos de *Ocotea nectandrifolia*; (C) *Ocotea puberula*; (D) frutos de *Ocotea puberula*.

As folhas de *Laurus nobilis*, conhecida popularmente como louro, a canela em pó e a canela em pau, extraídas das cascas do caule de *Cinnamomum zeylanicum* e *C. cassia* são amplamente utilizadas como condimentos. Os frutos de *Persea americana* e *P. gratissima*, conhecidos como abacate, são mundialmente consumidos para fins alimentícios (Marques 2001).

Diversas espécies da família Lauraceae são empregadas na medicina popular (Tabela 1). O uso de plantas aromáticas é bastante difundido, em especial no tratamento de infecções microbianas, inflamações, dores, eczemas e na regulação da fertilidade (Onayade-Sontan 1991). Entre as propriedades farmacológicas encontradas em óleos voláteis estão a atividade antifúngica (Di Stasi 1996, Rasooli & Abyaneh 2004), repelente (Lwande *et al.* 1999; Cheng *et al.* 2004), antiinflamatória (Juergens *et al.* 1998), anticolinesterásica (Miyazawa *et al.* 1998), e analgésica (Silva *et al.* 2003). Ladeira (2002) cita o uso de chás de plantas ricas em óleo volátil para o tratamento de diversas enfermidades.

São inúmeras as atividades biológicas de óleos voláteis, segundo Baratta *et al.* (1998), o óleo de *Laurus nobilis* apresentou atividade antimicrobiana frente aos microrganismos *Acinetobacter calcoaceticus*, *Beneckea natriegens*, *Citrobacter freundii*, *Erwinia carotovora*, *Lactobacillus plantarum*, *Micrococcus luteus*, *Salmonella pullorum*, *Serratia marcescens* e *Staphylococcus aureus* e o óleo volátil de *Origanum vulgare* apresentou forte atividade antimicrobiana em 19 dos 25 microrganismos testados. O hidrolato e o óleo volátil de *Aniba duckei* apresentaram atividade larvicida frente a *Artemia franciscana* e *Aedes aegypti* (Souza *et al.* 2007).

Macchioni *et al.* (2006) testaram a atividade acaricida dos óleos voláteis de *Laurus nobilis* e *L. novocanariensis* e observaram que o óleo volátil de *L. novocanariensis*, rico em sesquiterpenos, apresentou uma forte atividade acaricida. Simié *et al.* (2004) testaram a atividade antifúngica dos óleos voláteis de *Aniba rosaeodora*, *Laurus nobilis*, *Sassafras albidum* e *Cinnamomun zeylanicum* e observaram que o óleo de *Cinnamomun zeylanicum* foi o mais ativo frente aos 17 fungos testados. Ainda, monoterpenos e sesquiterpenos são responsáveis por diversas atividades biológicas como, anestésica, antibiótica, anti-helmíntica, antiinflamatória, sedativa, espasmolítica, entre outras (Craveiro & Machado 1986).

Tabela 1. Utilização de espécies de Lauraceae na medicina popular. Adaptado de Pio Correa 1984, Berg 1993, Marques 2001.

Gênero	Espécie	Emprego na medicina popular
<i>Cryptocarya</i>	<i>moschata</i>	Dores no estômago e cólica
<i>Ocotea</i>	<i>odorifera</i>	Sudorífera, anti-reumática, anti-sifilítica e diurética
<i>Ocotea</i>	<i>cajumari</i>	Inapetência e males intestinais
<i>Ocotea</i>	<i>aciphylla</i>	Tônico e estomáquico
<i>Ocotea</i>	<i>pulchella</i>	Estomáquico, emenagogo e tônicos do útero
<i>Ocotea</i>	<i>pretiosa</i>	Reumatismo
<i>Laurus</i>	<i>nobilis</i>	Sudorífico e contra flatulências
<i>Persea</i>	<i>americana</i>	Diurético
<i>Cinnamomum</i>	<i>zeylanicum</i>	Resfriados e problemas estomacais
<i>Cinnamomum</i>	<i>cassia</i>	Resfriados
<i>Aniba</i>	<i>canelilla</i>	Problemas estomacais
<i>Nectandra</i>	<i>grandiflora</i>	Anti-reumática, digestiva e diurética

Óleos voláteis de espécies de Lauraceae têm grande importância na indústria farmacêutica e de perfumes, sendo o obtido a partir de *Aniba rosaeodora*, que tem como constituinte majoritário o álcool terpênico linalol, com mistura dos isômeros D e L-linalol que varia de acordo com a região de coleta, amplamente utilizado em fragrâncias de perfumes. Da mesma forma a cânfora, extraída de *Cinnamomum camphora*, e o safrol, extraído de *Ocotea pretiosa* e *Sassafras albidum*, são amplamente utilizados na indústria de cosméticos (Guenther 1960b, Rizzini & Mors 1995, Bruneton 2001, Zellner *et al.* 2006).

De acordo com a International Standart Organization (ISO), óleos voláteis são produtos obtidos de matéria prima vegetal através da destilação por arraste de vapor, bem como expressão dos pericarpos de frutos cítricos. São misturas complexas de substâncias

voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas. Apresentam sabor geralmente acre e picante, colorações ligeiramente amareladas ou incolores, são instáveis na presença de luz, calor e umidade (Simões & Spitzer 2003).

A composição química dos óleos voláteis podem ser formada através de origens biossintéticas distintas (Figura 2), ou seja, a partir de derivados de fenilpropanóides via ácido chiquímico e de terpenóides via acetilcoenzimaA (Bruneton 2001, Simões & Spitzer 2003).

Os fenilpropanóides são formados via ácido chiquímico que por sua vez é formado a partir da condensação do fosfoenolpiruvato e da eritrose-4-fosfato. O ácido chiquímico é responsável pela formação das duas unidades básicas dos fenilpropanóides, o ácido cinâmico e o ácido p-cumárico que por meio de redução, oxidação e ciclização formam os alilbenzenos, aldeídos aromáticos, propenilbenzenos e cumarinas (Simões & Spitzer 2003).

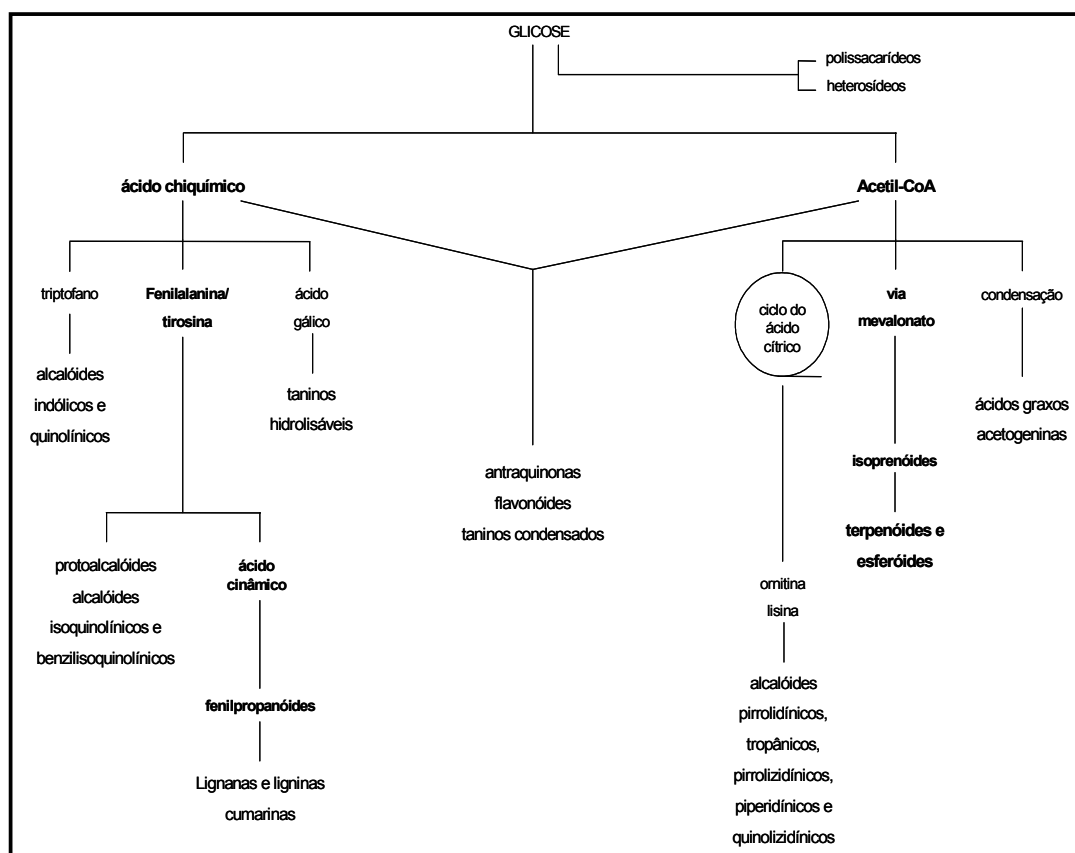


Figura 2. Ciclo biossintético dos metabólitos especiais. Destaque: vias de formação dos terpenos (Simões & Spitzer 2003, adaptado).

Os terpenos têm sua origem biossintética a partir de unidades de isopreno. A unidade de isopreno ativa, difosfato de isopentenila (IPP) pode ser formada a partir de duas vias: (1) via piruvato-gliceraldeído-3-fosfato (GAP) que ocorre preferencialmente nos plastídios dando

origem aos monoterpenos, diterpenos e tetraterpenos; e (2) via acetilcoenzimaA, que ocorre preferencialmente no citoplasma dando origem aos triterpenos e sesquiterpenos (Adam & Zapp 1998, Croteau *et al* 2000).

A classificação dos terpenos se baseia no número de unidades isoprênicas: monoterpenos (C₁₀, 2 unidades), sesquiterpenos (C₁₅, 3 unidades), diterpenos (C₂₀, 4 unidades), sesterpenos (C₂₅, 5 unidades), triterpenos (C₃₀, 6 unidades) e tetraterpenos (C₄₀, 8 unidades) sendo os monoterpenos e sesquiterpenos os terpenos mais frequentes em óleos voláteis (Simões & Spitzer 2003).

Os monoterpenos (Figura 3) podem ser classificados de acordo com a ciclização: acíclicos (mirceno, linalol, geraniol), monocíclicos (alfa-terpineol, terpinoleno), e bicíclicos (alfa-pineno, tujona, cânfora, fenchona), ou através do grupo funcional: hidrocarbonetos insaturados (limoneno), álcoois (mentol), aldeídos ou cetonas (mentona, carvona), lactonas (nepetalactona) e tropolonas (gama-tujaplicina). Os sesquiterpenos (figura 3) são classificados de acordo com a ciclização sendo: acíclicos (farnesol, nerolidol), monocíclicos (ácido abscísico, gama bisaboleno) e bicíclicos (beta-selineno, beta-cariofileno) (Bruneton 2001, Simões & Spitzer 2003).

A presença de óleos voláteis em Gimnospermas e Angiospermas monocotiledôneas é rara, já em Angiospermas dicotiledôneas há uma abundância de famílias ricas em óleos voláteis destacando-se Lauraceae, Piperaceae, Rutaceae, Asteraceae, Rosaceae, Pinaceae, Apiaceae, Myristicaceae, Lamiaceae e Myrtaceae. Os óleos voláteis podem ocorrer em estruturas especializadas, como células parenquimáticas diferenciadas (Lauraceae, Myrtaceae, Piperaceae, Poaceae), em tricomas glandulares (Lamiaceae) ou canais oleíferos (Apiaceae e Asteraceae). Eles podem também estar estocados em certos órgãos, como flores (laranjeira), folhas (louro, melissa, eucalipto), cascas do caule (canelas), madeira (pau-rosa), rizomas (gengibre), frutos (anis-estrelado) ou sementes (noz-noscada) (Metcalf & Chalk 1950, Bruneton 2001, Simões & Spitzer 2003, Farago *et al.* 2005, Coutinho *et al.* 2006).

As metodologias empregadas para a extração de óleos voláteis dependem da localização do óleo na planta, bem como a qualidade do óleo que se deseja obter. Dentre os métodos de extração a enfloração (enfleurage) é utilizada para a obtenção de óleo de pétalas de flores que contém baixo teor de óleo e alto valor comercial. Essa técnica consiste em depositar as pétalas de flores em gordura, até o esgotamento das mesmas as quais são trocadas até a saturação da gordura. Após a saturação, a gordura é tratada com álcool o qual é destilado a baixa temperatura obtendo assim um produto puro, livre de resíduos químicos, com alto valor comercial (Guenther 1960a, Oliveira & Jose 2007).

Além da enfloração, destaca-se também a extração com solventes orgânicos, porém,

nesse método de extração são extraídos também outros compostos lipofílicos, pois a extração é feita com solventes apolares utilizando aparelhos do tipo Soxhlet, sendo os produtos obtidos de baixo valor comercial devido a imprecisão da técnica utilizada.

A prensagem ou expressão é outra técnica empregada para a extração de óleos voláteis de pericarpos de frutos cítricos no qual jatos de água exercem uma ação abrasiva no pericarpo rompendo as células secretoras, após centrifugação o óleo se separa da fase aquosa (Simões & Spitzer 2003).

Industrialmente o fluido supercrítico é um método muito eficiente de extração de óleos voláteis, devido à qualidade do óleo obtido, livre de solvente, porém apresenta um custo elevado. Esta é utilizada em uma câmara fechada, onde o CO₂ é submetido a um aumento de pressão e temperatura acima do seu ponto crítico, por isso é chamado de supercrítico, desta forma, ele atinge um estado intermediário entre o líquido e o gasoso podendo agir como solvente. Ao final da extração, a temperatura e pressão voltam ao estado crítico transformando o CO₂ em gás novamente e obtendo o óleo volátil puro (Maul *et al.* 1996, Carrilho *et al.* 2001).

As técnicas de extração de óleos voláteis por arraste a vapor e hidrodestilação possuem o mesmo princípio, arrastar o óleo volátil através de vapor, sendo que a diferença está na maneira em que o material vegetal é preparado. No arraste a vapor, o material vegetal não fica em contato com a água, em estado líquido, e geralmente é utilizado em escala industrial. Na hidrodestilação, o material vegetal fica em contato com a água, em estado líquido, e os óleos voláteis por possuírem tensão de vapor mais elevada que a da água são arrastados. Essa técnica é a mais empregada em laboratório utilizando-se o aparelho do tipo Clevenger (Santos *et al.* 2004, Pino *et al.* 2006, Kelen & Tepe 2008).

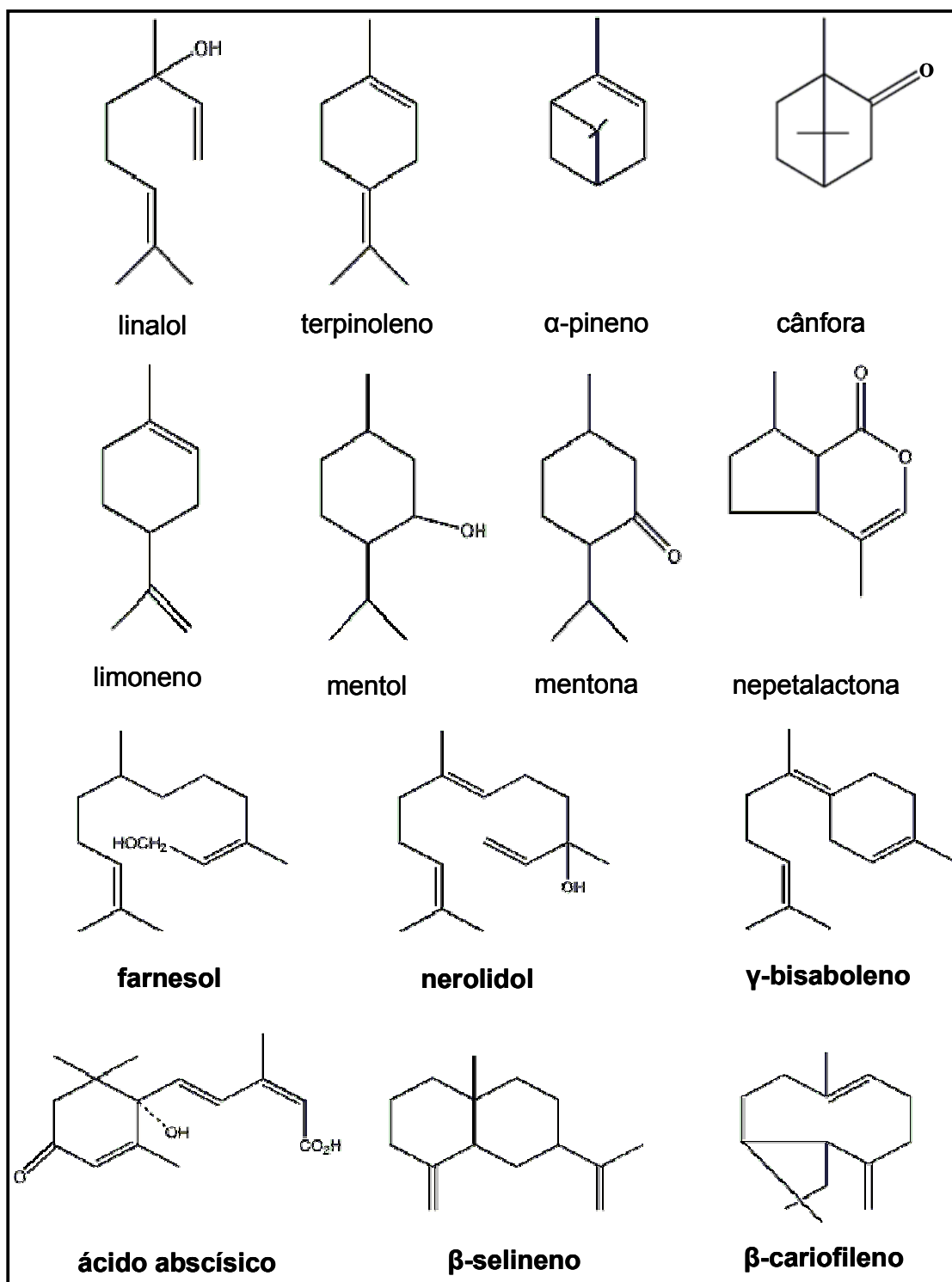


Figura 3. Exemplos de monoterpenos e **sesquiterpenos** (Simões & Spitzer 2003, adaptado).

Com o avanço no estudo de química ecológica, hoje se acredita que os metabólitos especiais (secundários) desempenham funções biológicas importantes para a sobrevivência e adaptação da planta ao meio ambiente. Eles são mensageiros da informação por possuírem

polaridade, pequena massa molecular, meia vida curta, reatividade química, ocorrência esporádica e grande potencial antioxidante (Gottlieb *et al.* 1996). A riqueza destes metabólitos pode ser explicada, em parte, pelo simples fato das plantas não se locomoverem necessitando assim de defesas químicas contra ações do meio ambiente e de animais (Gottlieb 1990, Harborne 1993, Carvalho *et al.* 2006). Os óleos voláteis presentes nas plantas desempenham funções fisiológicas e ecológicas específicas. Componentes voláteis das flores como nerol, geraniol, linalol, isoeugenol, 1,8-cineol, são os principais responsáveis pela atração e orientação de polinizadores (Harborne 2001, Gershenzon & Dudareva 2007); compostos como 1,8 cineol, cânfora, isotujona e α -tujona agem como inibidores de germinação. Os compostos presentes nos óleos voláteis podem agir também na proteção contra predadores, como o β -ocimeno, epóxido de cariofileno e espatulenol que são repelentes de formiga cortadeira de folhas por impedirem o crescimento dos fungos utilizados na sua alimentação, o mentol e a mentona são inibidores do crescimento de larvas, e certos himenópteros que seqüestram α e β -pineno de *Pinus sylvestris* para protegerem as suas larvas do ataque de formigas (Kelsey *et al.* 1984, Harborne 1993).

A composição dos óleos voláteis em plantas, apesar de determinada geneticamente, pode sofrer alterações em decorrência do ambiente em que vivem sendo essas alterações chamadas de fatores de variabilidade. A existência de quimiotipos, ou raças químicas, são muito frequentes em plantas com óleos voláteis. O tomilho (*Thymus vulgaris*) na Europa, por exemplo, apresenta sete quimiotipos diferentes, sendo encontrados seis quimiotipos na França que apresentam como constituintes majoritários timol, carvacrol, geraniol, linalol, α -terpineol, trans-4-tuyanol e cis-8-mircenol e um na Espanha, rico em cineol (Bruneton 2001, Thompson *et al.* 2003, Kaloustian *et al.* 2005).

Andrade *et al.* (2008) relatam a presença de sete quimiotipos diferentes em *Piper marginatum* da floresta amazônica. *Lippia alba* coletada no Pará apresentou três quimiotipos diferentes, o quimiotipo I rico em 1,8 cineol, limoneno, carvona e sabineno, enquanto que o quimiotipo II é rico em limoneno, carvona e mirceno e o quimiotipo III, rico em germacreno-D, geraniol, neral e β -cariofileno (Zoghbi *et al.* 1998).

A fase fisiológica de uma planta também pode alterar a composição química de óleos voláteis como em coentro (*Coriandrum sativum*), onde o teor de linalol é 50% maior nos frutos maduros em relação aos frutos verdes (Bruneton 2001). Em guaçatonga (*Casearia sylvestris*), recomenda-se a coleta das folhas no período que antecede a floração, por apresentar maior teor de óleo volátil (Castellani *et al.* 2006). Mirjana *et al.* (2004) verificaram que *Satureja cuneifolia* apresenta alterações na proporção dos componentes do óleo,

carvacrol, limoneno e α -pineno nas diferentes fases de desenvolvimento. Em *Balsamita major*, o conteúdo total de óleos atinge valores máximos no período que antecede o pico de floração, sem que variações significativas na proporção dos componentes do óleo tenham sido encontradas (Bylaitè *et al.* 2000).

Além da presença de quimiotipos e da interferência do ciclo vegetativo, fatores ambientais tais como, temperatura, irradiância, fotoperíodo, regime de ventos e micronutrientes presentes no solo, também são capazes de influenciar a composição química de óleos voláteis presentes nas plantas (Bruneton 2001). Silva *et al.* (1999) observaram um aumento no teor de eugenol em folhas de *Ocimum gratissimum* no período entre 11h e 14h, sugerindo a influência da luz solar na produção de eugenol desta espécie. Em *Mentha piperita*, os compostos majoritários pulegona, mentona, mentofurano e mentol, variam de acordo com o comprimento do dia e a temperatura. Dias longos com altas temperaturas (dia/noite) favorecem a produção de mentofurona enquanto que em dias longos e noites frias, o composto majoritário é o mentol (Burbott & Loomis 1967). Castellani *et al.* (2006) observaram uma acentuada queda nos teores de óleo volátil de folhas de *Ocotea odorifera* coletadas no outono em relação às demais estações e sugerem que essa queda pode estar associada à radiação luminosa e a pluviosidade, já que nesse período os índices foram menores.

Os principais constituintes voláteis de *Aniba canelilla*, 1-nitro-2-feniletano e metileugenol, também apresentaram variações de acordo com a sazonalidade. Em períodos de cheia na região amazônica o 1-nitro-2-feniletano é o principal constituinte presente nas cascas de caule e o metileugenol encontra-se em baixas proporções, mas em período de seca há um decréscimo de 1-nitro-2-feniletano e um aumento acentuado de metileugenol (Taveira *et al.* 2003).

Diante do exposto acima, o presente trabalho visa ampliar o conhecimento a respeito da composição dos óleos voláteis de espécies de Lauraceae durante as diferentes estações do ano bem como, avaliar de forma preliminar as atividades antibacteriana, antifúngica e anticolinesterásica dos mesmos. Estes estudos poderão, ainda, contribuir para o conhecimento do potencial econômico da Mata Atlântica, visando à utilização sustentável de seus recursos.

2. OBJETIVO

O presente trabalho teve como objetivo analisar a composição química dos óleos voláteis de folhas de duas espécies de Lauraceae, *Ocotea nectandrifolia* e *Ocotea puberula*, com ocorrência no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, durante as diferentes épocas do ano, e avaliar as atividades biológicas dos óleos obtidos através de ensaios antibacteriano, antifúngico e anticolinesterásico.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Material vegetal

Amostras de folhas de três indivíduos de *Ocotea nectandrifolia* localizados a 23°38'24,4''S e 46°37'15,2''W, 23°38'23,4''S e 46°37'20,4''W e 23°38'23,4''S e 46°37'20,7''W com DAP de 42cm, 47cm e 49cm, respectivamente, e *Ocotea puberula* localizados a 23°38'21,8''S e 46°37'21,9''W, 23°38'21,8''S e 46°37'22,3''W e 23°38'21,4''S e 46°37'23''W com DAP (diâmetro acima do peito) de 46cm, 37cm e 35cm, respectivamente, foram coletadas no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (Figura 4.). Exsicatas foram depositadas no Herbário Científico do Estado “Maria Eneyda P. K. Fidalgo” (SP) do Instituto de Botânica sob o número SP 405219 para *Ocotea nectandrifolia* e SP 405218 para *O. puberula*. Para a coleta do material foi necessário o auxílio de um cesto aéreo (Fluxograma 1-a), pois as alturas das árvores eram acima de 13m.

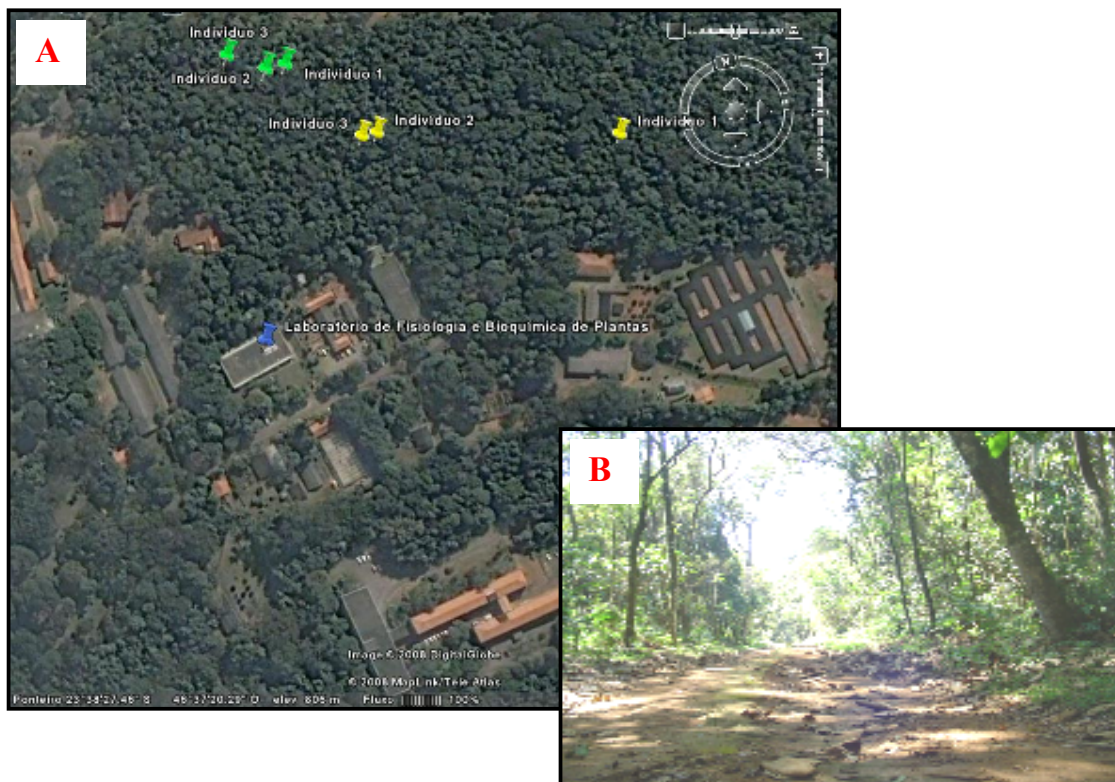


Figura 4. Parque Estadual das Fontes do Ipiranga. (A) Mapa de localização do local de coleta. Marcações em amarelo indicam a localização dos indivíduos de *Ocotea nectandrifolia*, em verde indicam a localização dos indivíduos de *Ocotea puberula*. (B) Vista local da trilha de coleta

As coletas foram realizadas no início e meio de cada estação do ano, no período de maio de 2006 a março de 2007 (Tabela 2). Após a coleta, o material foi seco a sombra em casa de vegetação (Fluxograma 1-b) por trinta dias. Após esse período, o material foi submetido à extração.

Tabela 2. Data da coleta do material vegetal utilizado nas extrações de óleo volátil no período de maio de 2006 a março de 2007.

Estação		Data da Coleta
Outono	Início	26/03/2007
	Meio	08/05/2006
Inverno	Início	04/07/2006
	Meio	07/08/2006
Primavera	Início	27/09/2006
	Meio	06/11/2006
Verão	Início	29/12/2006
	Meio	07/02/2007

3.1.2 Microrganismos

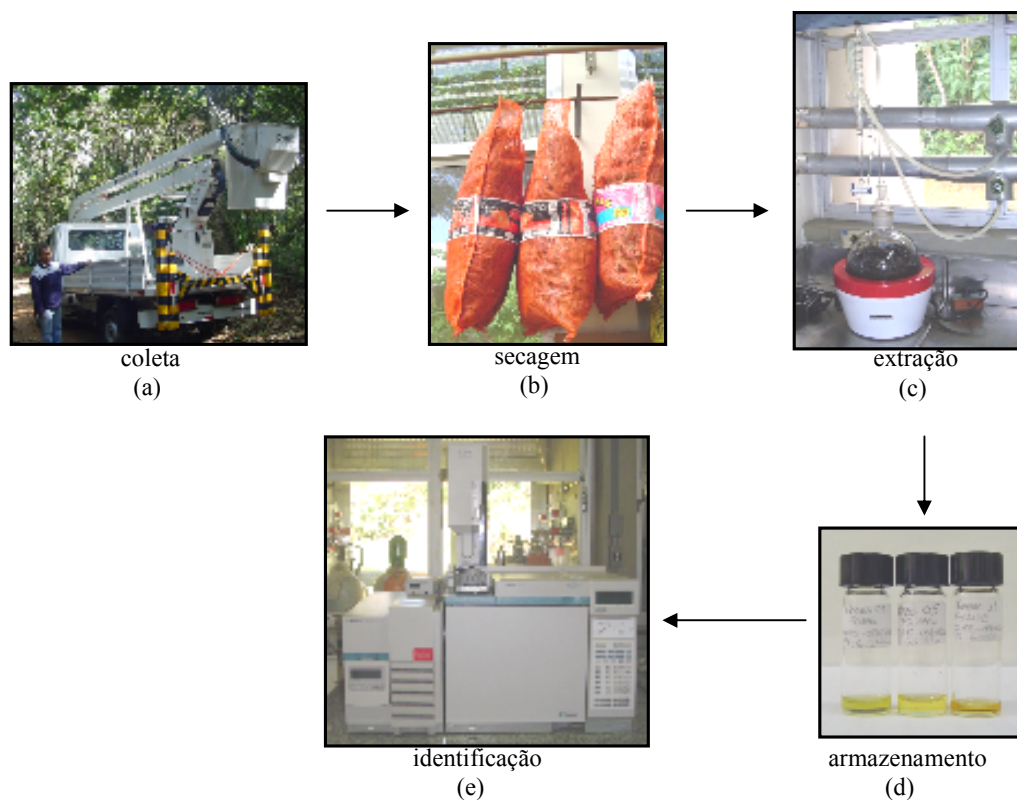
Neste trabalho foram utilizados fungos *Cladosporium sphaerospermum* (SPC – Micoteca do Instituto de Botânica 491) e *C. cladosporioides* (SPC 140) para os ensaios por bioautografia, *Candida albicans* (ATCC, American Type Culture Collection 10231) e *Aspergillus niger* (ATCC 16404) para os ensaios em microplaca assim como, as bactérias Gram-negativas *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) e Gram-positiva, *Staphylococcus aureus* (ATCC 8538).

3.2. Extração de óleos voláteis

O material seco e fracionado de cada coleta foi submetido à extração do óleo volátil por hidrodestilação em processo contínuo com aparelho do tipo Clevenger, por 4 horas (Fluxograma 1-c). O óleo foi separado com pentano e o restante da água foi removido com sulfato de sódio anidro. O pentano foi eliminado com o auxílio de um evaporador rotatório. O óleo foi armazenado em frasco com tampa (Fluxograma 1-d), em freezer a -22°C. O rendimento de cada óleo foi calculado a partir da massa seca.

3.3. Identificação dos compostos dos óleos voláteis

Os óleos voláteis extraídos foram diluídos em acetona 1:10(v/v) e 1 μ L de cada amostra diluída foi analisada por cromatografia a gás, em aparelho Agilent (série 6890) Hewlett-Packard (Fluxograma 1-e), acoplado a espectrômetro de massas, com sistema quadrupolo (Agilent 5973 Network Mass Selective Detector), com energia de ionização de 70eV. A coluna capilar utilizada foi HP 5-MS (30m x 0,25mm de diâmetro interno, com 0,25 μ m de espessura), nas seguintes condições: injetor (com divisão de fluxo-split/splitless) a 250°C (razão de divisão 1: 20), temperatura de aquecimento da coluna de 40 a 240°C a 3°C min⁻¹, 240°C por 10 min (tempo total de análise 78 min) utilizando hélio como gás de arraste a uma pressão de 80 Kpa e velocidade linear de 1 mL min⁻¹. Nitrogênio, ar sintético e hidrogênio foram utilizados como gases auxiliares, na razão de 1:1:10, respectivamente. O índice de retenção (IR) foi calculado em coluna HP 5-MS, utilizando uma série homóloga de n-alcanos (C₅ a C₃₀) submetidas às mesmas condições de análise cromatográfica (Anexo). A identificação dos compostos foi feita por comparação entre seus espectros de massas com aqueles registrados na base de dados da biblioteca Willey 275 e Adams (2007).



Fluxograma 1. Etapas utilizadas na extração e identificação de óleos voláteis.

3.4. Atividades Biológicas

3.4.1 Atividade antimicrobiana

Os ensaios de atividade antifúngica por bioautografia em placas de sílica gel foram realizados no Instituto de Botânica de São Paulo – Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas.

Os ensaios de atividade antibacteriana e antifúngica por diluição em microplaca foram realizados no laboratório de Controle Microbiológico da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

3.4.1.1 Atividade antifúngica por bioautografia em placas de sílica gel

3.4.1.1.1 Preparo das amostras

Amostras dos óleos (5 µL) foram pesadas em balança analítica (Ohaus) e diluídas em acetona para se obter 200 µg em 5 µL.

3.4.1.1.2 Obtenção dos microrganismos

Cepas dos fungos *Cladosporium sphaerospermum* e *C. cladosporioides* obtidos da micoteca do Instituto de Botânica da São Paulo foram incubados em meio de cultura BDA (Batata, Dextrose, Agar – Difco) a 22°C por 14 dias. Após esse período foi feita a extração dos esporos com solução de sais e glicose (6:1). A suspensão foi filtrada e armazenada a -18°C para posterior nebulização nas cromatofolhas.

3.4.1.1.3 Ensaio antifúngico

Amostras dos óleos (200µg) e o controle positivo Nistatina (1 µg), foram aplicados em cromatofolhas de alumínio de sílica gel GF254 Merck®. As placas foram nebulizadas com a suspensão contendo esporos dos fungos ($> 2 \times 10^6$ esporos.mL⁻¹) e solução de glicose e sais (6:1) e incubadas em câmara úmida a 27°C, no escuro, por 48 horas (Homans & Fuchs 1970, Rahalison *et al.* 1994). Após incubação, as zonas de inibição de crescimento dos fungos correspondem às áreas claras apresentadas nas placas.

3.4.1.2 Atividade antifúngica por diluição em microplaca

3.4.1.2.1 Preparo das amostras

Amostras de óleos voláteis (50 μL) foram diluídas em 150 μL de DMSO(Dimetilsufóxido)/Metanol (1:1) de modo que a proporção final no ensaio fosse de 3,125 μL de óleo mL^{-1} .

3.4.1.2.2 Obtenção dos microrganismos

Para cada ensaio, os microrganismos, *Candida albicans* (ATCC 10231) e *Aspergillus niger* (ATCC 16404), foram incubados em tubos inclinados contendo o meio Sabouraud Dextrose Ágar (SDA, Difco) a 25°C por 24 h. Ao final deste período, os microrganismos foram ressuspensos com solução salina (0,85 %) e submetidos a padronização através de diluição seriada, onde as diluições 10^4 , 10^5 e 10^6 foram plaqueadas em duplicata, utilizando meio SDA, em seguida incubadas em estufa bacteriológica por 48h na temperatura de 25°C (Tortora *et al.* 2000).

As soluções microbianas padronizadas posteriormente foram diluídas com solução salina e inoculadas no meio de cultura líquido SDB (Sabouraud Dextrose Broth), de modo que a concentração final de microrganismos em cada cavidade da microplaca apresentasse um número de 200 a 400 UFC (Unidades Formadoras de Colônia) em 200 μL .

3.4.1.2.3 Ensaio antifúngico

A distribuição das substâncias nas microplacas, com 96 cavidades, obedeceu a um padrão pré-estabelecido com a presença de controle do meio (200 μL de meio SDB sem microrganismos), controle de crescimento (200 μL de meio SDB com microrganismos), controle negativo (190 μL de meio SDB inoculado com microrganismos acrescido de 10 μL de DMSO: MeOH – 1:1) e controle positivo (190 μL de meio SDB inoculado com microrganismos acrescentando 10 μL do antibiótico), em quatro repetições. O antibiótico utilizado foi a Nistatina na concentração de 1mg mL^{-1} . Amostras dos óleos voláteis (10 μL) já diluídas em DMSO:MeOH (1:1) foram adicionadas nas cavidades contendo 190 μL de meio SDB com microrganismos, em duplicata. Para se obter um controle do número de colônias por cavidade, 200 μL do meio inoculado foram plaqueados em duplicata. As placas e microplacas foram incubadas em estufa bacteriológica por 48h na temperatura de 25°C. Após o período de incubação, foram feitas a contagem do número de colônias nas placas e a leitura

das microplacas em leitor (SLT Spectra) em $\lambda = 630\text{nm}$ (Salie *et al.* 1996, Willinger *et al.* 2000, Devienne & Raddi 2002).

3.4.1.3 Atividade antibacteriana por diluição em microplaca

3.4.1.3.1 Preparo das amostras

Amostras de óleos voláteis (50 μL) foram diluídas em 150 μL de DMSO/Metanol (1:1) de modo que a proporção final no ensaio fosse de 3,125 μL de óleo mL^{-1} .

3.4.1.3.2 Obtenção dos microrganismos

Para cada ensaio, os microrganismos, *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 8538), foram incubados em tubos inclinados contendo o meio Tryptose Soya Agar (TSA, Difco) a 37°C por 24 h. Ao final deste período, os microrganismos foram ressuspensos com solução salina (0,85 %) e submetidos a padronização através de diluição seriada, onde as diluições 10^4 , 10^5 e 10^6 foram plaqueadas em duplicata, utilizando meio TSA, em seguida incubadas em estufa bacteriológica por 24h na temperatura de 35°C (Tortora *et al.* 2000).

As soluções microbianas padronizadas posteriormente foram diluídas com solução salina e inoculadas no meio de cultura líquido TSB (Tryptose Soya broth), de modo que a concentração final dos microrganismos em cada poço da microplaca apresentasse um número de 200 a 400 UFC em 200 μL .

3.4.1.3.3 Ensaio antibacteriano

A distribuição das substâncias nas microplacas, com 96 cavidades, obedeceu a um padrão pré-estabelecido, com a presença de controle do meio (200 μL de meio TSB sem microrganismos), controle de crescimento (200 μL de meio TSB com microrganismos), controle negativo (190 μL de meio TSB inoculado com microrganismos acrescido de 10 μL de DMSO: MeOH – 1:1) e controle positivo (190 μL de meio TSB inoculado com microrganismos acrescentando 10 μL do antibiótico), em quatro repetições. Os antibióticos utilizados neste ensaio foram Cloramfenicol (1mg mL^{-1}) para *S. aureus* e *E. coli* e Amicacina (1mg mL^{-1}) para *P. aeruginosa*. Amostras dos óleos voláteis (10 μL) já diluídas em DMSO:MeOH (1:1) foram adicionadas nas cavidades contendo 190 μL de meio TSB com microrganismos, em duplicata. Para se obter um controle do número de colônias por cavidade, 200 μL do meio inoculado foram plaqueados em duplicata. As placas e microplacas foram incubadas em estufa bacteriológica por 24h na temperatura de 35°C . Após o período de

incubação, foram feitas a contagem do número de colônias nas placas e a leitura das microplacas em leitor (SLT Spectra) em $\lambda = 630\text{nm}$ (Salie *et al.* 1996, Willinger *et al.* 2000, Devienne & Raddi 2002).

3.4.2 Atividade anticolinesterásica

Os ensaios de atividade anticolinesterásica foram realizados no Instituto de Botânica de São Paulo – Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas.

3.4.2.1 Preparo das amostras

Amostras dos óleos (5 μL) foram pesadas em balança analítica (Ohaus) e diluídas em metanol para se obter 200 μg em 5 μL .

3.4.2.2 Ensaio anticolinesterásico

Para a realização do ensaio foram preparadas previamente as seguintes soluções: Solução A : Tris/HCL 50 mM, pH=8; Solução B: Tris/HCL 50mM, pH=8, com 0,1% de albumina bovina fração V; e Solução C: Tris/HCL 50mM, pH=8, com 0,1 M de NaCL e 0,02 M de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Para cada cavidade da placa foram adicionados 25 μL de iodeto de acetiltiocolina 15 mM, 125 μL de 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzólico] 3 mM na solução (C), 50 μL da solução (B) e 25 μL da amostra do óleo diluída 10 vezes na solução (A). Após esse preparo, foi medida a absorbância a 405 nm em leitor KC4-Biotek a cada 30 segundos por três vezes. Em seguida, foram adicionados 25 μL da enzima acetilcolinesterase (0,22 U mL^{-1}) e a absorbância medida novamente a cada 10 minutos por 2 vezes (Ellman *et al.* 1961, Rhee *et al.* 2001).

A porcentagem de inibição da acetilcolinesterase foi calculada através da comparação das velocidades de reação (hidrólise do substrato) das amostras em relação ao branco (10% de MeOH na solução A, atividade total AChE=100%).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Figura 5 são mostrados os valores de precipitação total, temperaturas médias máxima e mínima, e irradiância nos períodos de abril/2006 a abril/2007, registrados pela estação meteorológica do Departamento de Ciências Atmosféricas do Instituto de Astronomia, Geofísica e Ciências Atmosféricas (IAG) da Universidade de São Paulo, localizado no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI). De acordo com registros nos períodos de 1976 a 2000, as temperaturas médias mensais do PEFI variam entre 15,7°C e 22,4°C e a precipitação média anual é de 1540mm (Santos & Funari 2002), não diferenciando dos dados obtidos dentro do período de estudo.

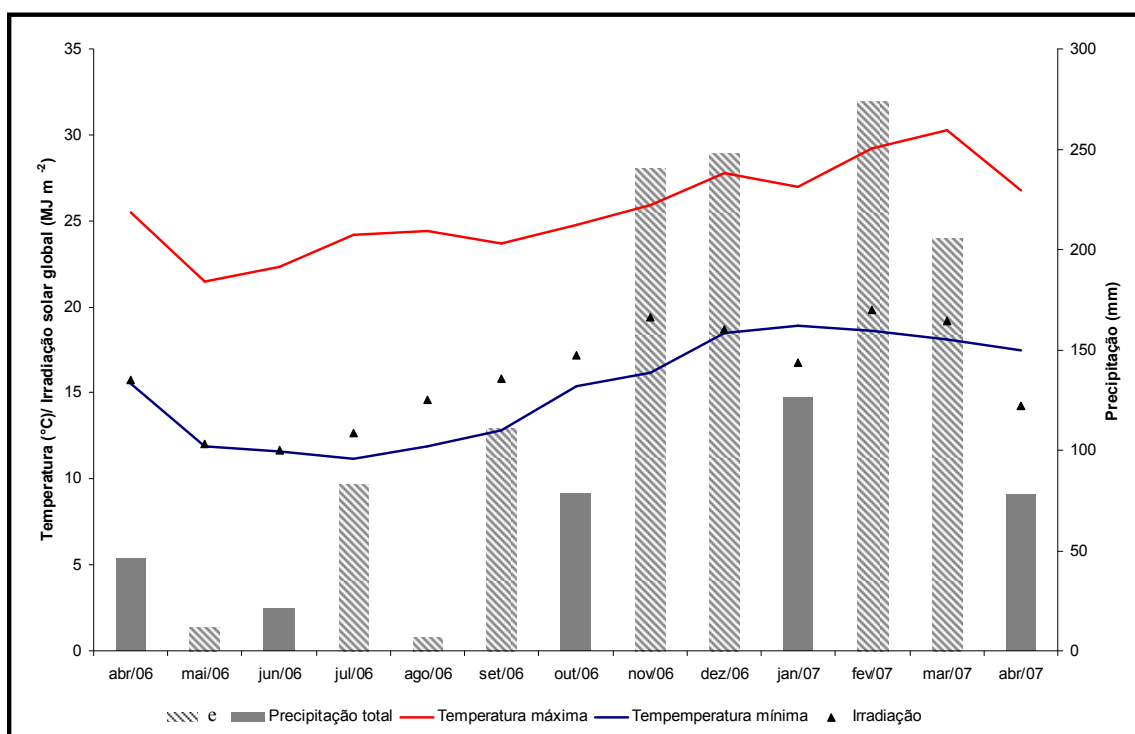


Figura 5. Médias mensais de precipitação total, temperaturas máxima e mínima e irradiância, no período de abril 2006 a abril 2007, registradas pela Estação Meteorológica do IAG-USP localizada no PEFI. Barras claras, (precipitação total) indicam os meses de coleta.

Os valores absolutos dos rendimentos dos óleos voláteis de folhas dos três indivíduos de *Ocotea nectandrifolia* e *Ocotea puberula* são mostrados na Tabela 3. O rendimento foi calculado com base na massa seca. Não houve diferença significativa quando aplicado à análise de variância, o teste Tukey a 5% de probabilidade, exceto entre as coletas de outono para os três indivíduos de *Ocotea nectandrifolia*. Porém, quando a mesma análise é feita através das médias dos indivíduos de cada espécie, por coleta, não há diferença quanto ao rendimento, nas diferentes estações do ano (Figura 6). Castellani *et al.* (2006) observaram

que, na estação de outono o rendimento do óleo de *Ocotea odorifera* foi menor que nos demais períodos e associa esse fato aos baixos valores de radiação e pluviosidade encontrados no período. Em *Baccharis trimera* o maior rendimento dos óleos voláteis foi obtido no período de menor temperatura e menor precipitação (Carreira 2007). A coleta do meio da estação de inverno coincidiu com o menor índice de precipitação encontrado no período (Figura 5), época em que para os indivíduos 2 e 3 de *Ocotea nectandrifolia* foi obtido o maior rendimento dos óleos voláteis (Tabela 3).

Conforme observado na Tabela 3 e Figura 6, o rendimento para cada espécie foi abaixo do esperado, visto que, geralmente espécies de Lauraceae apresentam rendimentos superiores aos obtidos. Em óleos voláteis de *Aniba rosaeodora* o rendimento é em torno de 0,7-1,2% (May & Barata 2004), Nath *et al.* (2006) obtiveram um rendimento de 4% em folhas de *Cinnamomum pauciflorum*. Folhas de *Cinnamomum glanduliferum* e *C. glaucescens* tiveram um rendimento de 0,4% (Baruah & Nath 2006). Bouzouita *et al.* (2003), obtiveram um rendimento de 1,3% do óleo volátil de *Laurus nobilis*. O cálice das flores de *O. quixos* e os frutos de *C. zeylanicum* tiveram um rendimento de 1,9% e 1%, respectivamente (Jayaprakasha *et al.* 1997, Bruni *et al.* 2004).

Tabela 3. Rendimento (%) dos óleos voláteis, de folhas, de três indivíduos de *Ocotea nectandrifolia* e *Ocotea puberula*, nas diferentes estações do ano.

		Rendimento (%)					
		<i>Ocotea nectandrifolia</i>			<i>Ocotea puberula</i>		
		Indivíduos			Indivíduos		
		1	2	3	1	2	3
Outono	Início	0,15 a	0,13 a	0,12 a	0,05 a	0,08 a	0,02 a
	Meio	0,09 b	0,09 b	0,08 b	0,04 a	0,07 a	0,02 a
Inverno	Início	0,13 a	0,10 a	0,08 a	0,03 a	0,06 a	0,02 a
	Meio	0,11 a	0,14 a	0,13 a	0,03 a	0,08 a	0,01 a
Primavera	Início	0,20 a	0,09 a	0,08 a	0,03 a	0,07 a	0,02 a
	Meio	0,18 a	0,11 a	0,09 a	0,05 a	0,09 a	0,04 a
Verão	Início	0,13 a	0,11 a	0,10 a	0,03 a	0,09 a	0,03 a
	Meio	0,13 a	0,10 a	0,07 a	0,04 a	0,12 a	0,03 a

Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%

No presente trabalho, indivíduos de *O. nectandrifolia* tiveram rendimentos maiores, no mínimo duas vezes, quando comparados com *Ocotea puberula*, mas esse rendimento não ultrapassa 0,2% (Tabela 3). Lago *et al.* (2006), observaram em *Pittosporum undulatum*, que o rendimento do óleo volátil de folhas variou, nos diferentes estádios fenológicos da planta, no período reprodutivo (floração e frutificação), o rendimento foi maior que no período vegetativo. O rendimento dos óleos de *O. puberula* e *O. nectandrifolia* não sofreu influência das fases fenológicas.

Os óleos voláteis obtidos de *O. nectandrifolia* são constituídos principalmente de sesquiterpenos (Tabela 4). A presença de hidrocarbonetos sesquiterpênicos e sesquiterpenos oxigenados variou entre os indivíduos. O indivíduo 1 apresentou maior porcentagem de hidrocarbonetos sesquiterpênicos em relação aos indivíduos dois e três. A presença de monoterpenos foi praticamente nula nos indivíduos 1 e 2, e muito baixa no indivíduo 3. O diterpeno caureno ocorre em concentração superior a 10% nos indivíduos 2 e 3 chegando a mais de 20% nos óleos voláteis obtidos no meio do inverno e início da primavera. No entanto, essa concentração é nula na coleta do meio de verão. Foram identificados, no total, setenta e um compostos. Chaverri & Cicció (2007) identificaram um número semelhante de compostos (76) em *Ocotea austinii*. No entanto, diferente do que foi observado para *O. nectandrifolia*, predominam hidrocarbonetos monoterpênicos (54,8%). O óleo da casca de *Ocotea comoriensis* também é rico em monoterpenos (49%) assim como o das folhas de *Ocotea petalanthra* (Gottlieb *et al.* 1981, Menut *et al.* 2002). Por outro lado, Barbosa-Filho *et al.* (2008) identificaram quarenta e nove substâncias sendo 55% sesquiterpenos, nos óleos voláteis de folhas, frutos, caules e raízes de *Ocotea duckei*.

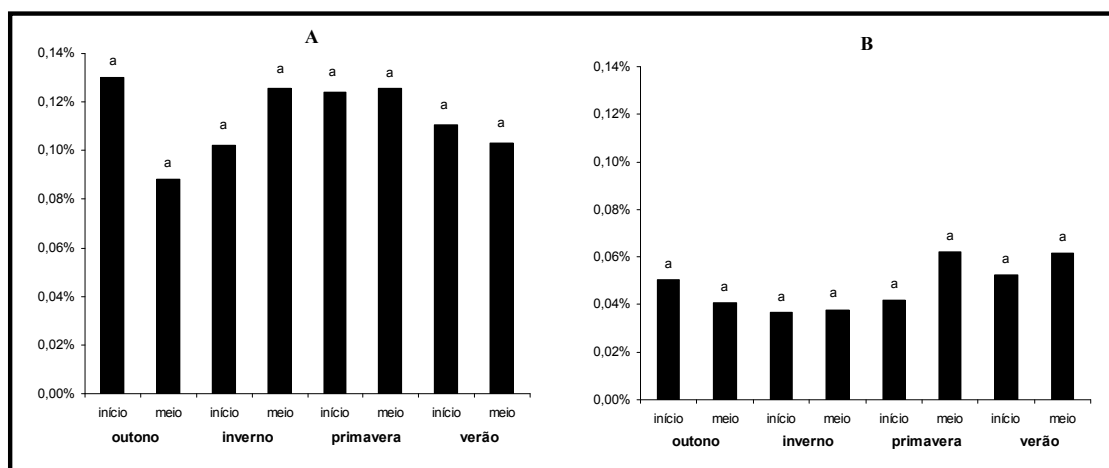


Figura 6. Rendimento médio (%) dos óleos voláteis de *Ocotea nectandrifolia* (A) e *Ocotea puberula* (B), nas diferentes estações do ano. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A composição química dos óleos voláteis de folhas de *Ocotea nectandrifolia* foi semelhante entre os indivíduos 2 e 3 e muito diferente em relação ao indivíduo 1, principalmente entre os compostos majoritários (Tabela 4). O espatulenol foi o constituinte majoritário dos indivíduos 2 e 3, 45,58 % e 41,43% em média, respectivamente, seguido pelo diterpeno caureno que apresentou área de pico em média de 17,32% e 15,48%, respectivamente. Em *Ocotea floribunda* o diterpeno caureno também é o composto majoritário (Takaku *et al.* 2007). O indivíduo 1 teve como constituintes majoritários, 5-hidroxi-cis-calameneno (17,19%), biciclogermacreno (11,11%), β -cariofileno (8,47%), cis calameneno (8,38%) e espatulenol (7,05%). As estruturas químicas estão apresentadas na Figura 8. Os compostos que apresentaram área de pico superior a 7% foram considerados majoritários (Tabela 5). Em todos os indivíduos, foi observada na última coleta de verão, uma queda na concentração de hidrocarbonetos sesquiterpênicos e um aumento na concentração de sesquiterpenos oxigenados (Figura 7). Este é o primeiro relato da composição química dos óleos voláteis de *O. nectandrifolia*.

Tabela 4. Composição química dos óleos voláteis, de folhas, de três indivíduos de *Ocotea nectandrifolia*, nas diferentes estações do ano. Indivíduo 1 (cinza escuro); Indivíduo 2 (cinza claro); Indivíduo 3 (sem preenchimento).

Composto	I. R.	Área do pico (%)							
		outono		inverno		primavera		verão	
		início	meio	início	meio	início	meio	início	meio
α-Pineno	936	-	-	-	-	-	-	-	0,72
β-Pineno	977	-	-	-	-	-	-	-	1,08
Limoneno	1030	-	-	-	-	-	-	-	0,66
N-nonanal	1107	-	0,47	-	-	-	-	-	-
		-	0,86	-	0,31	0,58	0,67	0,80	-
γ-Terpineno	1179	-	-	-	-	-	-	-	3,08
Bicicloelemeno	1326	0,93	0,65	0,44	0,51	-	-	0,84	-
δ-Elemeno	1336	7,45	5,85	7,64	8,25	9,15	8,52	8,36	0,47
		2,11	-	-	-	-	-	-	-
		1,76	-	0,35	0,48	-	1,33	0,63	-
α-Cubebeno	1350	1,68	1,10	1,23	1,26	1,27	1,32	1,45	-

continua...

RESULTADOS E DISCUSSÃO

α-Copaeno	1374	2,77	1,92	2,26	2,41	2,40	2,66	2,52	0,45
		0,41	-	-	-	-	0,29	-	-
β-Cubebeno	1388	0,46	0,39	0,35	0,32	0,37	0,26	0,39	-
β-Elemeno	1390	0,81	0,58	0,41	0,46	0,47	0,55	0,75	-
		0,86	-	-	-	-	-	-	-
		0,94	-	-	0,51	-	0,64	-	-
α-Gurjuneno	1407	-	-	-	-	-	-	0,22	-
β-Cariofileno	1417	8,96	6,63	9,01	8,72	9,43	12,19	9,77	3,06
		3,95	0,45	0,85	0,76	0,28	1,52	0,62	-
		2,65	0,50	0,94	1,25	0,35	4,84	1,18	-
α-Ionona	1427	-	-	0,47	-	-	-	-	-
β-Copaeno	1428	0,34	0,30	0,20	-	-	-	0,32	-
		-	-	-	-	-	0,37	-	-
Aromadendreno	1438	0,84	0,44	0,48	0,50	0,46	0,59	0,96	-
Trans Muurola-3,5-dieno	1451	2,89	2,09	1,79	2,01	1,80	2,56	1,98	0,53
α-Humuleno	1452	2,49	2,05	2,15	2,15	2,24	2,64	2,36	0,94
		0,88	-	-	-	-	-	-	-
		0,96	0,37	0,35	0,51	-	0,87	0,63	-
Aloaromadendreno	1460	0,55	0,35	0,34	0,33	-	0,43	0,55	-
Trans-Cadina-1(6),4-dieno	1475	1,86	1,55	1,35	1,28	1,17	1,36	1,65	0,77
γ-Muuroleno	1478	0,60	0,36	0,36	-	-	0,37	0,57	-
		-	-	-	-	-	-	0,75	-
Germacreno-D	1482	2,28	1,82	1,74	1,65	1,74	2,54	2,11	-
		3,05	-	-	-	-	0,45	-	-
		2,96	0,54	0,74	1,08	-	4,37	1,27	-
Não identificado	1485	1,37	1,28	1,34	0,67	0,82	1,45	0,95	0,45
Não identificado	1485	1,68	1,33	0,79	0,85	1,22	1,30	1,34	-
β-Selineno	1486	-	0,18	0,20	-	-	-	0,34	-
Valenceno	1490	-	-	0,48	-	-	-	-	-
Biciclosesquifelandreno	1492	3,10	3,31	3,19	2,73	2,76	2,42	2,30	0,86
γ-Patchouleno	1493	-	-	0,85	-	-	-	-	-

continua...

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Biciclogermacreno	1496	11,84	9,68	12,80	13,16	13,68	13,32	12,97	1,41
		3,23	0,48	-	0,62	-	0,50	-	-
		3,02	0,66	0,87	1,07	-	2,57	1,13	0,54
α-Muuroleno	1499	1,33	0,68	0,69	0,73	1,33	0,65	1,14	-
Trans-β-Guaieno	1506	-	0,18	-	-	-	-	0,20	-
δ-Amorfeno	1514	0,89	1,15	0,49	0,59	0,54	0,50	0,65	-
		-	-	-	-	-	-	1,08	-
δ-Cadineno	1522	1,06	0,48	0,68	-	0,40	-	-	0,45
		2,06	1,93	1,68	1,04	1,49	1,05	1,42	0,49
Cis Calameneno	1528	7,88	7,20	9,33	8,47	9,91	8,31	8,02	7,89
Não identificado	1528	1,11	1,13	1,28	-	1,02	0,72	1,04	0,35
Não identificado	1528	1,42	1,19	0,52	0,73	1,11	0,67	1,24	-
Trans Cadina 1,4-dieno	1533	1,35	0,90	1,04	1,23	0,91	1,43	1,10	-
α-Calacoreno	1543	-	0,36	0,23	-	-	-	0,19	0,40
		-	0,70	0,61	-	-	-	0,84	0,56
Elemol	1550	0,41	0,43	-	-	-	-	0,35	0,32
Germacreno B	1551	3,49	2,99	3,02	1,82	2,85	2,73	3,61	2,30
		3,56	2,70	2,25	1,94	2,90	2,68	3,03	0,91
Trans Dauca-									
4(11),7dieno	1557	0,30	0,21	0,31	-	-	0,23	0,36	-
Cariofilenil álcool	1570	-	0,19	-	-	-	-	0,23	-
Espatulanol	1579	5,99	8,05	6,87	6,81	8,43	6,19	4,99	9,10
		42,33	41,06	35,76	49,49	39,86	48,69	59,85	47,59
		37,07	36,44	38,55	44,11	39,81	42,62	48,02	44,82
Globulol	1588	3,38	4,02	2,65	2,95	3,02	3,94	3,48	3,44
		2,11	1,97	1,66	-	1,68	1,59	1,68	2,72
Guaiol	1597	3,48	3,79	2,17	2,51	1,86	3,04	3,30	11,56
		1,36	2,07	1,94	1,54	1,19	1,08	1,29	1,49
		4,11	4,28	3,46	2,54	3,10	2,74	3,86	9,70
β-Atlantol	1606	1,36	1,18	1,41	-	0,37	-	2,10	1,07
Epóxido de Humuleno									
II	1607	3,98	4,10	3,81	3,75	3,98	4,34	4,19	5,89
		3,29	3,24	3,94	3,98	3,45	4,00	3,72	6,04

continua...

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1-10-di-epi-cubenol	1617	-	-	-	-	-	-	-	0,94
α-Corocaleno	1622	-	0,57	1,10	-	0,34	-	0,50	0,82
10-epi-γ-eudesmol	1625	1,93	1,81	1,51	1,30	1,18	1,74	2,20	-
1 epi Cubenol	1627	0,72	0,75	0,55	0,52	0,48	0,56	0,71	1,14
		-	-	-	-	-	-	-	1,04
		-	-	0,68	-	0,49	-	1,70	1,48
Muurolo-4,10(14)-dien-1-β-ol	1631	-	1,70	2,79	2,05	-	2,04	-	1,92
		3,69	2,82	3,06	3,19	2,39	2,79	1,73	9,18
γ-Eudesmol	1631	-	0,27	0,19	-	-	-	2,30	3,29
Cariofila-4(12),8(13)-dien-5-β-ol	1637	0,73	0,96	0,66	0,54	0,80	0,95	0,88	2,16
		0,97	0,97	0,96	0,71	0,88	1,11	0,92	-
Heptan-2-ona	1639	2,60	3,33	1,85	1,82	5,00	2,23	3,41	3,21
α-Muurolol	1642	1,59	2,57	1,23	2,19	2,05	2,11	-	-
		1,24	1,02	1,02	0,78	-	0,94	-	-
Não identificado	1642	0,86	0,81	1,94	0,84	1,17	0,67	0,71	1,87
β-Eudesmol	1648	6,52	5,69	5,24	5,95	5,20	4,14	5,60	13,98
		2,89	3,91	3,93	3,92	3,84	3,75	2,71	4,19
		2,50	3,00	4,15	4,38	3,54	3,12	2,43	1,29
Valerianol	1654	-	1,97	1,69	1,59	1,25	1,50	0,35	5,90
		1,91	1,62	1,52	1,08	1,65	1,54	1,70	-
		1,95	1,39	1,46	1,02	1,59	1,52	1,54	4,05
Não identificado	1661	2,47	2,43	2,68	2,00	3,22	2,21	2,46	1,48
14-hidroxi-cariofileno	1663	3,31	4,11	-	-	-	-	-	4,45
Khusinol	1668	0,54	0,84	0,58	-	0,45	0,44	0,64	-
14-hidroxi-9-epi-cariofileno	1674	-	0,55	3,90	3,11	4,00	4,04	4,76	5,66
		3,11	3,73	3,01	2,50	3,67	3,70	2,98	1,31
Mustacona	1679	-	1,30	1,34	-	1,34	0,81	1,11	2,68
		1,51	1,52	1,28	0,84	1,42	0,88	1,45	1,06
Acetato de Elemol	1687	-	-	0,35	-	-	-	1,32	1,61
(2Z,6Z) Farnesol	1689	-	-	-	-	-	-	-	2,77

continua...

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Epi Nootkatol	1689	-	1,53	1,27	-	0,89	0,95	1,01	2,81
		1,19	1,48	0,83	-	0,85	0,62	-	-
Eudesm-7(11)-en-4-ol	1703	-	-	0,47	-	-	-	-	-
Amorfa-4,9-dien-2-ol	1704	-	0,25	-	-	-	-	0,11	-
		-	0,39	0,50	-	-	-	-	0,47
		-	0,70	0,79	-	-	-	-	1,08
Thujopsenal	1730	-	0,30	0,24	-	-	-	0,28	-
Isobiciclogermacrenal	1737	-	-	0,56	-	-	-	-	1,81
		-	-	0,39	0,36	-	-	-	-
14-oxi-α-Muuroleno	1777	-	0,69	0,91	-	0,48	-	-	0,81
		0,74	0,68	0,53	0,39	0,46	-	0,48	-
5-hidroxi-cis-									
Calameneno	1795	12,01	16,14	17,07	18,75	16,86	13,52	11,49	31,64
14-hidroxi-δ-Cadineno	1814	-	-	-	-	-	-	-	0,39
Ent - Rosa-5,15-dieno	1920	1,78	1,92	2,56	2,38	2,64	1,66	-	-
		1,32	2,08	1,17	1,05	1,38	0,87	0,49	-
Caureno	1977	1,32	2,50	0,94	0,98	0,51	-	0,99	-
		12,89	16,85	16,61	25,61	24,81	18,31	6,19	-
		10,52	18,62	18,37	20,04	22,37	10,59	7,86	-
Tricosano	2309	-	-	-	-	-	-	0,17	-
Total Indivíduo 1 (%)		98,16	98,82	98,27	99,58	99,59	99,38	98,12	97,15
Monoterpenos (%)		-	-	-	-	-	-	-	-
Hidrocarbonetos (%)		-	-	-	-	-	-	-	-
Oxigenados (%)		-	-	-	-	-	-	-	-
Sesquiterpenos (%)		96,84	96,32	97,33	98,6	99,08	99,38	96,96	97,15
Hidrocarbonetos (%)		60,27	49,25	57,34	56,03	58,30	62,20	60,93	16,78
Oxigenados (%)		36,57	47,07	39,99	42,57	40,78	37,18	36,03	80,37
Outros (%)		1,32	2,50	0,94	0,98	0,51	-	0,99	-
Total Indivíduo 2 (%)		95,88	94,11	89,80	98,49	96,06	97,18	95,11	93,11
Monoterpenos (%)		-	0,47	-	-	-	-	-	-
Hidrocarbonetos (%)		-	-	-	-	-	-	-	-
Oxigenados (%)		-	0,47	-	-	-	-	-	-
Sesquiterpenos (%)		81,21	74,87	70,63	70,50	68,61	77,21	88,92	93,11

continua...

Hidrocarbonetos (%)	18,63	4,40	5,88	3,20	3,53	5,20	4,23	2,75
Oxigenados (%)	62,58	70,47	64,75	67,30	65,08	72,01	84,69	90,36
Outros (%)	14,67	18,77	19,17	27,99	27,45	19,97	6,19	-
Total Indivíduo 3 (%)	92,86	91,48	93,58	94,81	92,39	95,83	92,90	94,19
Monoterpenos (%)	-	0,86	-	0,31	0,58	0,67	0,80	5,54
Hidrocarbonetos (%)	-	-	-	-	-	-	-	5,54
Oxigenados (%)	-	0,86	-	0,31	0,58	0,67	0,80	-
Sesquiterpenos (%)	81,02	69,92	74,04	73,41	68,06	83,7	83,75	88,65
Hidrocarbonetos (%)	19,65	8,65	9,58	8,61	6,41	19,66	13,60	3,32
Oxigenados (%)	61,37	61,27	64,46	64,80	61,65	64,04	70,15	85,33
Outros (%)	11,84	20,70	19,54	21,09	23,75	11,46	8,35	-

Tabela 5. Compostos voláteis com área de pico superior a 5% de óleos voláteis de folhas de *Ocotea nectandrifolia*, coletadas nas diferentes estações do ano. Indivíduo 1 (cinza escuro); Indivíduo 2 (cinza claro); Indivíduo 3 (sem preenchimento).

Composto	I. R.	Área do pico (%)							
		outono		inverno		primavera		verão	
		início	meio	início	meio	início	meio	início	meio
δ-Elemeno	1336	7,45	5,85	7,64	8,25	9,15	8,52	8,36	0,47
		2,11	-	-	-	-	-	-	-
		1,76	-	0,35	0,48	-	1,33	0,63	-
β-Cariofileno	1417	8,96	6,63	9,01	8,72	9,43	12,19	9,77	3,06
		3,95	0,45	0,85	0,76	0,28	1,52	0,62	-
		2,65	0,50	0,94	1,25	0,35	4,84	1,18	-
Biciclogermacreno	1496	11,84	9,68	12,80	13,16	13,68	13,32	12,97	1,41
		3,23	0,48	-	0,62	-	0,50	-	-
		3,02	0,66	0,87	1,07	-	2,57	1,13	0,54
Cis Calameneno	1528	7,88	7,20	9,33	8,47	9,91	8,31	8,02	7,89
Espatulanol	1579	5,99	8,05	6,87	6,81	8,43	6,19	4,99	9,10
		42,33	41,06	35,76	49,49	39,86	48,69	59,85	47,59
		37,07	36,44	38,55	44,11	39,81	42,62	48,02	44,82
Guaiol	1597	3,48	3,79	2,17	2,51	1,86	3,04	3,30	11,56

continua...

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Guaiol		1,36	2,07	1,94	1,54	1,19	1,08	1,29	1,49
		4,11	4,28	3,46	2,54	3,10	2,74	3,86	9,70
Epoxido de Humuleno II	1607	3,98	4,10	3,81	3,75	3,98	4,34	4,19	5,89
		3,29	3,24	3,94	3,98	3,45	4,00	3,72	6,04
Muurrola-4,10(14)-dien-1-β-ol		-	1,70	2,79	2,05	-	2,04	-	1,92
Muurrola-4,10(14)-dien-1-β-ol	1631	3,69	2,82	3,06	3,19	2,39	2,79	1,73	9,18
Heptan-2-ona	1639	2,60	3,33	1,85	1,82	5,00	2,23	3,41	3,21
β-Eudesmol	1648	6,52	5,69	5,24	5,95	5,20	4,14	5,60	13,98
		2,89	3,91	3,93	3,92	3,84	3,75	2,71	4,19
		2,50	3,00	4,15	4,38	3,54	3,12	2,43	1,29
Valerianol	1654	-	1,97	1,69	1,59	1,25	1,50	0,35	5,90
	1654	1,91	1,62	1,52	1,08	1,65	1,54	1,70	-
		1,95	1,39	1,46	1,02	1,59	1,52	1,54	4,05
14-hidroxi-9-epi-Cariofileno	1674	-	0,55	3,90	3,11	4,00	4,04	4,76	5,66
5-hidroxi-cis-Calameneno	1795	12,01	16,14	17,07	18,75	16,86	13,52	11,49	31,64
Caureno	1977	1,32	2,50	0,94	0,98	0,51	-	0,99	-
	1977	12,89	16,85	16,61	25,61	24,81	18,31	6,19	-
	1977	10,52	18,62	18,37	20,04	22,37	10,59	7,86	-

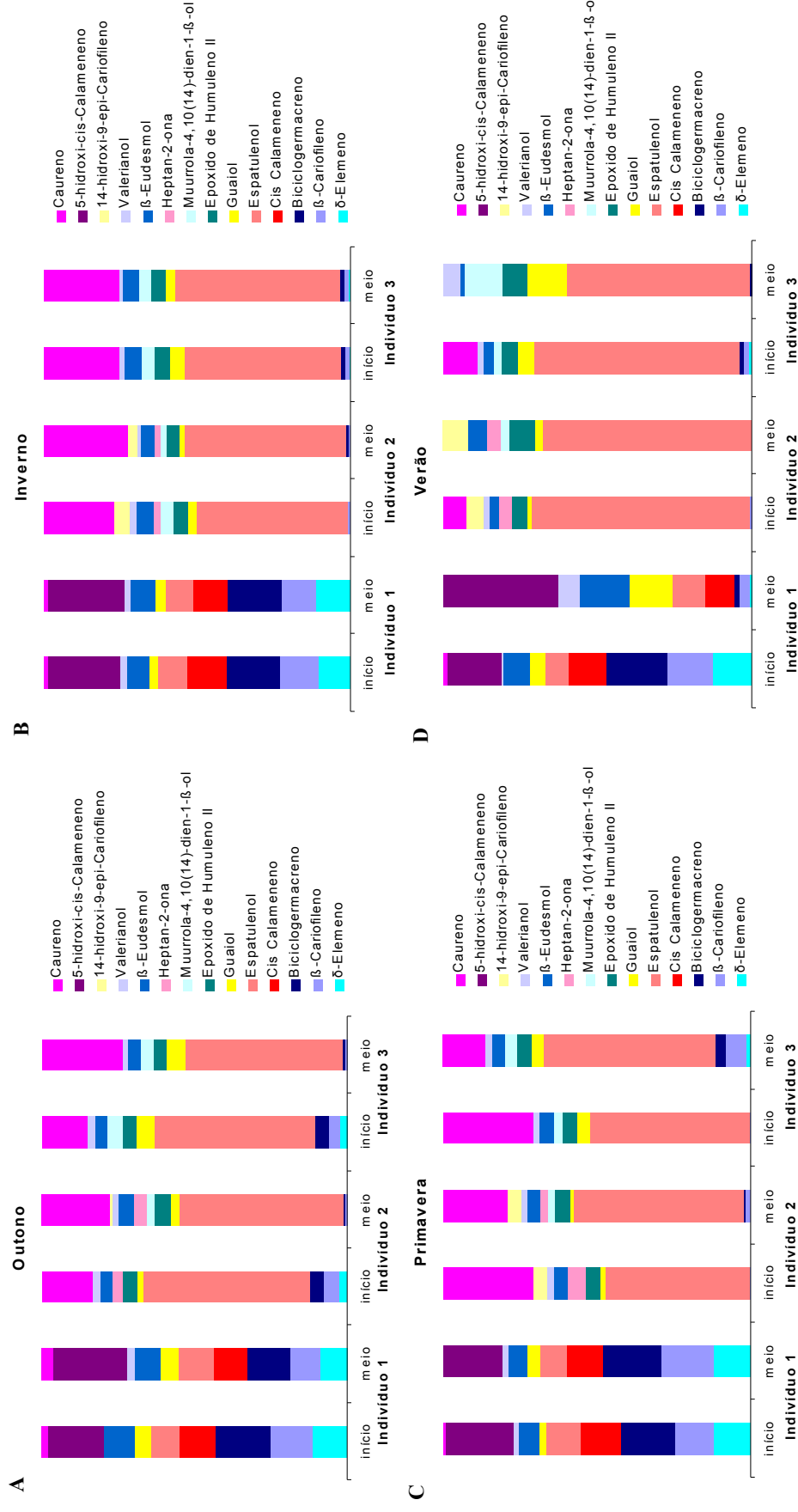


Figura 7. Compostos voláteis com área de pico superior a 5%, presentes em óleos voláteis de folhas dos três indivíduos de *Ocatea nectandrifolia*, coletadas nas diferentes estações do ano. (A) outono; (B) inverno; (C) primavera; e (D) verão.

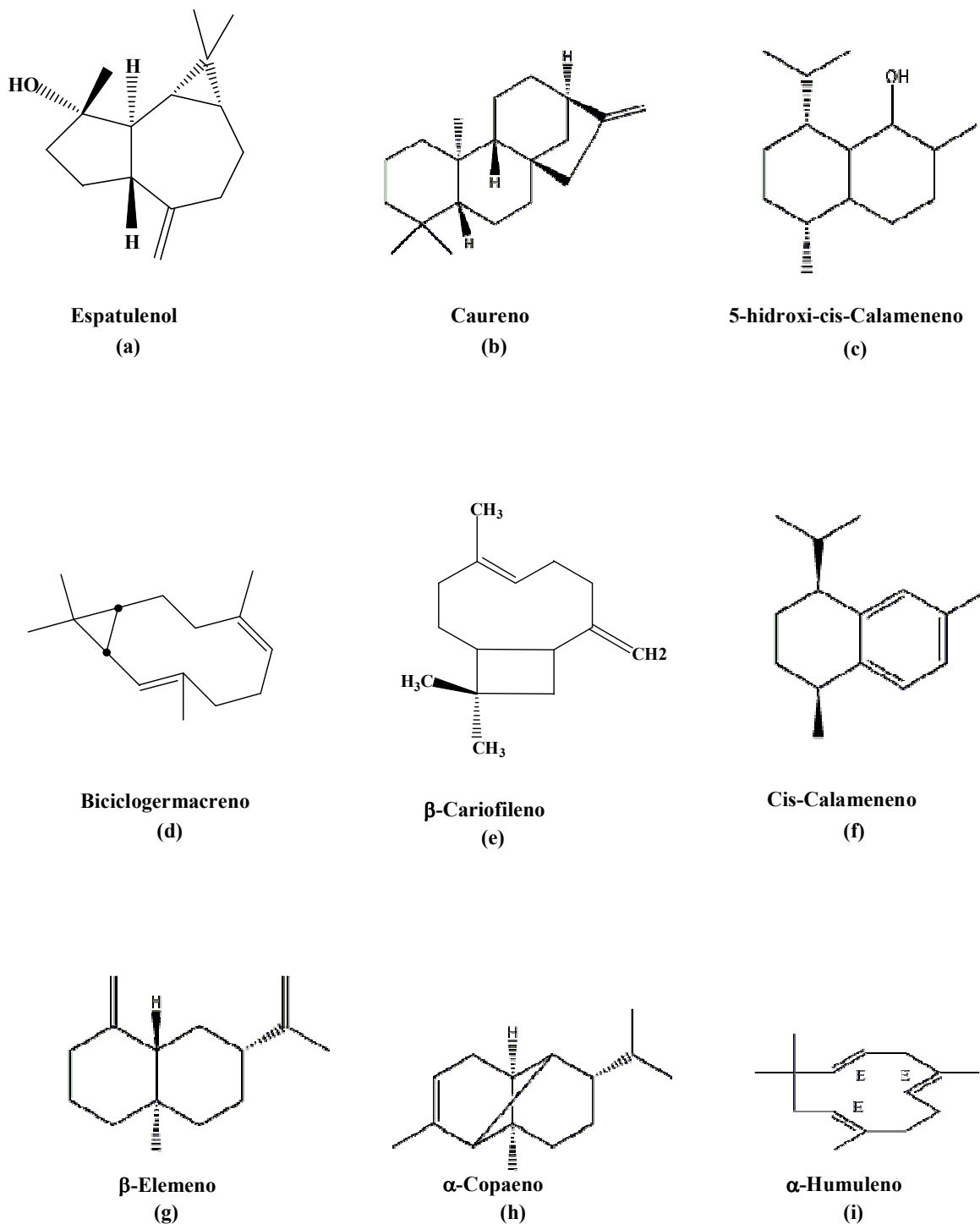


Figura 8. Estruturas químicas dos compostos voláteis majoritários identificados em óleos voláteis de *Ocotea nectandrifolia* (a) – (f) e *Ocotea puberula* (e, g-i).

A composição química dos óleos voláteis de folhas de *Ocotea puberula* está descrita na Tabela 6. Foram identificados ao todo sessenta e sete compostos, na sua maioria, hidrocarbonetos sesquiterpênicos. A presença de monoterpenos foi baixa, não ultrapassando 16% de hidrocarbonetos. As coletas de inverno apresentaram uma diminuição de monoterpenos e um aumento na ocorrência de hidrocarbonetos saturados. A variação qualitativa na composição dos óleos voláteis entre os indivíduos de *Ocotea puberula* foi menor quando comparada aos indivíduos de *Ocotea nectandrifolia*, porém houve variações quantitativas. (Tabela 7 e Figura 9). Os três indivíduos de *Ocotea puberula* apresentaram como composto majoritário o hidrocarboneto sesquiterpênico β -cariofileno com área de pico de 25,25%, 33,68% e 17,65% em média, além de β -elemeno, biciclogermacreno, α -copaeno e α -humuleno (Figura 8), corroborando os resultados obtidos por Araujo *et al.* (2001), que identificaram como composto majoritário em *Ocotea puberula*, o sesquiterpeno β -cariofileno (31%). Takaku *et al.* (2007) verificaram a presença de α e β -pineno, β -elemeno, β -cariofileno, α -humuleno, germacreno-D, γ -cadineno, δ -cadineno e α -cadinol em dez espécies de *Ocotea*.

Tabela 6. Composição química dos óleos voláteis, de folhas, de três indivíduos de *Ocotea puberula*, nas diferentes estações do ano. Indivíduo 1 (cinza escuro); Indivíduo 2 (cinza claro); Indivíduo 3 (sem preenchimento).

Composto	I. R.	Área do pico (%)							
		outono		inverno		primavera		verão	
		início	meio	início	meio	início	meio	início	meio
α-Pineno	936	3,77	3,05	0,26	-	1,17	1,54	2,31	2,43
		3,34	3,82	-	-	-	2,26	3,00	2,66
		5,16	4,25	0,23	-	-	4,10	6,14	5,05
β-Pineno	977	5,61	4,34	0,55	-	1,98	2,12	3,33	4,07
		4,65	4,65	-	0,88	1,04	2,82	3,66	3,66
		10,03	4,99	0,71	-	-	6,66	8,17	7,98
Mirceno	993	0,93	0,67	-	-	0,35	0,30	0,45	0,64
		0,68	0,62	-	-	-	-	-	-
		-	-	-	-	-	-	0,95	1,12
Limoneno	1029	0,67	0,36	-	-	-	-	0,33	0,66

continua...

RESULTADOS E DISCUSSÃO

β-Felandreno	1030	0,83	0,66	-	-	0,42	0,36	0,55	0,66
		0,59	0,50	-	-	-	-	-	-
		-	0,62	-	-	-	-	-	-
1,8 Cineol	1032	-	-	-	-	-	-	0,41	-
Mirtenal	1194	-	-	-	-	-	-	0,28	-
Bicicloelemeno	1328	-	0,38	0,22	-	0,23	-	0,33	-
		-	-	1,12	-	-	-	-	-
		-	0,39	0,26	-	0,29	-	0,35	-
δ-Elemeno	1338	2,33	3,55	3,64	3,95	3,90	3,12	3,45	2,38
		1,62	3,01	1,30	2,90	3,03	2,53	3,05	1,66
		3,53	3,90	4,33	5,05	5,71	4,60	4,57	3,95
α-Cubebeno	1350	-	0,51	0,50	0,55	0,54	0,40	0,63	-
		-	0,53	-	0,63	0,47	-	0,68	-
		-	0,22	-	-	-	-	-	-
α-Copaeno	1376	6,58	5,27	6,70	8,05	7,03	7,92	5,09	6,41
		3,59	4,58	4,27	4,74	4,57	6,11	5,29	4,51
		8,05	6,69	8,46	8,51	8,46	10,06	8,03	9,72
β-Cubebeno	1389	1,11	-	2,20	2,52	2,89	-	-	-
		2,22	-	1,79	3,54	3,90	-	-	-
		0,81	-	-	-	-	-	-	-
β-Elemeno	1392	3,44	8,22	5,09	4,63	4,79	11,59	8,21	7,17
		1,31	6,83	2,33	2,24	2,14	9,17	6,31	3,64
		5,47	9,79	7,67	9,37	11,37	14,79	10,41	10,72
Z-Cariofileno	1405	-	-	-	-	0,41	0,27	0,44	-
β-Cariofileno	1416	40,41	17,81	21,01	23,61	20,50	21,93	21,18	35,55
		47,60	24,19	15,70	28,32	29,62	34,19	37,55	52,28
		16,14	12,99	16,21	18,23	16,51	19,86	16,31	24,91
α-Ionona	1428	1,72	1,65	1,13	1,00	-	-	1,35	1,18
β-Copaeno	1429	-	0,85	0,92	0,78	0,73	0,60	0,83	0,42
		-	0,66	-	0,56	0,47	0,63	0,60	-
		-	-	-	-	1,18	0,86	-	-
γ-Elemeno	1434	-	0,50	0,47	0,43	0,44	0,46	0,60	-
		0,74	1,10	-	1,28	1,14	1,11	1,39	0,81

continua...

RESULTADOS E DISCUSSÃO

γ-Elemeno		1,26	0,90	1,19	0,95	0,94	0,63	0,87	0,54
α-Guaieno	1438	-	0,43	0,28	-	0,28	-	0,31	-
6,9 guaiadieno	1443	-	0,53	0,49	-	0,35	-	0,68	-
α-Humuleno	1451	6,86	5,48	6,64	6,87	6,33	5,67	5,14	6,00
		8,50	6,86	4,88	9,04	8,74	8,97	7,47	8,52
		3,02	3,22	3,22	3,09	3,56	3,89	3,59	2,74
Geranil Acetona	1453	0,81	0,59	1,21	1,35	0,76	-	-	0,27
Trans Cadina 1(6), 4 dieno	1474	-	0,40	0,42	0,52	0,46	0,31	0,61	-
		-	0,52	-	0,73	0,50	-	0,60	-
Gama Muuroleno	1475	0,90	-	-	-	-	-	-	-
α-Amorfenoleno	1477	-	0,50	-	-	-	-	-	0,35
Germacreno D	1482	3,29	4,71	5,17	5,74	5,56	7,01	4,71	3,87
		4,60	5,68	4,66	5,75	5,82	8,89	5,88	5,30
		4,38	6,31	6,48	7,60	9,07	10,71	7,30	7,43
β-Ionona	1487	-	0,81	0,75	0,51	0,50	0,30	0,54	-
		-	0,29	-	-	-	-	-	-
		1,82	1,35	1,33	1,10	0,79	-	0,78	0,84
β-Selineno	1489	-	-	-	-	-	-	0,31	-
		-	0,34	0,30	-	0,46	0,46	0,46	0,26
Biciclosesquifelandreno	1490	0,47	0,74	0,82	0,83	0,78	0,68	0,76	0,46
		0,63	1,02	-	1,44	1,14	0,88	1,14	0,65
Biciclogermacreno	1497	6,75	7,27	7,84	8,07	7,59	6,92	6,18	6,41
		4,73	5,81	6,58	4,74	5,92	4,78	4,67	4,01
		6,06	6,55	7,74	8,74	9,19	8,42	7,04	8,21
α-Muuroleno	1499	-	0,25	-	-	-	-	-	-
		-	0,26	-	-	-	-	-	-
α-Bulneseno	1505	-	0,25	0,33	-	0,28	0,26	0,34	-
		-	0,28	-	-	-	-	-	-
δ-Amorfenoleno	1505	-	-	-	-	-	-	4,66	5,30
γ-Cadineno	1517	2,22	3,91	2,93	2,12	-	-	-	-
		3,26	4,86	1,17	2,51	5,31	3,39	3,13	1,57
		1,32	1,38	-	-	-	-	-	-

continua...

RESULTADOS E DISCUSSÃO

δ-Cadineno	1521	4,96	4,68	6,58	8,05	8,24	7,34	6,95	6,96
		4,40	4,82	8,66	7,77	6,21	4,69	-	-
		2,95	2,66	3,40	4,04	3,23	2,79	3,40	2,85
Trans Cadina 1, 4dieno	1533	-	0,55	0,73	0,77	0,65	0,46	0,60	0,39
		-	0,66	0,83	0,85	0,69	0,50	0,66	-
		-	0,34	0,29	-	-	-	0,30	-
α-Calacoreno	1543	-	-	-	-	0,23	-	0,31	-
		-	0,27	0,24	-	-	-	0,34	-
Elemol	1550	-	0,42	0,42	-	0,42	0,51	0,54	-
		-	-	0,99	0,50	-	-	-	-
Trans Dauca-4(11),7 dieno	1551	0,55	0,53	0,38	-	0,38	-	-	-
Nerolidol (E)	1568	1,97	3,03	3,62	2,69	2,40	1,83	2,74	2,03
		1,35	2,44	1,75	2,72	1,98	1,68	1,63	1,06
		3,42	3,32	4,36	4,63	3,47	2,05	2,48	2,41
Espatulanol	1577	0,63	1,83	1,57	1,61	1,55	-	1,78	0,81
		-	0,98	7,75	1,06	1,10	-	0,63	-
		2,72	4,10	3,37	3,53	-	1,71	2,06	1,36
Globulol	1590	3,55	3,86	3,80	3,68	5,09	8,79	4,89	4,94
		2,71	3,56	-	-	6,65	2,51	2,60	1,25
		7,08	4,27	3,79	4,22	8,09	4,04	5,44	2,79
Guaiol	1600	0,80	2,63	2,22	1,71	2,07	1,38	2,52	1,09
		0,43	2,35	7,94	6,64	2,27	0,53	0,73	-
		1,38	2,32	1,53	2,03	1,36	-	0,86	0,65
Epóxido de Humuleno II	1608	-	-	1,18	-	0,43	-	-	-
		0,69	0,58	0,36	-	0,37	-	0,26	-
1-10-di-epi Cubenol	1616	-	0,66	1,09	-	-	-	-	-
		0,48	0,25	0,25	-	0,57	-	-	-
1-epi-Cubenol	1628	1,26	3,62	2,17	2,39	1,94	1,05	1,95	1,82
		1,33	3,60	2,33	3,35	2,45	1,15	1,65	1,29
Muurola-4,10(14)-dien- 1-β-ol	1629	0,97	1,27	1,56	1,35	0,83	0,50	0,63	0,51

continua...

Cariofila-4(12),8(13)-									
dien-5-β-ol	1637	0,43	0,53	-	-	-	-	-	-
α-Muurolol	1644	2,24	3,27	4,35	4,66	3,72	2,38	4,60	3,72
		1,06	0,69	3,71	0,84	3,86	2,64	3,05	1,83
		1,55	1,46	1,88	1,36	0,86	0,70	0,73	0,58
Cubenol	1553	0,66	1,51	-	2,82	-	-	-	-
α-Cadinol	1654	2,24	2,50	2,49	3,48	1,89	2,31	1,54	1,28
Trans-Calamenen-10-									
ol	1665	-	-	1,35	0,29	-	-	-	-
		0,48	-	0,74	-	-	-	-	0,30
14-hidroxi-9-epi									
Cariofileno	1668	0,53	-	-	-	-	-	-	-
Bulnesol	1668	-	0,48	0,48	-	-	-	0,50	-
Mustacona	1675	-	0,19	0,24	-	0,26	0,41	0,48	-
		0,60	0,40	0,31	-	0,48	-	0,38	-
Khusinol	1685	-	0,35	0,25	0,44	-	-	-	-
Heptadecane	1714	0,50	0,62	0,61	0,43	-	-	-	-
Acetato de guaíol	1720	-	0,18	-	-	-	-	-	-
Mint sulfide	1734	-	0,31	-	-	-	-	-	-
5E,9Z Farnesil Acetona	1916	-	0,36	0,54	0,59	0,54	-	0,33	-
		-	0,37	0,76	1,19	0,91	-	-	-
Fitol acetato	2126	-	0,41	0,43	0,53	0,58	-	-	0,45
Tricosano	2309	-	0,20	-	-	-	0,63	0,30	-
		-	1,04	0,90	-	-	-	-	-
		0,82	0,29	0,59	0,50	0,34	-	-	-
Tetracosano	2361	-	-	0,29	-	-	-	-	-
Pentacosane	2507	-	0,75	0,30	0,33	-	-	-	-
		-	-	1,39	-	-	-	-	-
		0,67	0,53	1,41	1,41	1,02	-	-	-
Hexacosano	2539	-	-	0,23	-	-	-	-	-
Heptacosano	2579	-	-	7,56	-	-	-	-	-
		-	0,60	2,01	1,91	-	-	-	-

continua...

Total Indivíduo 1 (%)		100,00	96,61	93,76	95,66	94,27	96,54	94,79	98,58
Monoterpenos (%)		11,14	8,72	0,81	-	3,92	4,32	6,64	7,80
Hidrocarbonetos (%)		11,14	8,72	0,81	-	3,92	4,32	6,64	7,80
Oxigenados (%)		-	-	-	-	-	-	-	-
Sesquiterpenos (%)		88,87	86,94	92,65	95,33	90,35	91,59	87,85	90,78
Hidrocarbonetos (%)		78,42	66,26	72,49	77,49	71,86	74,94	66,98	76,37
Oxigenados (%)		10,45	20,68	20,16	17,84	18,49	16,65	20,87	14,41
Outros (%)		-	0,95	0,30	0,33	-	0,63	0,30	-
Total Indivíduo 2 (%)		100,00	98,38	91,23	96,14	99,45	99,43	100,00	100,00
Monoterpenos (%)		9,26	9,59	-	0,88	1,04	5,08	6,66	6,32
Hidrocarbonetos (%)		9,26	9,59	-	0,88	1,04	5,08	6,66	6,32
Oxigenados (%)		-	-	-	-	-	-	-	-
Sesquiterpenos (%)		90,74	87,75	81,38	95,26	98,41	94,35	93,37	93,68
Hidrocarbonetos (%)		83,20	71,67	53,29	77,04	79,67	85,84	83,08	88,25
Oxigenados (%)		7,54	16,08	28,09	18,22	18,74	8,51	10,29	5,43
Outros (%)		-	1,04	9,85	-	-	-	-	-
Total Indivíduo 3 (%)		99,21	95,30	92,49	96,04	93,02	99,14	96,44	98,76
Monoterpenos (%)		15,86	10,22	0,94	-	-	10,76	16,28	14,81
Hidrocarbonetos (%)		15,86	10,22	0,94	-	-	10,76	15,59	14,81
Oxigenados (%)		-	-	-	-	-	-	0,69	-
Sesquiterpenos (%)		81,86	82,72	86,10	91,69	90,73	88,38	79,48	83,50
Hidrocarbonetos (%)		54,44	56,48	60,17	65,58	70,35	77,07	62,97	71,33
Oxigenados (%)		27,42	26,24	25,93	26,11	20,38	11,31	16,51	12,17
Outros (%)		1,49	2,36	5,45	4,35	2,29	-	0,68	0,45

Tabela 7. Compostos voláteis com área de pico superior a 5% de óleos voláteis de folhas de *Ocotea puberula*, coletadas nas diferentes estações do ano. Indivíduo 1 (cinza escuro); Indivíduo 2 (cinza claro); Indivíduo 3 (sem preenchimento).

Composto	I. R.	Área do pico (%)							
		outono		inverno		primavera		verão	
		início	meio	início	meio	início	meio	início	meio
α-Pinenos	936	3,77	3,05	0,26	-	1,17	1,54	2,31	2,43
		3,34	3,82	-	-	-	2,26	3,00	2,66
		5,16	4,25	0,23	-	-	4,10	6,14	5,05
β-Pinenos	977	5,61	4,34	0,55	-	1,98	2,12	3,33	4,07
		4,65	4,65	-	0,88	1,04	2,82	3,66	3,66
		10,03	4,99	0,71	-	-	6,66	8,17	7,98
δ-Elemenos	1338	2,33	3,55	3,64	3,95	3,90	3,12	3,45	2,38
		1,62	3,01	1,30	2,90	3,03	2,53	3,05	1,66
		3,53	3,90	4,33	5,05	5,71	4,60	4,57	3,95
α-Copaenos	1376	6,58	5,27	6,70	8,05	7,03	7,92	5,09	6,41
		3,59	4,58	4,27	4,74	4,57	6,11	5,29	4,51
		8,05	6,69	8,46	8,51	8,46	10,06	8,03	9,72
β-Elemenos	1392	3,44	8,22	5,09	4,63	4,79	11,59	8,21	7,17
		1,31	6,83	2,33	2,24	2,14	9,17	6,31	3,64
		5,47	9,79	7,67	9,37	11,37	14,79	10,41	10,72
β-Cariofilenos	1416	40,41	17,81	21,01	23,61	20,50	21,93	21,18	35,55
		47,60	24,19	15,70	28,32	29,62	34,19	37,55	52,28
		16,14	12,99	16,21	18,23	16,51	19,86	16,31	24,91
α-Humulenos	1451	6,86	5,48	6,64	6,87	6,33	5,67	5,14	6,00
		8,50	6,86	4,88	9,04	8,74	8,97	7,47	8,52
		3,02	3,22	3,22	3,09	3,56	3,89	3,59	2,74
Germacreno D	1482	3,29	4,71	5,17	5,74	5,56	7,01	4,71	3,87
		4,60	5,68	4,66	5,75	5,82	8,89	5,88	5,30
		4,38	6,31	6,48	7,60	9,07	10,71	7,30	7,43
Biciclogermacreno	1497	6,75	7,27	7,84	8,07	7,59	6,92	6,18	6,41
		4,73	5,81	6,58	4,74	5,92	4,78	4,67	4,01

continua...

Biciclogermacreno		6,06	6,55	7,74	8,74	9,19	8,42	7,04	8,21
δ-Amorfenol	1505	-	-	-	-	-	-	4,66	5,30
γ-Cadineno	1517	2,22	3,91	2,93	2,12	-	-	-	-
		3,26	4,86	1,17	2,51	5,31	3,39	3,13	1,57
		1,32	1,38	-	-	-	-	-	-
δ-Cadineno	1521	4,96	4,68	6,58	8,05	8,24	7,34	6,95	6,96
		4,40	4,82	8,66	7,77	6,21	4,69	-	-
		2,95	2,66	3,40	4,04	3,23	2,79	3,40	2,85
Espatuleno	1577	0,63	1,83	1,57	1,61	1,55	-	1,78	0,81
		-	0,98	7,75	1,06	1,10	-	0,63	-
		2,72	4,10	3,37	3,53	-	1,71	2,06	1,36
Globulol	1590	3,55	3,86	3,80	3,68	5,09	8,79	4,89	4,94
		2,71	3,56	-	-	6,65	2,51	2,60	1,25
		7,08	4,27	3,79	4,22	8,09	4,04	5,44	2,79
Guaiol	1600	0,80	2,63	2,22	1,71	2,07	1,38	2,52	1,09
		0,43	2,35	7,94	6,64	2,27	0,53	0,73	-
		1,38	2,32	1,53	2,03	1,36	-	0,86	0,65
Heptacosano	2579	-	-	7,56	-	-	-	-	-
		-	0,60	2,01	1,91	-	-	-	-

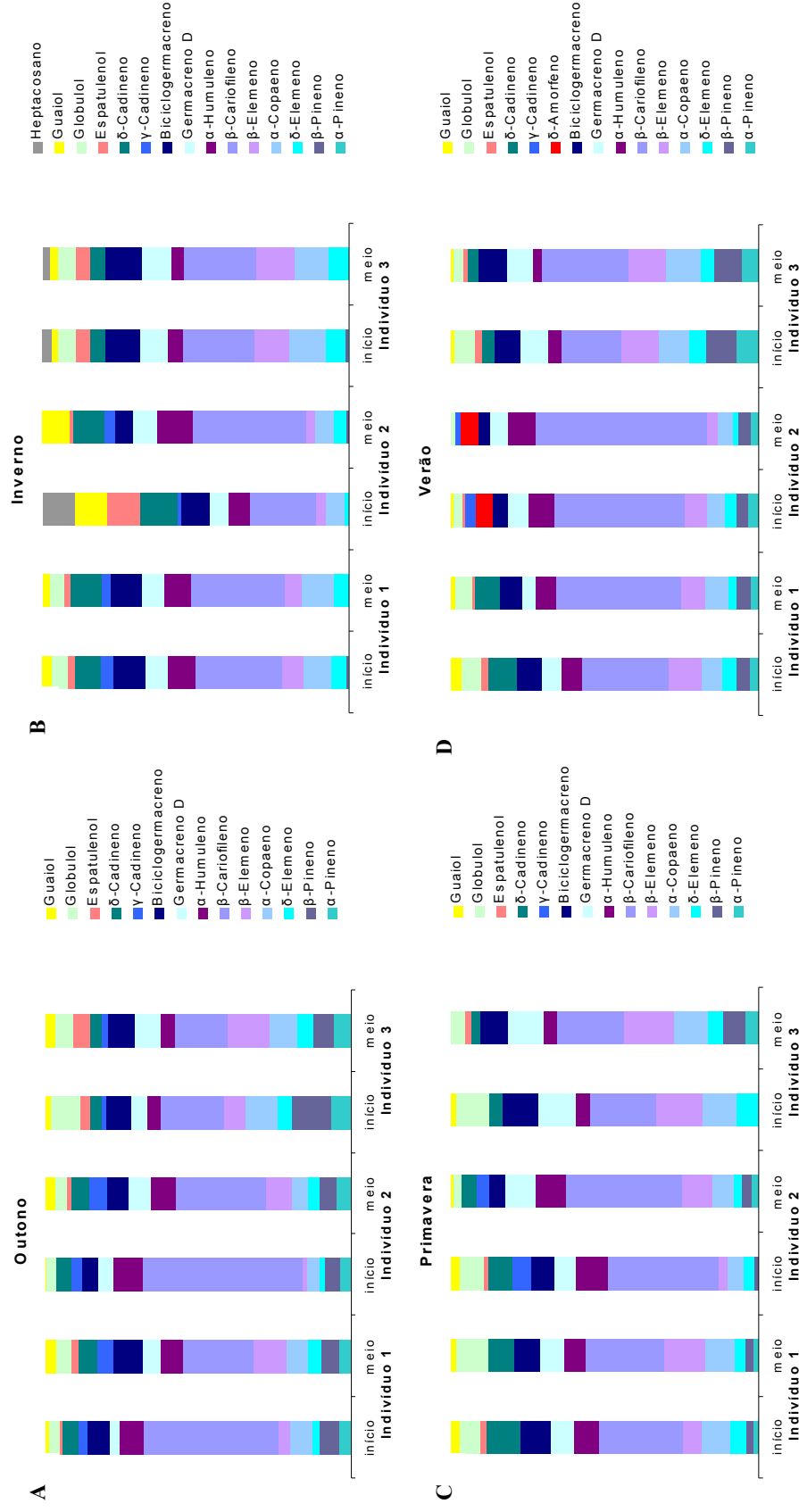


Figura 9. Compostos voláteis com área de pico superior a 5%, presentes em óleos voláteis de folhas dos três indivíduos de *Ocatea puberula*, coletadas nas diferentes estações do ano. (A) outono; (B) inverno; (C) primavera; e (D) verão.

Os resultados de atividade antifúngica por bioautografia em placa de sílica gel são mostrados nas Tabelas 8 e 9. Os óleos voláteis de folhas dos três indivíduos de *Ocotea nectandrifolia* coletadas no outono (meio) e inverno (início e meio) inibiram parcialmente o crescimento do fungo filamentosso *Cladosporium cladosporioides*, porém, no período em que o mesmo se mostrou mais sensível, os componentes majoritários dos óleos não sofreram diferenças na composição. Já os óleos voláteis, dos indivíduos 2 e 3, obtidos a partir das coletas de primavera e verão inibiram parcialmente o crescimento do fungo *C. sphaerospermum* (Figura 10-a). Apesar das respostas antifúngicas variarem com as diferentes estações do ano, não houve diferença quanto à composição química dos óleos voláteis, principalmente entre os componentes majoritários.

Moreira *et al.* (2007) observaram intenso potencial antifúngico do óleo volátil de *Cinnamomum zeylanicum* e do composto β -pineno, inibindo totalmente o crescimento dos micélios dos fungos *C. cladosporioides* e *Fonsecaea compacta*. Os óleos voláteis de *Ocotea puberula* apresentaram fraca atividade frente aos dois fungos testados (Tabela 9).

Tabela 8. Atividade antifúngica sobre *Cladosporium sphaerospermum* e *Cladosporium cladosporioides*, por bioautografia direta, de óleos voláteis de folhas de *Ocotea nectandrifolia* coletadas nas diferentes estações do ano.

Óleo volátil		Indivíduos			Indivíduos		
		1	2	3	1	2	3
		<i>C. sphaerospermum</i>			<i>C. cladosporioides</i>		
Outono	Início	*	*	*	*	*	*
	Meio	*	*	*	**	**	**
Inverno	Início	*	*	*	**	**	**
	Meio	*	*	*	**	**	**
Primavera	Início	*	**	**	*	*	*
	Meio	*	**	**	*	*	*
Verão	Início	*	**	**	*	*	*
	Meio	*	**	**	*	*	*
Controle		***			***		

Legenda: (*) atividade fraca; (**) atividade média; (***) atividade forte.

Tabela 9. Atividade antifúngica sobre *Cladosporium sphaerospermum* e *Cladosporium cladosporioides*, por bioautografia direta, de óleos voláteis de folhas de *Ocotea puberula* coletadas nas diferentes estações do ano.

Óleo volátil		Indivíduos			Indivíduos		
		1	2	3	1	2	3
		<i>C. sphaerospermum</i>			<i>C. cladosporioides</i>		
Outono	Início	*	*	*	*	*	**
	Meio	*	*	*	*	*	*
Inverno	Início	*	*	*	*	*	*
	Meio	*	*	*	*	*	*
Primavera	Início	*	*	*	*	*	*
	Meio	*	*	*	*	*	*
Verão	Início	*	*	*	*	*	*
	Meio	*	*	*	*	*	*
Controle		***			***		

Legenda: (*) atividade fraca; (**) atividade média; (***) atividade forte

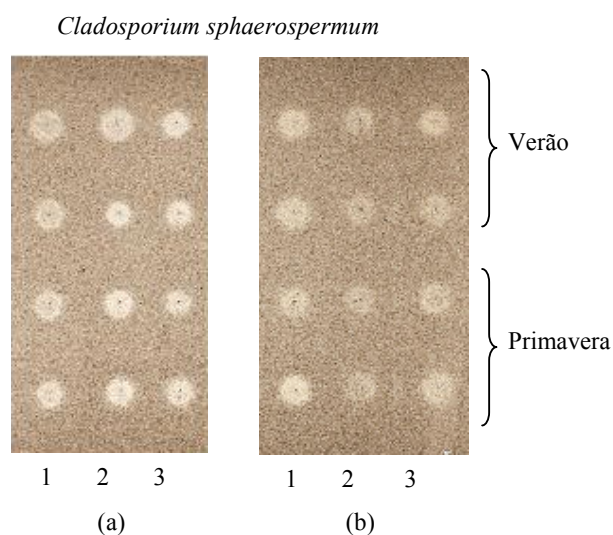


Figura 10. Bioautografia de óleos voláteis folhas dos indivíduos 1, 2 e 3 de *Ocotea nectandrifolia* (a) e *O. puberula* (b), das coletas de primavera e verão.

O fungo filamentosso *Aspergillus niger*, foi mais sensível aos óleos voláteis das duas espécies estudadas quando comparado com o fungo leveduriforme *Candida albicans* (Tabelas

10 e 11). Os óleos voláteis dos indivíduos 2 e 3 de *O. nectandrifolia* tiveram, em média, 80% de inibição frente ao fungo *A. niger* (Tabela 10). A diferença na composição dos óleos voláteis entre os três indivíduos de *O. nectandrifolia* reflete-se, principalmente, na atividade frente ao fungo *Candida albicans*. Quando comparadas as porcentagens de inibição nas diferentes estações do ano, é possível observar que os óleos obtidos para os indivíduos 2 e 3 na primavera e verão, foram mais ativos, 83% em média, contra 45% das estações de outono e inverno. Por outro lado, o óleo do indivíduo 1, que apresenta composição química distinta, foi praticamente inativo.

Tabela 10. Atividade antifúngica de óleos voláteis de folhas de *Ocotea nectandrifolia*, coletadas nas diferentes estações do ano.

Óleo volátil		Inibição (%)					
		Indivíduos			Indivíduos		
		1	2	3	1	2	3
		<i>Aspergillus niger</i>			<i>Candida albicans</i>		
Outono	Início	62,6	77,3	85,7	-	57,9	85,3
	Meio	45,7	82,2	83,2	-	23,2	45,0
Inverno	Início	39,1	74,0	80,3	-	-	44,8
	Meio	60,7	75,4	83,1	-	45,3	16,1
Primavera	Início	57,7	85,5	90,6	-	81,1	98,6
	Meio	50,8	84,0	90,7	-	93,0	91,0
Verão	Início	50,7	89,3	92,4	-	71,2	84,0
	Meio	62,2	91,9	87,6	21,7	100,0	95,6
Controle +		100,0			100,0		

Legenda: (*) não realizado; (-) sem atividade

Os resultados da atividade antifúngica de óleos voláteis de folhas de *Ocotea puberula*, coletadas nas diferentes estações do ano são mostrados na Tabela 11. Não houve variação de atividade entre os indivíduos e entre as estações do ano frente ao fungo *A. niger*. A média da porcentagem de inibição foi de 67%. Para o fungo *C. albicans*, a resposta aos óleos voláteis referente às coletas do indivíduo 2 foi diferente em relação aos demais indivíduos.

Diterpenos e sesquiterpenos apresentam atividade antimicrobiana (Cordell 1995, Braz-

Filho 1999). Atividades fungistática e fungicida, frente a *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. ochraceus* e *Fusarium moniliforme*, foram observadas em óleos voláteis de *Cinnamomum zeylanicum* (Soliman & Badeaa 2002). Hidrocarbonetos monoterpênicos apresentam fraca atividade antifúngica e antibacteriana quando comparados aos compostos oxigenados (Simié *et al* 2004). Espécies de *Candida* foram sensíveis aos óleos voláteis de *C. zeylanicum* e *Peumus boldus* (Lima *et al.* 2006a). Óleos voláteis de *Sida cordifolia* inibiram o crescimento de fungos leveduriformes e filamentosos (Nunes *et al.* 2006). Segundo Lima *et al.* (2006b), eugenol e 4-metil-eugenol, presentes em óleos voláteis de *Pimenta pseudocaryophyllus* podem ser os responsáveis pela atividade antimicrobiana frente *S.aureus* e *C. albicans*. Costantin *et al.* (2001) identificaram α e β -pineno, biciclogermacreno, β -cariofileno, espatulenol e germacreno-D em *Piper cernuum* com atividade antimicrobiana significativa frente a *S. aureus* e *Candida albicans*.

Tabela 11. Atividade antifúngica de óleos voláteis de folhas de *Ocotea puberula*, coletadas nas diferentes estações do ano.

Óleo volátil		Inibição (%)					
		Indivíduos			Indivíduos		
		1	2	3	1	2	3
		<i>Aspergillus niger</i>			<i>Candida albicans</i>		
Outono	Início	76,6	74,3	82,4	72,8	33,9	68,8
	Meio	65,5	68,3	*	-	-	*
Inverno	Início	60,5	49,3	*	-	-	*
	Meio	72,6	65,8	61,8	-	-	-
Primavera	Início	60,8	51,1	60,0	51,7	2,3	33,4
	Meio	72,6	62,9	74,3	-	-	23,1
Verão	Início	76,3	58,7	79,2	49,6	-	75,1
	Meio	71,3	66,9	74,8	72,4	-	66,3
Controle +		100,0			100,0		

Legenda: (*) não realizado; (-) sem atividade

As Tabelas 12 e 13 mostram os resultados dos testes de atividade antibacteriana dos óleos voláteis de *O. nectandrifolia* e *O. puberula*, frente aos microrganismos *Staphylococcus*

aureus (Gram+), *Pseudomonas aeruginosa* (Gram+) e *Escherichia coli* (Gram-). Assim como na composição, a atividade antibacteriana dos óleos de *O. nectandrifolia* variou entre os indivíduos. Os óleos voláteis, de todas as coletas, dos indivíduos 2 e 3 foram mais ativos frente a bactéria *S. aureus*, exceto para a coleta inicial de outono. Para *P. aeruginosa*, os óleos voláteis do indivíduo 1 foram mais ativos que os demais. Praticamente todos os óleos foram inativos frente a *E. coli*.

Tabela 12. Atividade antibacteriana de óleos voláteis de folhas de *Ocotea nectandrifolia*, coletadas nas diferentes estações do ano.

Óleo volátil		Inibição (%)								
		Indivíduos			Indivíduos			Indivíduos		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3
		<i>Staphylococcus aureus</i>			<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			<i>Escherichia coli</i>		
Outono	Início	94,3	66,8	81,7	32,7	20,9	24,4	-	-	-
	Meio	70,9	81,2	77,2	14,1	-	6,9	-	-	-
Inverno	Início	69,2	78,9	81,1	43,5	4,7	-	9,5	-	-
	Meio	87,4	84,5	87,7	17,5	8,7	4,1	-	-	-
Primavera	Início	71,9	92,2	82,9	-	2,9	24,0	-	-	-
	Meio	54,6	95,8	92,9	64,3	17,1	-	-	-	-
Verão	Início	66,4	92,1	88,6	-	-	37,3	-	-	-
	Meio	58,8	82,4	86,9	-	54,4	34,0	-	-	-
Controle +		100,0			100,0			100,0		

Legenda: (*) não realizado; (-) sem atividade

As atividades antibacterianas dos óleos voláteis de folhas de *O. puberula* também apresentaram diferenças entre os indivíduos (Tabela 13), provavelmente em função de variações quantitativas na composição. Com relação à bactéria *S. aureus*, o óleo volátil das folhas do indivíduo 2 coletadas no início de outono, foi o mais ativo com 94,4% de inibição, e o menos ativo foi o referente à coleta de início da primavera do indivíduo 1.

Os óleos voláteis das coletas de meio de verão e início de outono tiveram, em média, 70% de inibição frente à bactéria *P. aeruginosa*. Assim como em *O. nectandrifolia*, os óleos

voláteis de *O. puberula* não foram ativos frente a *E. coli*.

No geral, os óleos voláteis de *Ocotea nectandrifolia*, foram mais ativos que os de *Ocotea puberula* para *Staphylococcus aureus*, porém o contrário foi observado para *Pseudomonas aeruginosa*, e nenhum apresentou atividade frente *E. coli*.

Tabela 13. Atividade antibacteriana de óleos voláteis de folhas de *Ocotea puberula*, coletadas nas diferentes estações do ano.

Óleo volátil		Inibição (%)								
		Indivíduos			Indivíduos			Indivíduos		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3
		<i>Staphylococcus aureus</i>			<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			<i>Escherichia coli</i>		
Outono	Início	80,4	94,4	65,1	85,1	79,2	74,4	-	-	-
	Meio	58,4	76,2	*	-	-	*	-	-	*
Inverno	Início	64,8	65,8	*	39,8	50,0	*	-	-	*
	Meio	66,4	79,5	47,5	32,0	52,1	23,0	-	-	-
Primavera	Início	22,1	85,9	67,2	-	-	-	-	-	-
	Meio	75,3	53,9	47,3	32,8	32,6	44,3	-	-	-
Verão	Início	76,2	68,5	78,1	68,9	33,3	65,0	-	-	-
	Meio	91,0	77,3	67,2	82,1	70,8	69,5	-	-	-
Controle +		100,0			100,0			100,0		

Legenda: (*) não realizado; (-) sem atividade

Bactérias Gram- são menos sensíveis que bactérias Gram+ a ação dos óleos voláteis (Apel *et al.* 2006). Óleos voláteis de folhas de *Cinnamomum filipedicellatum* apresentaram atividade moderada frente a bactérias Gram+ e Gram- (Rameshkumar *et al.* 2006). O monoterpene carvacrol apresenta forte atividade antibacteriana, que pode estar associada a sua estrutura fenólica (Dorman & Deans 2000). Óleos voláteis de *Baccharis trimera*, obtidos de material coletado na primavera e verão, foram menos eficazes na inibição do crescimento de fungos e bactérias (Carreira 2007). Segundo Craveiro *et al.* (1981) α -terpineol, timol, 1,8-cineol e carvacrol apresentam atividade antiséptica e antifúngica. Os sesquiterpenos β -selineno, intermedeol, longiborneol e óxido de cariofileno, foram os principais constituintes

do óleo volátil de *Cinnamomum chemungianum* que apresentou moderada atividade frente às bactérias *S. aureus*, *Salmonella typhi*, *E. coli* e *Klebsiella pneumoniae* (Rameshkumar *et al.* 2007). O mecanismo de ação dos terpenóides em microrganismos não é bem conhecido, mas especula-se que sua ação pode estar associada a um rompimento da membrana pelos compostos lipofílicos (Cowan 1999). O espatulenol, composto majoritário encontrado principalmente nos indivíduos 2 e 3 de *O. nectandrifolia* poderia estar relacionado a atividade antimicrobiana porém, não há relatos na literatura da atividade antimicrobiana do mesmo.

Os resultados da atividade anticolinesterásica dos óleos voláteis de folhas de *O. nectandrifolia* e *O. puberula*, coletadas nas diferentes estações do ano, são mostrados na Tabela 14. Todos os óleos testados foram considerados inativos por apresentarem inibições abaixo de 40%. Monoterpenos são os principais responsáveis pela atividade anticolinesterásica (Miyazawa *et al.* 1997). Em revisão feita por Barbosa-Filho *et al.* (2006) de vinte e sete monoterpenos relatados, dezessete apresentaram atividade anticolinesterásica. Provavelmente, a ausência de atividade inibidora da enzima acetilcolinesterase nos óleos das duas espécies estudadas deve-se aos baixos teores de monoterpenos.

Tabela 14. Atividade anticolinesterásica de óleos voláteis de folhas de *Ocotea nectandrifolia* e *Ocotea puberula*, coletadas nas diferentes estações do ano.

Óleo volátil		Inibição (%)					
		<i>Ocotea nectandrifolia</i>			<i>Ocotea puberula</i>		
		Indivíduos			Indivíduos		
		1	2	3	1	2	3
Outono	Início	8	12	20	13	20	32
	Meio	15	17	20	26	22	40
Inverno	Início	18	20	21	29	27	12
	Meio	2	4	11	15	12	15
Primavera	Início	23	17	22	24	21	30
	Meio	6	11	11	13	10	13
Verão	Início	12	16	22	21	17	20
	Meio	1	9	9	15	9	11
Controle		77			77		

* Amostras são consideradas ativas quando apresentam inibição maior que 40%

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- ✓ Não houve variações no rendimento e na composição dos óleos voláteis nas diferentes estações do ano e fases fenológicas;
- ✓ Os hidrocarbonetos sesquiterpênicos foram os principais constituintes de *Ocotea puberula* e do indivíduo 1 de *Ocotea nectandrifolia*;
- ✓ Não foi observada a presença de monoterpene como composto majoritário;
- ✓ A composição química dos óleos voláteis de *O. nectandrifolia* variou entre os indivíduos;
- ✓ O sesquiterpene espatulenol e o diterpene caureno foram os constituintes majoritários dos indivíduos dois e três de *O. nectandrifolia*, o indivíduo um teve como compostos majoritários os sesquiterpenos 5-hidroxi-cis-calameneno, biciclogermacreno, β -cariofileno, cis-calameneno e espatulenol;
- ✓ Houve variação quantitativa na composição química dos óleos voláteis entre indivíduos de *O. puberula*;
- ✓ Os constituintes majoritários de *O. puberula* foram os sesquiterpenos β -cariofileno, β -elemeno, biciclogermacreno, α -copaeno e α -humuleno;

6. CONCLUSÕES

- ✓ As atividades antimicrobianas dos óleos voláteis frente aos microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aspergillus niger* e *Candida albicans*, foram significativas, porém em concentrações que não justificam sua seleção para o desenvolvimento de novos fármacos, levando-se em conta também que os rendimentos dos óleos obtidos foram baixos;
- ✓ Este é o primeiro estudo realizado com óleos voláteis de *Ocotea nectandrifolia*;
- ✓ O presente trabalho contribuiu para ampliar o conhecimento da composição química dos óleos voláteis de espécies de Lauraceae presentes na Mata Atlântica.

7. RESUMO

Considerado, atualmente, como um dos mais ricos conjuntos de ecossistemas em diversidade biológica do planeta o domínio Mata Atlântica abrange diversas formações florestais. O Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI) é um remanescente de Mata Atlântica localizado entre os municípios de São Paulo e Diadema, em meio a uma área intensamente urbanizada. A família Lauraceae é conhecida por apresentar espécies de grande importância econômica, seja pelo uso da madeira ou emprego na culinária, na medicina popular, entre outros. O uso de plantas aromáticas com propriedades farmacológicas é bastante difundido, em função das atividades antifúngica, repelente, antiinflamatória, anticolinesterásica, analgésica, entre outras, encontradas em seus óleos voláteis. O objetivo deste estudo foi analisar a composição química dos óleos voláteis de folhas de duas espécies de Lauraceae, *Ocotea nectandrifolia* e *Ocotea puberula* com ocorrência no PEFI, durante as diferentes épocas do ano, e avaliar as atividades biológicas dos óleos obtidos através de ensaios antibacteriano, antifúngico e anticolinesterásico. Folhas foram coletadas no início e meio de cada estação, secas à temperatura ambiente e submetidas à extração por hidrodestilação durante quatro horas. Os óleos voláteis obtidos foram analisados por CG-EM para determinação da composição química. A atividade contra os fungos filamentosos *Cladosporium sphaerospermum* e *C. cladosporioides* foi avaliada por bioautografia direta em placas de sílica gel. Para os microrganismos *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, foi utilizada a técnica de diluição em microplaca. A atividade anticolinesterásica foi avaliada por meio do ensaio colorimétrico em microplaca. Os rendimentos médios obtidos foram abaixo do esperado para a família, 0,11% e 0,05% para *O. nectandrifolia* e *O. puberula*, respectivamente. A composição dos óleos voláteis das espécies estudadas não sofreram diferenças durante o período analisado, porém houve diferenças individuais na composição dos óleos voláteis de *O. nectandrifolia*. O sesquiterpeno espatulenol (43%) e o diterpeno caureno (16%) foram os constituintes majoritários dos indivíduos dois e três de *O. nectandrifolia*, o indivíduo um teve como compostos majoritários os sesquiterpenos 5-hidroxi-cis-calameneno (17,19%), biciclogermacreno (11,11%), β -cariofileno (8,47%), cis-calameneno (8,38%) e espatulenol (7,05%). Os constituintes majoritários de *O. puberula* foram os sesquiterpenos β -cariofileno (25,52%), β -elemeno (6,95%), biciclogermacreno (6,68%), α -copaeno (6,61%) e α -humuleno (5,76%). Os óleos voláteis de *O. nectandrifolia* inibiram parcialmente o crescimento dos fungos *C. sphaerospermum* e *C. cladosporioides* e apresentaram atividade moderada frente

aos microrganismos *S. aureus*, *A. niger* e *C. albicans*. Em *O. puberula*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *A. niger* foram mais sensíveis aos óleos testados. Para a atividade anticolinesterásica, todos os óleos testados foram inativos. Esse foi o primeiro relato da composição química e atividades biológicas dos óleos voláteis de *O. nectandrifolia*.

8. ABSTRACT

Seen as one of the richest sets of ecosystems of biological diversity on the planet, the Atlantic Forest covers several forest formations. The “Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI)” is a remnant of Atlantic Forest located between the cities of São Paulo and Diadema, surrounded by a huge urban area. The Lauraceae family is known to have species of great economic importance, either by its wood or for its use in cooking, in folk medicine, among others. The use of aromatical herbs with pharmacological properties is quite widespread, because of known effects like antifungal activity, insect repellent, anti-inflammatory, anticholinesterase activities, analgesic, among others, is found in volatile oils. The aim of this study was to analyze the chemical composition of volatile oils from leaves of two species of Lauraceae, *Ocotea nectandrifolia* and *Ocotea puberula*, located in PEFI, in at different seasons and analyze the biological activities of those oils using antibacterial, antifungal, and anticholinesterase tests. The leaves were collected at the beginning and in at the middle of each season, dried at the room temperature and submitted to hydrodistillation for four hours. The volatile oils were analyzed by GC-MS to determine the chemical composition. The activity against fungi *Cladosporium sphaerospermum* and *C. cladosporioides* were evaluated by the method of direct bioautograph in silica gel thin-layer chromatography. For the following microorganisms, *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*, the dilution method was used. The anticholinesterase activity was studied through the spectrophotometric method. The yields amount of oil obtained was lower than expected for the family, 0.11% and 0.05% for *O. nectandrifolia* and *O. puberula*, respectively. No differences were observed in the oil composition of the species studied during the period, but there were individual differences in the composition of the volatile oils of *O. nectandrifolia*. The sesquiterpene spathulenol (43%) and the diterpene kaurene (16%) were the major constituents of individuals number two and number three of *O. nectandrifolia*, the individual number one had as major compounds sesquiterpenes 5-hydroxy-cis-calamenene (17.19%), bicyclogermacrene (11.11%), β -caryophyllene (8.47%), cis-calamenene (8.38%) and esphatulenol (7.05%). For *O. puberula* we found that the major compounds were the sesquiterpenes β -caryophyllene (25.52%), β -elemene (6.95%), bicyclogermacrene (6.68%), α -copaene (6.61%) e α -humulene (5.76%). The volatile oils of *O. nectandrifolia* partially inhibited the growth of fungi *C. sphaerospermum* and *C. cladosporioides* and showed moderate activity against the microorganisms *S. aureus*, *A. Niger* and *C. albicans*. In *O. puberula*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *A. niger* were more sensitive to the oils tested. For the anticholinesterase activity, all oils

tested were inactive. This was the first report on the chemical and biological activities of the volatile oils of *O. nectandrifolia*.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adam, K. & Zapp, J.** 1998. Biosynthesis of the isoprene units of chamomile sesquiterpens. *Phytochemistry* 48: 953-959.
- Adams, R.P.** 2007. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. 4th Ed. Allured. Illinois.
- Andrade, E.H.A., Carreira, L.M.M., Silva, M.H.L., Silva, J.D., Bastos, C.N., Sousa, J.C., Guimarães, E.F. & Maia, J.G.S.** 2008. Variability in essential oil composition of *Piper marginatum* sensu lato. *Chemistry & Biodiversity* 5: 197-208.
- Apel, M.A., Lima, M.E.L., Souza, A., Cordeiro, I., Young, M.C.M., Sobral, M.E.G., Suffredini, I.B. & Moreno, P.R.H.** 2006. Screening of the biological activity from essential oils of native species from the Atlantic Rain Forest (São Paulo – Brazil). *Pharmacologyonline* 3: 376-383.
- Araujo, A.J., Lordello, A.L.L. & Maia, B.H.L.N.S.** 2001 Análise comparativa dos óleos essenciais de folhas e galhos de *Ocotea puberula* (Lauraceae). *Revista Visão Acadêmica* 2: 81-84.
- Baitello, J.B. & Coe-Teixeira, B.** 1987. Flora Fanerogâmica da Reserva do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (São Paulo, Brasil) *Hoehnea* 14: 63-74.
- Baitello, J.B., Hernandez, F.L., Moraes, P.L.R., Esteves, R., Marcovino, J.R.** 2003. Lauraceae. *In*: Maria das Graças Lapa Wanderley; George John Shepherd; Therezinha Sant'Ana Melhem; Ana Maria Giulietti; Mizué Kirizawa. (Org.). Flora fanerogâmica do Estado de São Paulo – volume 3. RiMa/Fapesp. São Paulo.
- Baratta, M.T., Dorman, H.J.D., Deans, S.G., Biondi, D.M. & Ruberto, G.** 1998. Chemical composition, antimicrobial and antioxidative activity of laurel, sage, rosemary, oregano and coriander essential oils. *Journal of Essential Oil Research* 10: 618-627.
- Barbosa Filho, J.M., Medeiros, K.C.P., Diniz, M.F.F.M., Batista, L.M., Athayde-Filho, P.F., Silva, M.S., Cunha, E.V.L., Almeida, J.R.G.S. & Junior, L.J.Q.** 2006 Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 16: 258-285.

- Barbosa Filho, J.M., Cunha, R.M., Dias, C.S., Athayde-Filho, P.F., Silva, M.S., Cunha, E.V.L., Machado, M.I.L., Craveiro, A.A. & Medeiros, I.A.** 2008 GC-MS Analysis and cardiovascular activity of the essential oil of *Ocotea duckei*. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 18: 37-41.
- Barros, F., Mamede, M.C.H., Melo, M.M.R.F., Lopes, E.A., Jung-Mendaçolli, S.L., Kirizawa, M., Muniz, C.F.S., Makino-Watanabe, H., Chiea, S.A.C. & Melhem, T.S.** 2002. A Flora Fanerogâmica do PEFI: Composição, Afinidades e Conservação *In: Bicudo, D.C.; Forti, M.C.; Bicudo, C.E.M. (eds.) Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI): unidade de conservação que resiste à urbanização de São Paulo.* Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo. São Paulo. pp. 93-110.
- Baruah, A. & Nath, S.C.** 2006. Leaf essential oils of *Cinnamomum glanduliferum* (Wall) Meissn and *Cinnamomum glaucescens* (Nees) Meissn. *Journal of Essential oil Research* 18: 200-202.
- Berg, M.E. Van Den** 1993. Plantas Medicinais na Amazônia: Contribuição ao seu conhecimento sistemático. 2. ed. Museu Paraense Emílio Goeldi. Belém.
- Bouzouita, N., Kachouri, F., Hamdi, M. & Mohamed, M.C.** 2003. Antimicrobial activity of essential oils from Tunisian aromatic plants. *Flavour and Fragrance Journal* 18: 380-383.
- Braz-Filho, R.** 1999. Brazilian phytochemical diversity: bioorganic compounds produced by secondary metabolism as a source of new scientific development, varied industrial applications and to enhance human health and the quality of life. *Pure and Applied Chemistry* 71: 1663-1672.
- Bruneton, J.** 2001. Farmacognosia Fitoquímica Plantas medicinales. 2. ed. Editora Acribia. Zaragoza
- Bruni, R., Medici, A., Andreotti, E., Fantin, C., Muzzoli, M., Dehesa, M., Romagnoli, C., Sacchetti G.** 2004. Chemical composition and biological activities of Ishpingo essential oil, a traditional Ecuadorian spice from *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. (Lauraceae) flower calices. *Food chemistry* 85: 415-421.

- Burbott, A.J., Loomis, W.D.** 1967. Effects of light and temperature on the monoterpenes of peppermint. *Plant Physiology* 42: 20-28.
- Bylaitè, E., Venskutonis, R., Roozen, J. & Posthumus, M.A.** 2000. Composition of essential oil of costmary [*Balsamita major* (L.) Desf.] at different growth phases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 2409-2414.
- Capobianco, J.P.R.** 2001. Dossiê Mata Atlântica. Ipsis. Brasília.
- Carreira, R.C.** 2007 *Baccharis trimera* (Less.) DC. (Asteraceae): estudo comparativo dos óleos voláteis, atividade biológica e crescimento de estacas de populações ocorrentes em áreas de Cerrado e Mata Atlântica. Tese de Doutorado. Instituto de Botânica. São Paulo.
- Carrilho, E., Tavares, M.C.H., Lanças, F.M.** 2001. Fluidos supercríticos em química analítica. I. Cromatografia com fluido supercrítico: conceitos termodinâmicos. *Química Nova* 24: 509-515.
- Carvalho, M.G., Alves, C.C.F., Werle, A.A., Braz-Filho, R.** 2006. Metabólitos especiais isolados de *Laseguea erecta* (Apocynaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia* 16: 497-500.
- Castellani, D.C., Casali, V.W.D., Souza, A.L., Cecon, P.R., Cardoso, C.A. & Marques, V.B.** 2006. Produção de óleo essencial em canela (*Ocotea odorifera* Vell) e guaçatonga (*Casearia sylvestris* Swartz) em função da época de colheita. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* 8: 104-107.
- Chaverri, C. & Cicció, J.F.** 2007 Essential oils from *Ocotea austinii* C. K. Allen (Lauraceae) from Costa Rica. *Journal of Essential Oil Research* 19: 439-443.
- Cheng, S., Liu, J., Tsai, K., Chen, W. & Chang, S.** 2004 Chemical composition and mosquito larvicidal activity of essential oils from leaves of different *Cinnamomum osmophloeum* provenances. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 4395-4400.
- Conservação Internacional Brasil** 2008 <http://www.conservation.org.br/como/index.php> (acesso em 15/02/2008)

- Constantin, M.B., Sartorelli, P., Limberger, R., Henriques, A.T., Steppe, M., Ferreira, M.J.P., Ohara, M.T., Emerenciano, V.P. & Kato, M.J.** 2001. Essential Oils from *Piper cernuum* and *Piper regnellii*: Antimicrobial Activities and Analysis by GC/MS and ¹³C-NMR. *Planta Medica* 67: 771-773.
- Cordel, G.A.** 1995. Changing strategies in natural products chemistry. *Phytochemistry* 40: 1585-1612.
- Correa, P.M.** 1984. Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Imprensa Nacional Rio de Janeiro. Rio de Janeiro.
- Coutinho, D.F., Agra, M.F., Basílio, I.J.L.D. & Barbosa-Filho, J.M.** 2006 Morphoanatomical study of the leaves of *Ocotea duckei* Vattimo (Lauraceae – Lauroideae). *Revista Brasileira de Farmacognosia* 16: 537-544.
- Cowan, M.M.** 1999 Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews* 12: 564-582.
- Craveiro A.A., Fernandes, A.G., Andrade, C.H.S., Matos, F.J.A., Alencar, J.W. & Machado, M.I.L.** 1981. Óleos essenciais de plantas do Nordeste. Edições UFC. Fortaleza.
- Craveiro, A.A. & Machado, M.I.L.** 1986. De aromas, insetos e plantas. *Ciência hoje* 4: 54-63.
- Croteau, R., Kutchan, T. & Lewis N.** 2000. Natural products (secondary metabolites). *In*: Buchanan, B.B., Gruissen, W. & Jones, R.L. (orgs). *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Biologists. Rockville.
- Devienne, K.F. & Raddi, M.S.G.** 2002. Screening for antimicrobial activity of natural products using a microplate photometer. *Brazilian Journal of Microbiology* 33: 166-168.
- Di Stasi, L.C.** 1996. Plantas medicinais: Arte e Ciência. Um guia de estudo interdisciplinar. Ed. UNESP. São Paulo.
- Dorman, H.J.D., & Deans, S.G.** 2000 Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology* 88: 308-315.

- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V.Jr., Featherstone, R.M.**, 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* 7: 88-95.
- Farago, P.V., Budel, J.M., Duarte, M.R. & Nakashima, T.** 2005. Análise morfoanatômica de folhas de *Ocotea puberula* (Rich.) Nees, Lauraceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 15: 250-255.
- Fernandes, A.J., Reis, L.A.M. & Carvalho, A.** 2002. Caracterização do Meio Físico. *In*: Bicudo, D.C.; Forti, M.C.; Bicudo, C.E.M. (eds.) Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI): unidade de conservação que resiste à urbanização de São Paulo. Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo. São Paulo. pp. 51-62
- Fundação SOS Mata Atlântica.** 2007. Disponível em <<http://www.sosma.org.br>> Acesso em Dezembro de 2007.
- Gershebzon, J. & Dudareva, N.** 2007. The function of terpene natural products in the natural world. *Nature Chemical Biology* 3: 408-414.
- Gottlieb, O.R., Koketsu, M., Magalhães, M.T., Maia, J.G.S., Mendes, P.H., Rocha, A.I., Silva, M.L. & Wilberg, V.C.** 1981. Óleos essenciais da Amazônia VII. *Acta Amazonica* 11(1): 143-148.
- Gottlieb, O.R.** 1990 Phytochemicals: differentiation and function. *Phytochemistry* 29: 1715-1724.
- Gottlieb, O.R., Kaplan, M.A.C. & Borin, M.R.M.B.** 1996. Biodiversidade um enfoque químico-biológico. Editora UFRJ. Rio de Janeiro.
- Guenther, E.** 1960a. The essential oils. vol.1. D. Van Nostrand Company. New Jersey.
- Guenther, E.** 1960b. The essential oils. vol.4. D. Van Nostrand Company. New Jersey.
- Harborne, J.B.** 1993. Introduction to ecological biochemistry. 4ed. Academic Press. London.
- Harborne, J.B.** 2001 Twenty-five years of chemical ecology. *Natural Products Reports* 18: 361-379.

- Homans, A.L. & Fuchs, A.** 1970. Direct bioautography on thin-layer chromatograms as method for detecting fungitoxi substances. *Journal of Chromatography* 51: 327-329.
- INPE & SOS Mata Atlântica.** 2006. Atlas dos Remanescentes Florestais do Domínio Mata Atlântica 2000-2005. São Paulo: Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE), São José dos Campos, e Fundação SOS Mata Atlântica.
- Jayaprakasha, G.K., Rao, J.L. & Sakariah, K.K.** (1997) Chemical composition of the volatile oil from the fruits of *Cinnamomum zeylanicum* Blume. *Flavour and Fragrance Journal* 12: 331-333.
- Judd, W.S., Campbell, C.S., Kellogg, E.A., Stevens, P.F.** 1999. *Plant Systematics – a phylogenetic approach*. Sunderland: Sinauer Associates.
- Juergens, U.R., Stober, M. & Vetter, H.** 1998. Inhibition of cytokine production and arachidonic acid metabolism by eucalyptol (1,8-cineole) in human blood monocytes in vitro. *European Journal of Medical Research* 3: 407-412.
- Kaloustian, J., Abou, L., Mikail, C., Amiot, M.J. & Portugal, H.** 2005. Southern french thyme oils: chromatographic study of chemotypes. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85: 2437-2444.
- Kelen, M. & Tepe, B.** 2008. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of the essential oils of three *Salvia* species from Turkish flora. *Bioresource Technology* 99: 4096-4104.
- Kelsey, R.G., Reynolds, G.W. & Rodriguez, E.** 1984. The chemistry of biologically active constituents secreted and stored in plant glandular trichomes. In: Rodriguez E., Healey, P.L. & Mentha, I. (eds) *Biology and chemistry of plant trichomes* Plenum Press.
- Ladeira, A.M.** 2002. Plantas medicinais com óleos essenciais. Governo do Estado de São Paulo. Secretaria de Estado do Meio Ambiente. Instituto de Botânica.
- Lago, J.H.G., Fávero, O.A. & Romoff P.** 2006. Microclimatic factors and phenology influences in the chemical composition of the essential oils from *Pittosporum undulatum* Vent Leaves. *Journal of Brazilian Chemical Society* 17: 1334-1338.

- Lima, I.O., Oliveira, R.A.G., Lima, E.O., Farias, N.M.P. & Souza, E.L.** 2006a Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. Revista Brasileira de Farmacognosia 16: 197-201.
- Lima, M.E.L., Cordeiro, I., Young, M.C.M., Sobral, M.E.G. & Moreno, P.R.H.** 2006b Antimicrobial activity of the essential oil from two specimens of *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L.R. Landrum (Myrtaceae) native from São Paulo State – Brazil. Pharmacologyonline 3: 589-593.
- Lwande, W., Ndakala, A.J., Hassanali, A., Moreka, L., Nyandat, E., Ndungu, M., Amiani, H., Gitu, P.M., Malonza, M.M. & Punyua, D.K.** 1999 *Gynandropsis gynandra* essential oil and its constituents as tick (*Rhipicephalus appendiculatus*) repellents. Phytochemistry 50: 401-405.
- Macchioni, F., Perucci, S., Cioni, P., Morelli, I., Castilho, P. & Cecchi, F.** 2006. Composition and acaricidal activity of *Laurus novocanariensis* and *Laurus nobilis* essential oils against *Psoroptes cuniculi*. Journal of Essencial Oil Research 18: 111-114.
- Marques, C.A.** 2001. Importância econômica da família Lauraceae Lindl. Revista Floresta e Ambiente 8: 195-206.
- Maul, A.A., Wasicky, R. & Bacchi, E.M.** 1996. Extração por fluido supercrítico. Revista Brasileira de Farmacognosia 5: 185-200.
- May, P.H. & Barata, L.E.S.** 2004. Rosewood exploitation in the Brazilian Amazon: Options for sustainable production. Economic Botany 58: 257-265.
- Menut, C., Bessiére, J.M., Hassani, M.S., Buchbauer, G. & Schopper, B.** 2002 Chemical and biological studies of *Ocotea comoriensis* bark essential oil. Flavour and Fragrance Journal 17: 459-461.
- Metcalfe, C.R. & Chalk, L.** 1950. Anatomy of the Dicotyledons vol II. Oxford at the Clarendon Press.

- Mirjana, S., Nada, B. & Valerija, D.** 2004. Variability of *Satureja cuneifolia* Ten. Essential oils and their antimicrobial activity depending on the stage of development. *European Food Research and Technology* 218: 367-371.
- Miyazawa, M., Watanabe, H., Umemoto, K. & Kameoka, H.** 1997 Inhibition of acetylcholinesterase activity by monoterpeneoids with a p-Menthane skeleton. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 45: 677-679.
- Miyazawa, M., Watanabe, H., Umemoto, K. & Kameoka, H.** 1998 Inhibition of acetylcholinesterase activity by essential oils of *Mentha* species. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 46: 3431-3434.
- Moreira, A.C.P., Lima, E.O., Souza, E.L., van Dingenen, M.A. & Trajano, V.N.** 2007 Inhibitory effect of *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Lauraceae) essential oil and β -pinene on the growth of dematiaceous moulds. *Brazilian Journal of Microbiology* 38: 33-38.
- Myers, N., Mittermeier, R.A., Mettermeier, C.G., Fonseca, G.A.B. & Kent, J.** 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853-858.
- Nath, S.C., Baruah, A. & Kanjilal, P.B.** 2006. Chemical composition of the leaf essential oil of *Cinnamomum pauciflorum* Nees. *Flavour and Fragrance Journal* 21: 531-533.
- Nunes, X.P., Maia, G.L.A., Almeida, J.R.G.S., Pereira, F.O. & Lima, E.O.** 2006 Antimicrobial activity of the essential oil of *Sida cordifolia* L. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 16: 642-644.
- Oliveira, S.M.M. & Jose, V.L.A.** 2007. Processos de extração de óleos essenciais. Dossiê Técnico. Paraná. Instituto de Tecnologia do Paraná.
- Onayade-Sontan, O.A.** 1991 Analysis of the Essential Oil of Some medicinal Plants Used in Traditional Medicine in Nigeria. Tese de doutorado. Universidade de Leiden, Holanda.
- Pino, J.A., Marbot, R., Payo, A., Chão, D., Herrera, P.** 2006. Aromatic plants from western Cuba VII. Composition of the leaf oils of *Psidium wrightii* Krug et Urb., *Lantana*

- involucrate* L., *Cinnamomum montanum* (Sw.) Berchtold et J. Persl. And *Caesalpinia violaceae* (Mill.) Standley. Journal of Essential oil Research 18: 170-174.
- Pivello, V.R. & Peccinini, A.A.** 2002. A vegetação do PEFI *In*: Bicudo, D.C.; Forti, M.C.; Bicudo, C.E.M. (eds.) Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI): unidade de conservação que resiste à urbanização de São Paulo. Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo. São Paulo. pp. 75-92
- Rahalison, L., Hamburger, M., Monod, M., Frenk, E. & Hostettmann, K.** 1994. Antifungal tests in phytochemical investigations comparison of bioautographic methods using phytopatogenic and human pathogenic fungi. *Planta Medica* 60: 41-44.
- Rameshkumar, K.B., George, V. & Shiburaj, S.** 2006 Chemical constituents and antimicrobial activity of the leaf oil of *Cinnamomum filipedicellatum* Kostern. *Journal of Essential Oil Research* 18: 234-236.
- Rameshkumar, K.B., George, V. & Shiburaj, S.** 2007 Chemical constituents and antibacterial activity of the leaf oil of *Cinnamomum chemungianum* Mohan et Henry. *Journal of Essential Oil Research* 19: 98-100.
- Rasooli, I. & Abyaneh, M.R.** 2004. Inhibitory effects of Thyme oils on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Food Control* 15: 479-483.
- Rhee, I.K., Meent, M., Ingkaninan, K., Verpoorte, R.,** 2001. Screening for acetylcholinesterase Inhibitors from Amaryllidaceae using sílica gel thinlayer chromatography in combination with bioactivity staining. *Journal of chromatography* 915 : 217-223.
- Rizzini, C.T. & Mors, W.B.** 1995 *Botânica Econômica Brasileira* Editora Âmbito Cultural Edições. Rio de Janeiro.
- Rizzini, C.T.** 1997. *Tratado de fitogeografia do Brasil: aspectos ecológicos, sociológicos e florísticos.* Âmbito Cultural Edições. Rio de Janeiro.
- Salie, F., Eagles, P.F.K., Leng, H.M.J.** 1996, Preliminary antimicrobial screening of four South African Asteraceae species. *Journal of Ethnopharmacology* 52: 27-33.

- Santos, P.M. & Funari, F.L.** 2002. Clima Local *In*: Bicudo, D.C.; Forti, M.C.; Bicudo, C.E.M. (eds.) Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI): unidade de conservação que resiste à urbanização de São Paulo. Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo. São Paulo. pp. 29-48.
- Santos, A.S., Alves, S.M., Figueiredo, F.J.C. & Neto, O.G.R.** 2004. Descrição de sistema e de métodos de extração de óleos essenciais e determinação de umidade de biomassa em laboratório. Comunicado técnico 99. Belém. Embrapa Amazônia Oriental.
- Schaffer, W.B. & Prochnow, M.** 2002. *In*: Schaffer, W.B., Prochnow, M. (eds.). A Mata Atlântica e você. Como preservar, recuperar e se beneficiar da mais ameaçada floresta brasileira. Ipsis, Brasília.
- Silva, J., Abebe, W., Sousa, S.M., Duarte, V.G., Machado, M.I.L., & Matos, F.J.A.** 2003. Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of Eucalyptus. *Journal of Ethnopharmacology* 89: 277-283.
- Silva, M.G.V., Craveiro, A.A., Matos, F.J.A., Machado, M.I.L. & Alencar, J.W.** 1999. Chemical variation during daytime of constituents of the essential oil of *Ocimum gratissimum* leaves. *Fitoterapia* 70: 32-34.
- Simié, A., Soković, M.D., Ristić, M., Grujić-Jovanović, S., Vukojević, J. & Marin, P.D.** 2004. The chemical composition of some Lauraceae essential oils and their antifungal activities. *Phytotherapy Research* 18: 713-717.
- Simões, C.M.O. & Spitzer, V.** 2003. Óleos Voláteis. *In*: Simões, C.M.O., Schenkel, E.P., Gosmann, G., Mello, J.C. P., Mentz, L.A. & Petrovick, (orgs). *Farmacognosia da planta ao medicamento*. Florianópolis: Ed. UFSC. p.467
- Soliman, K.M. & Badeaa, R.I.** 2002. Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. *Food and Chemical Toxicology* 40: 1669-1675.
- Souza, K.S., Chaar, J.S., Oliveira, K.M.T., Gomes, E.O., Portela, C.N., Pohlit, A.M., Quinhad, E.L.J., Nunomura, S.M., Tadei, W.P., Mouchrek Filho, V.E., Silva, D.D., Galhiane, M.S. & Chierice, G.O.** 2007. Atividade biológica de extratos, hidrolatos e óleos voláteis de pau rosa (*Aniba duckei* Kostermans) e quantificação do linalol no hidrolato de folhas. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais* 9: 1-7.

- Tabarelli, M. & Mantovani, W.** 1999. A riqueza de espécies arbóreas na floresta atlântica de encosta no estado de São Paulo (Brasil). *Revista Brasileira de Botânica* 22: 217-223.
- Takaku, S., Haber, W.A. & Setzer, W.N.** 2007 Leaf essential oil composition of 10 species of *Ocotea* (Lauraceae) from Monteverde, Costa Rica. *Biochemical Systematics and Ecology* 35: 525-532.
- Taveira, F.S.N., Lima, W.N., Andrade, E.H.A. & Maia, J.G.S.** 2003. Seasonal essential oil variation of *Aniba canelilla*. 2003. *Biochemical Systematics and Ecology* 31: 69-75.
- Thompson, J.D., Chalchat, J.C., Michet, A., Linhart, Y.B. & Ehlers, B.** 2003. Qualitative and quantitative variation in monoterpene co-occurrence and composition in the essential oil of *Thymus vulgaris* chemotypes. *Journal of Chemical Ecology* 29: 859-880.
- Tortora, G.J., Funke, B.R. & Case, C.L.** 2000 *Microbiologia*. Artes Médicas Sul, Porto Alegre.
- Wanderley, M.G.L., Shepherd, G.J., Giulietti, A.M. & Melhem, T.S.** 2003. Flora fanerogâmica do Estado de São Paulo – volume 3. RiMa/Fapesp. São Paulo.
- Willinger, B., Apfalper, P., Hirschl, A.M., Makristathis, A., Rotter, M., Seibold, M.** 2000. Suceptibility testing of *Candida* species: comparison of NCCLS microdilution method with Fungitest[®]. *Diagnostic Microbiology and Infectious disease* 38: 11-15.
- Zellner, B.A., Presti, M.L., Barata, L.E.S., Dugo, P., Dugo, G. & Mondello, L.** 2006 Evaluation of leaf-derived extracts as na environmentally sustainable source of essential oils by using gás chromatography-mass spectrometry and enantioselective gás chromatography-olfactometry. *Analytical Chemistry* 78: 883-890.
- Zoghbi, M.G.B., Andrade, E.H.A., Santos, A.S., Silva, M.H.L & Maia, J.G.S.** 1998. Essential oils of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br growing wild in the Brazilian Amazon. *Flavour and Fragrance Journal* 13: 47- 48.

10. ANEXO

Tabela 15. Índices de Kovats (Adams 2007) dos constituintes dos óleos voláteis de folhas de *Ocotea nectandrifolia* e *O. puberula*.

Composto	Índice de Kovats
Alfa Pineno	939
Beta Pineno	979
Mirceno	990
Limoneno	1029
Beta Felandreno	1029
1,8 Cineol	1031
Gama Terpineno	1059
N-nonanal	1100
Mirtenal	1195
Delta elemeno	1338
Alfa Cubebeno	1348
Alfa Copaeno	1374
Beta Cubebeno	1388
Beta Elemeno	1390
Z-Cariofileno	1408
Alfa Gurjuneno	1409
Beta Cariofileno	1419
Alfa Ionona	1430
Beta Copaeno	1432
Alfa Guaieno	1439
Aromadendreno	1441
6,9 guaiadieno	1444
Trans muurola-3,5-dieno	1453
Alfa Humuleno	1454
Geranil Acetona	1455
Aloaromadendreno	1462
Trans-Cadina-1(6),4-diene	1476
Gama Muuroleno	1479
Alfa Amorfenno	1484
Germacrene-D	1485
Beta Ionona	1488
Beta selineno	1490
Biciclosesquifelandreno	1493
Valenceno	1496
Biciclogermacreno	1500
Alfa muuroleno	1500

continua...

Gama Patchouleno	1502
Trans Beta Guaiano	1502
Alfa Bulneseno	1509
Delta Amorfenol	1512
Gama Cadineno	1513
Delta Cadineno	1523
Cis Calameneno	1529
Trans Cadina 1,4-dieno	1534
Alfa Calacoreno	1545
Elemol	1549
Trans Dauca-4(11),7dieno	1557
Germacreno B	1561
Nerolidol	1563
Cariofilenil alcool	1572
Espatuleno	1578
Globulol	1590
Guaiol	1600
Beta atlantol	1608
Epoxido de Humuleno II	1608
1-10-di-epi Cubenol	1618
Alfa Corocaleno	1623
10 epi gama eudesmol	1623
1 epi cubenol	1628
Murola-4,10(14)-dien-1-beta-ol	1631
Gama eudesmol	1632
Cariofila-4(12),8(13)-dien-5beta-ol	1640
Heptan-2-ona	1640
Alfa Murolol	1646
Cubenol	1645
Beta eudesmol	1650
Alfa Cadinol	1654
Valerianol	1658
14-hidroxi-cariofileno	1667
Trans Calamenen-10-ol	1669
14-hidroxi-9-epi-cariofileno	1669
Bulnesol	1671
Mustacona	1677
Khusinol	1680
Acetato de Elemol	1680
(2Z,6Z) Farnesol	1698
Epi Nootkatol	1699
Eudesm-7(11)-en-4-ol	1700
Heptadecane	1700

continua...

Amorfa-4,9-dien-2-ol	1700
Thujopsenal	1709
5-hidroxi-cis-Calameneno	1713
Acetato de guaíol	1726
Isobiciclogermacrenal	1734
Mint sulfide	1741
14-oxi-alfa-Muuroleno	1768
14 hidroxi delta cadineno	1803
5E,9Z Farnesil Acetona	1887
Ent - Rosa-5,15-dieno	1934
Caureno	2043
Fitol acetato	2218
Tricosano	2300
Tetracosano	2400
Pentacosane	2500
Hexacosano	2600
Heptacosano	2700

Fórmula utilizada para o cálculo do índice de retenção (I.R.).

$$I = \frac{100z + 100(\log t'_{RX} - \log t'_{RZ})}{(\log t'_{R(Z+1)} - \log t'_{RZ})}$$

Onde: z = número de átomos de carbono com menor peso molecular.

t'_{RX} = tempo de retenção do composto x, sendo que t'_{RX} é intermediário a t'_{RZ} e $t'_{R(Z+1)}$.

t'_{RZ} e $t'_{R(Z+1)}$ = tempos de retenção ajustados de alcanos de cadeia normal.