

**Estudo do óleo essencial de *Ocotea corymbosa* (Meisn.) Mez (Lauraceae).**

***Study of the essential oil of *Ocotea corymbosa* (Meisn.) Mez (Lauraceae).***

*Gabriela G. Santiago<sup>1</sup>, Márcia O. M. Marques<sup>2</sup>, Jordany A. de O. Gomes<sup>3</sup>, Filipe P. G. Bonfim<sup>3</sup>.*

*<sup>1</sup>Centro Universitário do Sagrado Coração – UNISAGRADO- Bauru, Brasil.*

*<sup>2</sup>Instituto Agronômico de Campinas- IAC - Campinas, Brasil.*

*<sup>3</sup>Faculdade de Ciências Agronômicas- UNESP – Botucatu, Brasil.*

E-mail (autor principal): *gabigodoysan@gmail.com; marcelo.telascree@unisagrado.edu.br*

## RESUMO

Óleos essenciais (OE) são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas, obtidas através de materiais vegetais, tais como folhas, galhos, flores, frutos, sementes, raízes e madeira. Na natureza esses componentes desempenham um papel importante na proteção das plantas; isso porque são capazes de atuar como antibacterianos, antivirais, antifúngicos e inseticidas. Além de sua contribuição para as plantas, muito desses óleos apresentam também outras propriedades como atividades antioxidantes, ações analgésicas e anti-inflamatórias fazendo-se relevantes para produtos industriais farmacêuticos, agrícolas, nutricionais ou cosméticos. Devido aos benefícios que os óleos etéreos podem oferecer aos seres vivos, este projeto de iniciação científica dedica-se a estudar, três amostras de óleo essencial de folhas de *Ocotea corymbosa* presentes nas cidades de Bauru/SP, São Manuel/SP e Botucatu/SP. Através de um levantamento de referências bibliográficas, livros, teses, artigos científicos nacionais e internacionais, foi possível executar a elaboração da proposta científica, realizando análises por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM) e por cálculos de índices de retenção, pretendendo comparar e identificar as substâncias encontradas com bases de dados confiáveis de identificação.

**Palavras-chave:** Cromatografia Gasosa, Índice de Retenção, NIST 62, *Ocotea* ssp.

## ABSTRACT

*Essential oils (EO) are complex mixtures of volatile, lipophilic, generally odorous and liquid substances, obtained from plant materials such as leaves, branches, flowers, fruits, seeds, roots and wood. In nature these components play an important role in plant protection; This is because they are capable of acting as antibacterial, antiviral, antifungal and insecticides. In addition to their contribution to plants, many of these oils also have other properties such as antioxidant activities, analgesic and anti-inflammatory actions, making them relevant for pharmaceutical, agricultural, nutritional or cosmetic industrial products. Due to the benefits that etéreas oils can offer to living beings, this scientific initiation project is dedicated to studying three samples of essential oil from *Ocotea corymbosa* leaves present in the cities of Bauru/SP, São Manuel/SP and Botucatu/SP. Through a survey of bibliographical references, books, theses, national and international scientific articles, it was possible to carry out the elaboration of the scientific proposal, carrying out analyzes by Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (GC-MS) and by calculations of retention rates, intending to compare and identify the substances found with reliable identification databases.*

**Keywords:** *Gas Chromatography, NIST 62, *Ocotea* spp, , Retention Index.*

## INTRODUÇÃO

### **Óleos Essenciais**

A utilização dos óleos essenciais percorre há milênios; encontram-se vestígios e documentos do manuseio dessas substâncias desde 4500 a.C. pelos egípcios em cerimônias e rituais em templos e em pirâmides. O termo “óleo essencial” surgiu somente no século XVI pelo médico Paracelsus von Hohenheim, que nomeou de “quinta essentia” o componente de uma droga. (TELACREA, 2008; EDRIS, 2007).

De forma ampla, esses componentes são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas, obtidas através de materiais vegetais, tais como folhas, galhos, flores, frutos, sementes, raízes e madeira. A extração dos óleos etéreos, como também são

chamados, é feita de várias formas como por expressão, fermentação e extração com gordura animal. Contudo, o método mais aplicado para a produção comercial é o de destilação a vapor ou arraste a vapor. (SIMÕES et al., 2016; SHARIFI-RAD et al., 2017; IRITI et al., 2006; VAN de BRAAK e LEIJTEN, 1999; BURT, 2004).

Existem cerca de 3000 óleos essenciais já conhecidos. Destes, apenas 10 % possuem alguma importância comercial, principalmente para as indústrias farmacêuticas, agrônômicas, alimentícias, sanitárias, cosméticas e de perfumaria. Conhecidos por suas propriedades antissépticas, isto é, bactericidas, virucidas e fungicidas, e medicinais e sua fragrância, eles são usados no embalsamamento, preservação de alimentos e como remédios antimicrobianos, analgésicos, sedativos, anti-inflamatórios, espasmolíticos e anestésicos locais. Até os dias de hoje, essas características não mudaram muito, exceto que agora se sabe mais sobre alguns de seus mecanismos de ação, particularmente no nível antimicrobiano (VAN de BRAAK e LEIJTEN, 1999; BURT, 2004; BAKKALI et al., 2008).

### ***Metabolismo secundário das plantas***

O metabolismo da planta varia de acordo com sua fisiologia, mas geralmente pode ser dividido em metabolismo primário e secundário. O metabolismo primário é comumente associado à sobrevivência da planta, já que é constituído por compostos como proteínas lipídeos, materiais genéticos e açúcares; possuindo função estrutural, plástica e de armazenamento de energia. Entretanto, as plantas produzem algumas substâncias que não possuem vínculo com o seu crescimento ou com o seu desenvolvimento, esses, foram 6 nomeados de Metabólitos secundários. (VIZZOTTO et al., 2010; KERBAUY, 2004; TAI, ZEIGAR, 2009; DE SOUSA et al., 2017).

Uma vez que o metabolismo primário se associa à sobrevivência, o secundário associa-se à defesa; eles protegem as plantas de seus predadores, tais como: insetos, vírus, bactérias, fungos e até mesmo contra outras plantas, além de contribuir com a perpetuação da espécie por atrair animais polinizadores e dispersores de semente. (BORGES, 2013).

Muitos metabólitos secundários já foram identificados, dentre eles, um grupo em particular, compreendendo terpenóides, fenilpropanóides, policetídeos e compostos contendo nitrogênio e enxofre, foram chamados de óleos essenciais. Embora esse nome tenha sido utilizado para descrever esse grupo heterogêneo, a nomenclatura define as moléculas extraídas das plantas, que são chamadas atualmente de “compostos orgânicos voláteis”. (SIMÕES et al., 2016).

Os terpenos formam classes estrutural e funcionalmente diferentes. Eles são feitos de combinações de várias unidades de base de carbono (C5) chamadas de isopreno. A biossíntese dos terpenos consiste na síntese do precursor de isopentenil difosfato (IPP), adição repetitiva de IPPs para formar o precursor de prenildifosfato das várias classes de terpenos, modificação do prenildifosfato alílico por sintetases específicas de terpeno para formar o esqueleto de terpeno e, finalmente, modificação enzimática secundária (reação redox) do esqueleto para atribuir propriedades funcionais aos diferentes terpenos. Os principais terpenos são os monoterpenos (C10) e sesquiterpenos (C15), mas também existem hemiterpenos (C5), diterpenos (C20), triterpenos (C30) e tetraterpenos (C40). Um terpeno contendo oxigênio é denominado terpenóide. Os monoterpenos são formados a partir do acoplamento de duas unidades de isopreno (C10). São as moléculas mais representativas que constituem 90% dos óleos essenciais e permitem uma grande variedade de estruturas (WAR et al., 2012; WAR et al., 2011; DE MORAIS, 2009; BAKKALI et al., 2008)

### ***Funções biológicas dos óleos essenciais***

Na natureza os óleos essenciais desempenham um papel importante na proteção das plantas. Isso porque seus componentes são capazes de atuar como antibacterianos, antivirais, antifúngicos, inseticidas, e o aroma exalado são capazes de reduzir o apetite de seu predador por ela. Além de sua contribuição para as plantas, muito desses óleos apresentam também outras propriedades como atividades antioxidantes, ações analgésicas e anti-inflamatórias e atividades antitumorais que podem, se estudadas e manipuladas, oferecer muitos benefícios a outros seres vivos. (BAKKALI et al., 2008; MENDES et al., 2010; WANNES, 2010).

Dor é uma experiência desagradável pela qual se pode passar ao longo da vida, na expectativa de aliviar e amenizar esse sintoma, popularmente é realizado o consumo de analgésicos. Entretanto o consumo desses medicamentos tem potencial para acarretar outros efeitos colaterais, como no caso da morfina, gerar distúrbios endócrinos e do sistema nervoso autônomo, náusea, sonolência e depressão respiratória. Buscar alternativas que tivessem menores efeitos colaterais, porém com analgesia semelhante se fez necessária; nesta busca encontraram-se vários óleos essenciais com propriedades analgésicas, dentre eles destaca-se o óleo de *Rosmarinus officinalis* L (Lamiaceae)

(alecrim) que pode ser utilizado como analgésico leve para aliviar cólicas renais, distúrbios respiratórios e dismenorreia. (DE OLIVEIRA ARAÚJO et al. 2021).

A quimioterapia, um dos mais conhecidos tratamentos do câncer, possui na maioria de suas composições drogas citotóxicas, que podem levar a efeitos colaterais graves em células normais o que limita a utilização da droga de forma eficaz sobre a doença. Devido ao potencial terapêutico dos óleos essenciais, pesquisadores passaram a testá-los contra câncer, aproveitando-se do fato de seu mecanismo de ação ser diferente daquele do citotóxico clássico. Posteriormente, relatórios indicaram que principalmente um grupo de seus componentes, os monoterpenos, portam diversos efeitos no metabolismo do mevalonato o qual é encarregado pela supressão de tumores terpenos. (EDRIS, 2007).

Trombose é uma doença geralmente associada à ativação plaquetária e pela liberação de eicosanoides. Os métodos preventivos como os agentes antiplaquetários se mostram muito eficazes quanto essa patologia, contudo, muitos desses medicamentos contêm consequências prejudiciais ao organismo como erosões gástricas e agranulocitose. Por esta razão, alternativas foram avaliadas e encontraram no óleo essencial de lavanda (*Lavandula hybrida* Reverchon cv.) um grande potencial antitrombótico, mostrando efeito antiplaquetário do espectro e foi capaz de inibir agregações plaquetárias induzidas por ADP, ácido araquidônico, colágeno e o agonista estável do receptor de tromboxano sem propriedades pró-hemorragicas. (BALLABENIA et al., 2004; EDRIS, 2007).

*Staphylococcus aureus* são bactéria do grupo dos cocos gram-positivos que fazem parte da microbiota humana, mas que podem gerar prejuízos e riscos à saúde humana provocando doenças que vão desde uma infecção simples como espinhas, até as mais graves como pneumonia. Isto ocorre devido à capacidade que este micro-organismo possui de adquirir genes que codificam a produção de biofilmes, toxinas e, principalmente resistência a antimicrobianos. Com isso, torna-se muito importante encontrar métodos alternativos para o combate desse patógeno. Muitos óleos essenciais e seus compostos demonstraram eficácia na inibição do crescimento microbiano. Este efeito decorre de uma intervenção na permeabilidade da membrana citoplasmática, interferindo em sistemas enzimáticos e constituintes celulares, proporcionando-o potencial para destruir ou inativar o material genético da bactéria assim como gerar lises em sua parede celular; dentre esses óleos destaca-se o de tomilho (*Thymus vulgaris*). (FANIN et al., 2020; SANTOS et al., 2007).

Repelentes são produtos utilizados para evitar picadas de insetos e geralmente agem formando uma barreira de vapor sobre a pele que impede que o artrópode pouse sobre ela. O uso de repelentes sintéticos pode causar danos ambientais e riscos para a saúde humana (PITASAWAT et al., 2003). Tal fato incentivou a busca por repelentes naturais e ecológicos, oriundos, por exemplo, dos óleos essenciais, no entanto, devido ao caráter volátil desses óleos os repelentes poderiam possuir uma vida curta na sua eficácia. Posteriormente, estudando o óleo de *Cymbopogon winterianus* spp, concluíram que o mesmo misturado com 5% de vanilina resulta em um produto com 100% de proteção contra o *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus* e *Anopheles dirus* por 6 horas. (TAWATSIN et al., 2001; NERIO; OLIVERO-VERBEL e STASHENKO, 2010).

### **Extração do óleo essencial**

Muitas técnicas convencionais podem ser usadas para amostrar a fração volátil: destilação a vácuo, destilação a vapor ou hidrodestilação, extração de solvente *off-line* combinada com destilação, extração simultânea de destilação, extração com fluido supercrítico e micro-ondas assistida por amostragem e hidrodestilação assistida por micro-ondas e amostragem de *headspace* de alta capacidade de concentração. Deve-se ressaltar novamente que somente o produto obtido por hidrodestilação ou destilação a vapor pode ser chamado de óleo essencial. O material deve ser fresco, porém sugere-se o seu congelamento com N<sub>2</sub> líquido, sendo posteriormente triturado com um almofariz e pistilo de porcelana. Esse processo garantirá a integridade do óleo na matriz vegetal (TELASCREA et al., 2008, RUBIOLO et al., 2010).

### **Hidrodestilação**

Um óleo essencial é classicamente obtido usando equipamentos baseados no processo de destilação introduzida por Clevenger (1928a; 1928b). Em teoria, as recuperações de voláteis são quantitativas para um tempo de destilação infinito; artefatos ou substâncias de degradação térmicas ou oxidativa podem ser produzidos, mas eles são aceitos como resultado de um processo tradicional. Aparelhos e modos de operação para obter óleos essenciais estão bem estabelecidos e são descritos em várias farmacopeias. A Farmacopeia Brasileira (Vol. 02) indica que se deve proceder utilizando um balão de 1 L contendo 500 mL de água como líquido de destilação. A droga (planta), previamente triturada, deve ser colocada com 100 mL de água. Após isso, deve-se transferir imediatamente para

o balão e proceder a hidrodestilação a partir de 50 g da droga durante 4 horas. O óleo essencial obtido deve ser mantido a  $-18^{\circ}\text{C}$  e em frasco de vidro âmbar (para evitar fotodegradação) e sob ambiente  $\text{N}_2$  até sua análise (BRASIL, 2010; TELASCREA et al., 2008).

Existem três variações diferentes do processo de destilação com água/vapor: destilação com água (hidrodestilação), destilação com água e vapor e destilação a vapor. Na hidrodestilação, a planta aromática permanece em contato com a água fervente, podendo estar completamente imersa ou flutuando. Já na destilação com água e vapor, o material a ser destilado é apoiado sobre uma placa perfurada ou inserida em uma rede e colocada logo acima do fundo do destilador. Por último, na destilação a vapor, a água não é mantida na parte inferior do destilador e o vapor é introduzido através de serpentinas. No processo de destilação de óleo essencial, é necessário, em alguns casos, realizar fragmentações do material vegetal, com o intuito de facilitar a remoção do óleo dos tricomas glandulares da planta. Este procedimento varia de acordo com a estrutura da planta. Flores, folhas e outras partes finas e não fibrosas não necessitam de fragmentação. As sementes devem ser completamente esmagadas. Raízes, caules e todo o material lenhoso precisam ser cortados em comprimentos curtos (BUSATO et al., 2014).

### ***Análises do óleo essencial***

Uma separação exaustiva de óleo essencial por cromatografia gasosa (CG) pode, preferencialmente, ser obtida combinando duas fases. A análise de uma amostra de óleo essencial envolve, geralmente, a separação, identificação e determinação quantitativa de seus componentes. A volatilidade e polaridade dos componentes do óleo essencial fazem da cromatografia gasosa capilar a técnica de escolha para sua análise, pois estacionárias de polaridade diferente. As fases estacionárias apolares mais utilizadas na análise de rotina de óleo essencial são, em geral, aquelas baseadas em metilpolissiloxanos, metilfenilpolissiloxanos e como fase polar mais comum a de polietilenoglicol. A identificação é geralmente realizada por dados cromatográficos (índices de Kovat's, índices de retenção lineares, tempo de retenção relativo, tempo de retenção), mensuráveis com um detector universal como o detector FID (detector de ionização de chama) ou por dados espectrais, principalmente, por técnicas infenadas como espectrometria de massa (CG-EM), como recomendam a *International Organization of the Flavor Industry* (IOFI) e o *Journal of Agricultural and*

*Food Chemistry* (RUBIOLO et al., 2010). A espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) também é proposta como um detector para detecção de óleos essenciais (GC-FT-IR) (HERRES, 1987; BICCHI et al., 2004; MARRIOTT, SHELLIE e CORNWELL, 2001).

A utilização da Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (CG-EM), ainda permite a obtenção de espectros de massas dos picos cromatográficos através da análise dos íons totais (TIC) e esses podem ser comparados com uma base de dados, como a NIST 62 (*National Institute of Standards and Technology*) que serve como um parâmetro de comparação e dessa forma permite a identificação mais correta dos componentes (ADAMS, 2012).

Uma aplicação direta do uso dos índices de retenção e dos espectros de massa na identificação de componentes de óleos essenciais é o trabalho realizado por TELASCREA e colaboradores (2008) que estudaram os óleos essenciais de folhas de quatro *Cryptocarya* spp endêmicas na Mata Atlântica no Estado de São Paulo. Os principais componentes do óleo de *Cryptocarya moschata* foram identificados como sendo linalol (34,3%),  $\alpha$ -terpineno (17,0%),  $\gamma$ -terpineno (10,4%), 1,8-cineole (5,8%) e trans-ocimeno (4,8%), enquanto os de *C. botelhensis* foram  $\alpha$ -pineno (22,7%),  $\beta$ -pineno (9,2%), trans-verbenol (8,4%), trans-pinocarveol (5,5%) e myrtenal (5,4%). Os principais compostos do óleo de *C. mandioccana* foram  $\beta$ -cariofileno (13,8%), espatulenol (10,2%), óxido de cariofileno (7,8%),  $\delta$ -cadineno (6,9%) e biciclogermacreno (6,4%), enquanto os de *C. saligna* foram germacreno D (15,5%), biciclogermacreno (13,8%), espatulenol (11,8%) e germacreno B (5,7%).

A partir de análises realizadas, utilizando-se um espectrômetro de massa acoplado ao cromatógrafo gasoso com programação de temperatura seguindo dados da literatura, ADAMS (1995), e obtenção de espectros de massa, pode-se identificar os componentes acima comparando com as referências da biblioteca NIST 62 (MCLAFFERTY e STAUFFER, 1989) e suas porcentagens relativas foram calculadas a partir das áreas de pico normalizadas. Os índices de retenção (VAN DEN DOOL, 1963) foram determinados em relação aos tempos de retenção de uma série de padrões de *n*-alcano (C-10 a C-30), medidos nas mesmas condições cromatográficas descritas acima e comparados com os valores publicados (ADAMS, 1995).

A demanda por análises mais rápidas de GC está aumentando. Embora investigado desde o início dos anos 60, o GC de alta velocidade (eficiência) foi usado apenas para análise de óleos essenciais de rotina nas últimas décadas. A maneira mais fácil de acelerar uma separação de GC é

reduzir o comprimento da coluna, mantendo a sua resolução (separação) suficiente (CRAMERS et al., 1999; DAVID et al., 1999).

Os vários aspectos teóricos e práticos envolvidos com a análise por GC rápida foram revisados por CRAMERS e colaboradores (1999). Duas abordagens foram propostas para acelerar a análise de um óleo essencial. A primeira e mais amplamente utilizada envolve colunas curtas com diâmetro interno estreito (< 0,1 mm), enquanto a segunda abordagem leva em conta colunas capilares curtas com diâmetro interno convencional (BICCHI et al., 2004). A cromatografia gasosa com colunas de diâmetro estreito, foi aplicada pela primeira vez à análise de óleos essenciais por PROOT e SANDRA (1986).

O SCC-GC pode ser aplicado com sucesso na análise quantitativa de rotina de um EO de média complexidade (até cerca de 30 componentes), uma vez que a eficiência das colunas capilares é frequentemente muito maior do que o necessário. Uma separação eficaz pode, portanto, ser obtida mesmo com uma coluna de 5,0 m (em vez de 30 m), cuja eficiência (ou seja, o número de pratos teóricos) é de quatro a oito vezes menores, mas que permite que o tempo de análise seja encurtado pelo mesmo fator, se combinado com um programa de temperatura adequado. Quando a eficiência é insuficiente para uma boa separação, sua falta pode ser compensada pela adoção de uma fase estacionária com uma seletividade adequada (CRAMERS et al., 1999; BICCHI et al., 2004; MARRIOTT, SHELLIE e CORNWELL, 2001)

### **Família Lauraceae**

A família Lauraceae é de longe a maior família da ordem Laurales com cerca de 50 gêneros e mais de 2.000 espécies distribuídas em latitudes tropicais e subtropicais, especialmente no sudeste da Ásia e na América tropical. Vários gêneros têm uma distribuição pantropical, como *Beilschmiedia*, *Cassytha*, *Cryptocarya*, *Litsea*, *Ocotea* e *Persea*. Outros estão restritos à Ásia e Austrália, que são *Alseodaphne*, *Dehaasia*, *Endiandra*, *Eusideroxylon*, *Hexapora* e *Neolitsea*. *Eusideroxylon* é restrito a Bornéu e Sumatra, enquanto *Dehaasia* e *Hexapora* são restritos à Península da Malásia. Além disso, *Ravensara* e *Potameia* podem ser encontrados em Madagascar (SALLEH et al., 2016; SIMIÉ et al., 2004). No Brasil, ocorrem 23 gêneros e 434 espécies (BROTTO et al., 2013).

A família Lauraceae pode ser reconhecida por sua morfologia floral distinta. A casca é lisa, coriácea e possui muitas lenticelas. A casca interna é perfumada, amarela, laranja, avermelhada ou rosada e exala uma seiva de amarelo claro a marrom claro após a incisão. As folhas desta família são simples, sem estípulas, opostas, espirais, espirais ou alternadas, geralmente com vários pontos de glândula e frequentemente liberam perfume aromático quando esmagadas (SALLEH et al., 2016).

### **O gênero *Ocotea***

O gênero *Ocotea* pertence à família Lauraceae e compreende cerca de 400 espécies distribuídas em regiões tropicais e subtropicais da América Central e do Sul, Índias Ocidentais, e África; das quais 170 são encontradas no Brasil. A morfologia desse gênero é muito variável, mas pode-se dizer que apresentam folhas alternadas com nervuras; inflorescências tirsopaniculadas para botrióide. As flores são trimeras, bissexuais, polígamas ou unissexuais; tépalas iguais, raramente persistentes na borda; nove estames férteis, o terceiro verticilo com glândulas; anteras com quatro lóculos, receptáculo muito pequeno e profundamente tubular; nas flores masculinas, ovário rudimentar a ausente, fruta e cúpula extremamente variáveis em tamanho e forma. (DA SILVA et al., 2017)

Uma série de plantas deste gênero são fontes de metabólitos secundários, incluindo neolignanas, alcaloides, flavonoides, sesquiterpenos, lignanas, butanolidas, benzopiranos, esteróides, alquilfenóis, arilpropenos, cumarinas, ésteres e saponinas; muitos dos quais exibem atividades antiproliferativas, antifúngicas, anti-herpéticas, anti-inflamatórias e antimicrobianas interessantes. (SALLEH et al., 2017; BROTTTO et al., 2013)

Dado essas atividades biológicas muitas dessas plantas têm sido utilizadas para o tratamento de várias doenças. Entre eles, a madeira do caule de *Ocotea bullata* tem sido usado para tratar dores de cabeça e infecções do trato urinário masculino; *Ocotea quixos* é usado como desinfetante local infusão de anestésico e antidiarreico; *Ocotea lancifolia* é usado como antiparasitário e *Ocotea caparrapi* é usado para tratar picadas de insetos, picadas de cobra, bronquite e tumores. (SALLEH et al., 2017; BROTTTO et al., 2013; DA SILVA et al., 2017).

### ***Ocotea corymbosa* (Lauraceae)**

A espécie *Ocotea corymbosa* é popularmente conhecida como “canela de corvo e canela-fedorenta”. Ela é característica dos biomas Mata Atlântica e Cerrado e devido sua copa com folhagem delicada e flores brancas é facilmente encontrada nos centros urbanos. É uma árvore de grande porte podendo atingir seus 30 metros de altura, seu tronco é reto a levemente tortuoso e sua casca externa é áspera, de coloração marrom escuro; seus principais polinizadores são as Abelhas e seus principais agentes dispersores, as aves; possuem seu período de floração de setembro a fevereiro e seu Período de frutificação de março a dezembro. (INSTITUTO DE PESQUISAS ECOLÓGICAS, 2020, p.1).

Em uma pesquisa realizada na Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul (UEMS) utilizando folhas e cascas de *O. corymbosa*, foi constatado numa triagem fitoquímica a presença de alguns compostos nessa espécie, como alcaloides, flavonoides, sesquiterpenlactonas, ácidos orgânicos e açúcares redutores nas folhas e cascas da planta, triterpenos e/ou esteroides, polissacarídeos e taninos apenas nas folhas e catequinas apenas nas cascas. Após analisados, os metabólitos secundários indicaram grande potencial citotóxico, efeitos alelopáticos e atividades antioxidantes. (PEZENTI et al., 2017).

Em um segundo estudo, realizou-se a avaliação química e biológica do óleo essencial de *Ocotea corymbosa*, onde se verificou na sua identificação e composição química dos compostos voláteis predominância de sesquiterpenos e diterpenos. Os principais constituintes encontrados no óleo foram o elixeno (9,9%),  $\delta$ -cadineno (8,9%), germacreno D (7,04%), cariofileno (4,7%) e  $\alpha$ -cadinol (4,3%). (MALLMANN et al., 2020).

O objetivo deste trabalho foi Identificar os principais componentes por técnicas cromatográficas (espectros de massas e cálculos de índices de retenção) dos óleos essenciais obtidos.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

Neste tópico discorre-se sobre os materiais e métodos utilizados na presente etapa da pesquisa que através de um levantamento de referências bibliográficas, livros, teses, artigos científicos nacionais e internacionais, foi possível executar a elaboração da proposta científica.

### **Aquisição da planta**

Logo após a identificação das áreas de coleta foram realizadas as coletas das folhas de *Ocotea corymbosa* dentre os meses de setembro e outubro nas cidades Bauru/SP, Botucatu/SP e São Manuel/SP. Foram coletadas cerca de 1,0 a 2,0 kg de material vegetal fresco (folhas e galhos) em cada cidade, dando-se prioridade às folhas integras e saudáveis. Esses materiais foram identificados, e acondicionados para o próximo tratamento.

### **Preparo da amostra**

A folhas íntegras e inteiras foram separadas dos galhos. Todos os materiais obtidos em cada cidade foram tratados separadamente e sendo identificadas para que não houvesse mistura entre as regiões coletadas. Após a separação dos galhos que foram descartados, as folhas foram secas em sombra e na temperatura ambiente. Após 7 dias de secagem, as folhas foram acondicionadas em freezer (-18 °C) para aguardar o dia da moagem e extração.

### **Extração do óleo essencial**

Para realizar a extração do óleo essencial todas as folhas foram moídas, entretanto esse processo foi realizado respeitando a categoria das plantas por cidade de forma que se obteve três amostras, sendo uma de folhas secas de *Ocotea corymbosa* de Bauru, a segunda de São Manuel e por último Botucatu. O equipamento utilizado foi o Moinho Tipo Willye (modelo TE-650, marca TECNAL).

Após a moagem, pesou-se em uma balança de precisão (Mod. Bel S2202H) cerca de 65 gramas de folhas secas de cada cidade. No balão de fundo redondo de 2,0 L foram colocadas as 65 g de folhas secas e água ultrapura até 70% da capacidade do balão, a fim de evitar um refluxo do sistema

As extrações foram realizadas utilizando o sistema de extração com condensador tipo Clevenger resfriado com água a aproximadamente 3°C. Utilizou-se uma manta aquecedora (Fisatom Mod. 202) e um banho ultratermostato (Nova Ética) para manter o banho a 3°C. Estabeleceu-se o tempo de 2 h para cada extração.

### **Preparo das amostras de óleo essencial**

Após o fim das 2 horas de cada extração, totalizando 3 extrações finais (uma para cada cidade), os óleos essenciais obtidos foram retirados com apoio de pipetas do tipo *Pasteur* e transferidas para frascos tipo *Ependorfs* de *teflon*<sup>®</sup>, que foram devidamente identificados e acondicionados em freezer (-18°C) aguardando o envio para as análises por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas e cálculos dos índices de retenção. As massas de óleos essenciais obtidos em cada extração foram anotadas para avaliação do rendimento.

### **Análises por Cromatografia Gasosa (CG) e por Espectrometria de Massas (CG-EM)**

As análises serão realizadas utilizando o equipamento modelo SHIMADZU QP-5000 espectrômetro de massa acoplado ao sistema cromatográfico a gás equipado com uma coluna capilar de sílica apolar fundida DB-5 (*J & W Scientific*) com medidas de 30 m x 0,25 mm e espessura de 0,25 µm. A temperatura do forno será programada de 60 a 240°C, com gradiente de temperatura de 3°C por minuto. As temperaturas do injetor e do detector serão de 240 e 270°C, respectivamente, de acordo com a literatura (ADAMS, 2012). O gás carreador será hélio a uma vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup> (volume constante). Os espectros de massa serão obtidos a 70 eV no modo de íons totais (TIC). Serão injetados manualmente 1,0 µL de cada amostra e em concentrações conhecidas no modo *splitless* (20:1).

### **Identificação dos componentes do óleo essencial**

As identificações dos componentes do óleo essencial serão feitas utilizando como referência os espectros de massas obtidos de cada um dos picos cromatográficos e comparados com dados teóricos da biblioteca de dados NIST 62 obtidos para cada um dos picos (MCLAFFERTY e STAUFFER, 1989; ADAMS, 2012; ADAMS, 1995).

## **RESULTADOS**

As coletas do material vegetal de *Ocotea corymbosa* foram realizadas no período da manhã entre os meses de setembro e outubro nas cidades de Bauru, Botucatu e São Manuel, todas localizadas no estado de São Paulo. É válido ressaltar que essa etapa foi realizada seguindo todos os protocolos de prevenção contra o Covid-19, como o uso permanente das máscaras, mantendo o distanciamento e higienizando regularmente as mãos com o álcool 70.

Na Figura 1 pode-se visualizar os mapas das localidades das cidades escolhidas para a coleta dos materiais vegetais.

**Figura 1.** Localização das cidades onde foram realizadas as coletas das plantas.



Fonte: Google Maps

As extrações foram realizadas usando o sistema de extração em série mostrado na Figura 2. O sistema era formado por um balão de fundo redondo, Clevenger modificado, manta de aquecimento e pelo sistema de resfriamento, figura 18. O sistema Clevenger é o aparato mais indicado para extrações de óleos essenciais, nessa análise foi utilizado o aparelho Clevenger modificado, isso é, possui Trap com torneira e condensador reto formando uma peça única.

**Figura 2.** Sistema de extração em série: Aparelho tipo Clevenger modificado acoplado a balão de fundo redondo com manta de aquecimento.



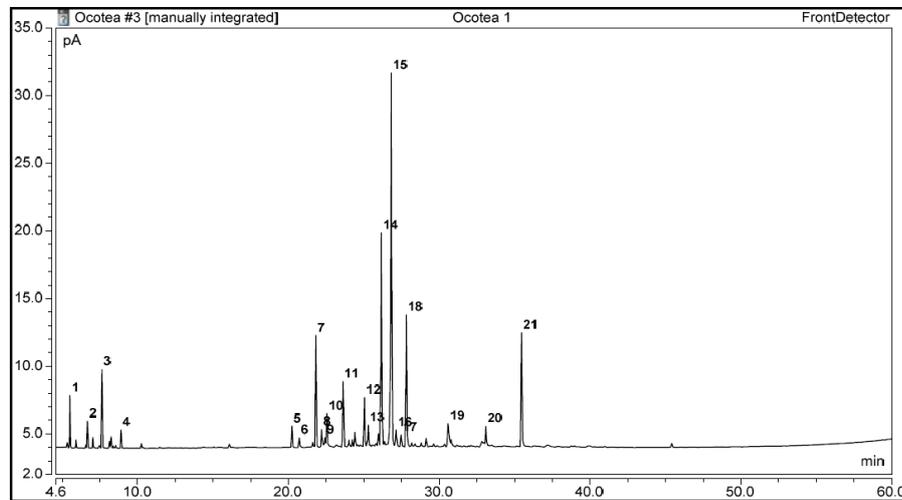
Fonte: elaborado pelo autor.

## ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA GASOSA (CG)

### *Análise Amostra São Manuel*

Após a extração da amostra de óleo essencial de folhas colhidas em São Manuel/SP este foi analisado pela técnica de Cromatografia Gasosa (Figura 3). Pode-se observar picos de monoterpenos (C10) até 10 minutos e sesquiterpenos (C15) entre 20 e 40 minutos.

**Figura 3.** Cromatograma obtido da amostra de óleo essencial de São Manuel/SP.



Fonte: Instituto Agrônomo de Campinas – IAC.

A análise indica a presença de 21 substâncias, sendo que os picos 14 (26,16 min.) e 15 (26,82 min.) são os majoritários com 15,14% e 29,13% do óleo analisado, respectivamente. As 21 substâncias identificadas encontram-se na Tabela 1.

**Tabela 1.** Substâncias identificadas no óleo essencial de folhas de São Manuel/SP.

Pico	Substâncias	IR calc	IR lit	% relativa
1	$\alpha$ -pineno	932	932	2,33
2	$\beta$ -pineno	977	974	1,20
3	$\delta$ -3-careno	1011	1008	3,89
4	<i>E</i> - $\beta$ -ocimeno	1047	1044	0,82
5	$\delta$ -elemeno	1336	1335	1,42
6	$\alpha$ -cubebeno	1348	1348	0,67
7	$\alpha$ -copaeno	1375	1374	7,58
8	$\beta$ -bourbonene	1384	1387	1,38
9	$\beta$ -cubebeno	1389	1387	0,81
10	$\beta$ -elemeno	1392	1389	2,34
11	<i>E</i> -cariofileno	1419	1417	4,95
12	$\alpha$ -humuleno	1454	1452	3,37
13	9-epi-( <i>E</i> )-cariofileno	1461	1464	1,62
14	germacreno D	1482	1480	15,25
15	biclogermacreno	1498	1500	29,13
16	$\alpha$ -bulneseno	1507	1509	1,10
17	$\gamma$ -cadineno	1515	1513	0,79
18	$\delta$ -cadineno	1525	1522	9,60
19	espatulenol	1591	1577	2,66
20	<i>Z</i> -asarone	1653	1616	1,08
21	<i>E</i> -asarone	1717	1675	8,02

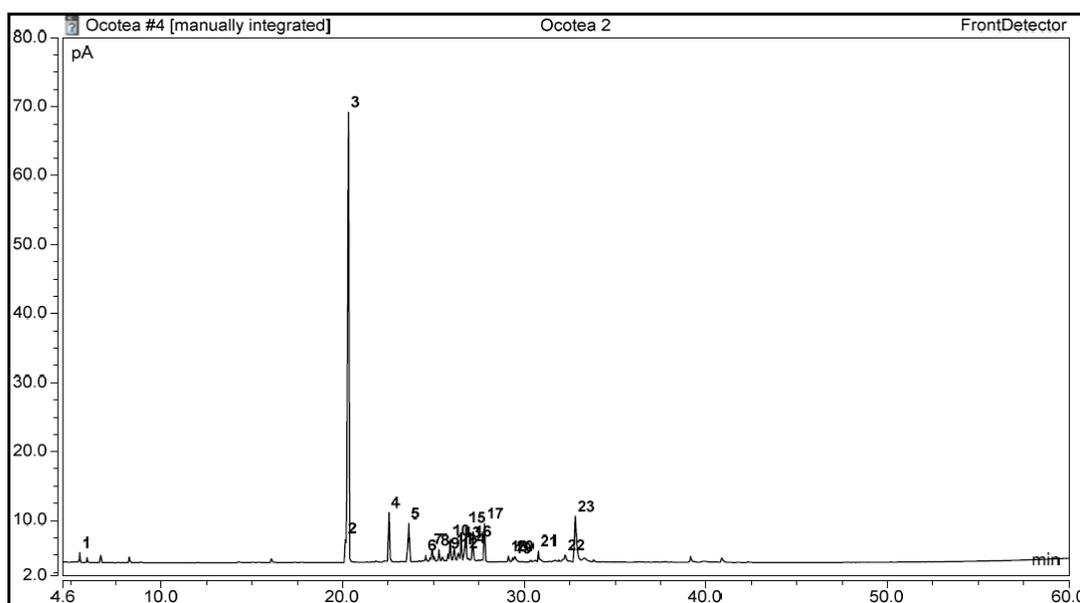
Fonte: Instituto Agrônomo de Campinas – IAC; IRcal = índice de retenção calculado; IR lit = índice de retenção da literatura

Foram identificados pelas análises dos espectros de massas e pelos cálculos de índice de retenção 21 substâncias, sendo que o biciclogermacreno com 29,13% (26,82 min.), germacreno D com 15,25% (26,16 min.), d-cadineno com 9,60% (27,82 min.), a-copaeno com 7,58% (21,81 min.) e E-asarone com 8,02 % (35,45 min.) foram as substâncias com maiores teores identificadas no óleo essencial obtido de folhas colhidas em São Manuel/SP.

### Análise Amostra Bauru

Após a extração da amostra de óleo essencial de folhas colhidas em Bauru/SP este foi analisado pela técnica de Cromatografia Gasosa (Figura 4). Pode-se observar ausência de picos cromatográficos na região de monoterpenos (C10) e a presença intensa de sesquiterpenos (C15) entre 20 e 35 minutos.

**Figura 4.** Cromatograma obtido da amostra de óleo essencial de Bauru/SP.



Fonte: Instituto Agronômico de Campinas – IAC.

A análise indica a presença de 23 substâncias, sendo que o pico 3 (20,318 min.) é o majoritário com 54,22% do óleo analisado, respectivamente. As 23 substâncias identificadas encontram-se na Tabela 2.

**Tabela 2.** Substâncias identificadas no óleo essencial de folhas de Bauru/SP.

Pico	Substância	IR calc	IR lit	% relativa
1	$\alpha$ -pineno	932	932	0,59
2	$\delta$ -elemeno	1334	1335	2,62
3	$\delta$ -elemeno	1338	1335	55,00
4	$\beta$ -elemeno	1392	1389	4,73
5	<i>E</i> -cariofileno	1419	1417	4,99
6	guaiaiene <6,9->	1443	1442	0,51
7	cadina-1(6),4-diene<cis->	1451	1461	1,05
8	9-epi-( <i>E</i> )-cariofileno	1461	1464	0,88
9	$\gamma$ -elemeno	1473	1434	0,67
10	valenceno	1476	1496	2,06
11	germacreno D	1481	1480	1,47
12	$\beta$ -selineno	1487	1489	0,92
13	$\delta$ -selineno	1491	1492	1,60
14	$\alpha$ -selineno	1496	1498	0,91
15	biciclogermacreno	1498	1500	2,83
16	NI	1508	NC	2,03
17	$\delta$ -cadineno	1524	1522	3,59
18	germacrene B	1559	1559	0,62
19	elemol	1562	1548	0,43
20	NI	1565	NC	1,19
21	espatulenol	1600	1577	0,89
22	Valerianol	1637	1656	0,78
23	NI	1649	NC	9,64

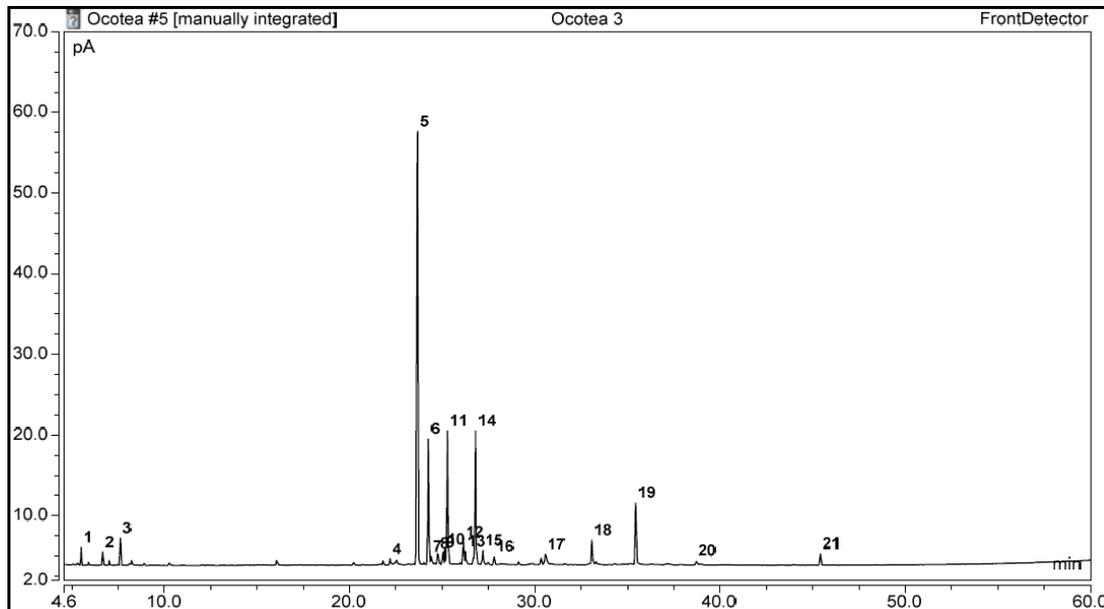
Fonte: Instituto Agrônomo de Campinas – IAC; IRcal = índice de retenção calculado; IR lit = índice de retenção da literatura; NI = não identificado; NC = não calculado.

O pico eluído em 20,318 min. com 55% é majoritário e foi identificado como sendo o  $\delta$ -elemeno. Três substâncias não foram identificadas (picos 16, 20 e 23), apesar do sistema ter obtido os espectros de massas e os índices de retenção, esses não puderam ser encontrados nas bases de dados disponíveis para comparação.

### **Análise Amostra Botucatu**

Após a extração da amostra de óleo essencial de folhas colhidas em Botucatu/SP este foi analisado pela técnica de Cromatografia Gasosa (Figura 5). Pode-se observar picos (1, 2 e 3) de monoterpenos (C10) até 10 minutos e sesquiterpenos (C15) entre 20 e 48 minutos.

**Figura 5.** Cromatograma obtido da amostra de óleo essencial de Botucatu/SP.



Fonte: Instituto Agronômico de Campinas – IAC.

A análise indica a presença de 21 substâncias, sendo que o pico 5 (23,66 min.) é o majoritário com 44,60% do óleo analisado. Os picos em 24,25 min. (10,65%), 25,28 min. (11,07%) e em 26,80 min. (12,12%) apresentaram % relativas interessantes. As 21 substâncias identificadas encontram-se na Tabela 3.

**Tabela 3.** Substâncias identificadas no óleo essencial de folhas de Botucatu/SP.

Pico	Substâncias	IR calc	IR lit	% relativa
1	$\alpha$ -pineno	932	932	0,86
2	$\beta$ -pineno	977	974	0,64
3	$\delta$ -3-careno	1011	1008	1,29
4	$\beta$ -bourboneno	1384	1387	0,40
5	$\alpha$ -santaleno	1420	1416	44,60
6	$\alpha$ -E -bergamoteno	1435	1432	10,65
7	aromadendreno	1439	1439	0,66
8	epi- $\beta$ -santaleno	1447	1445	1,28
9	$\alpha$ -humuleno	1454	1452	1,00
10	(E)- $\beta$ -farneseno	1457	1454	1,18
11	$\beta$ -santaleno	1461	1457	11,07
12	germacreno D	1482	1480	1,65
13	E - $\beta$ -farneseno	1485	1454	1,01
14	biciclogermacreno	1498	1500	12,12
15	$\beta$ -bisaboleno	1509	1505	0,89
16	$\delta$ -cadineno	1525	1522	0,61
17	espatulenol	1591	1577	1,39
18	Z - asarone	1653	1616	1,95
19	E - asarone	1716	1675	5,30
20	NI	1797	NC	0,50
21	kaureno	2037	2042	0,96

Fonte: Instituto Agronômico de Campinas – IAC; IR cal = índice de retenção calculado; IR lit = índice de retenção da literatura; NI = não identificado; NC = não calculado.

A análise indica que o pico 5 em 23,66 min. (44,60%) foi identificado como sendo a substância  $\alpha$ -santaleno. Os picos em 24,25 min. (10,65%), 25,28 min. (11,07%) e em 26,80 min. (12,12%) foram identificados como as substâncias aromadendreno, epi- $\beta$ -santaleno e biciclogermacreno, respectivamente.

## ANÁLISE E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Grande parte dos procedimentos destinados a extração de óleos essenciais sugerem a secagem do material vegetal afim de evitar possíveis consequências que a umidade presente nas folhas pode proporcionar. (TELASCREA et al., 2008). Optou-se na secagem à sombra de todos os materiais vegetais, como sendo a menos agressiva em relação à volatilidade dos óleos essenciais. Em 7 dias as folhas já se encontravam desidratadas e sem problemas com formação de fungos; estavam prontas para os processos de moagem.

A *Ocotea corymbosa* é uma planta muito aromática bem como seu óleo essencial. Esse óleo é rico em sequiterpenos e diterpenos sendo os principais constituintes encontrados o elixeno (9,9%),  $\delta$ -cadineno (8,9%), germacreno D (7,04%), cariofileno (4,7%) e  $\alpha$ -cadinol (4,3%). (MALLMANN et al., 2020). O processo de extração de óleo essencial que utilizou o aparato Clevenger é considerado o processo mais eficiente na obtenção de óleos essenciais, pois permite uma extração limpa de

solventes tóxicos e livre de subprocessos que poderiam permitir perda de material ou até sua contaminação. (SANTOS et al., 2004; CLEVINGER, 1928a e 1928b)

Foram realizadas três extrações, simultaneamente, ligadas em série ao sistema de refrigeração. A série foi conectada em I (São Manuel/SP), II (Bauru/SP) e III (Botucatu/SP). O ambiente do laboratório ficou tomado pelo aroma do óleo essencial em todo tempo das extrações. Após 2 horas de extração, observou-se que havia a presença de uma fase oleosa (óleo essencial) em todas as três extrações. As quantidades variaram entre as extrações das amostras das 3 cidades, como o esperado.

A Tabela 4 apresenta os valores de massas de folhas secas utilizadas em cada processo e as respectivas massas de óleos essenciais obtidos. Os rendimentos de óleos essenciais obtidos em relação às quantidades de plantas mostraram que a extração com plantas de Botucatu/SP foi a que apresentou maior rendimento (0,31%), seguida por Bauru/SP (0,29%) e São Manuel (0,25%).

**Tabela 4:** Resultado dos rendimentos dos óleos essenciais.

Localidade	Massa do material seco (g)	Massa do óleo essencial (g)	Rendimento (%)
Botucatu	66,00	0,2046	0,31
Bauru	67,55	0,1959	0,29
São Manuel	67,48	0,1687	0,25

Fonte: o próprio autor.

Os óleos essenciais de *Ocotea corymbosa* das três cidades foram pesados, armazenados e identificados. As amostras de óleos foram acondicionadas em freezer (-18°C) aguardando o envio para as análises por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas e cálculos dos índices de retenção que serão realizadas no Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) - Fazenda Santa Elisa, no Centro de Recursos Genéticos Vegetais sob responsabilidade da Profa. Dra. Márcia Ortiz Mayo Marques. Posteriormente, as análises dos resultados serão feitas no Centro Universitário do Sagrado Coração de Bauru.

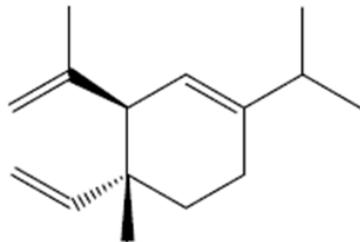
Devido às questões relacionadas à diversidade genética e de clima, é normal que as composições entre as substâncias dos óleos essenciais variem entre si, como fica bem claro na imagem. Mantendo-se as condições de tratamento das plantas (coleta e secagem) e de extração é possível fazer um comparativo qualitativo entre as amostras. Verifica-se que a planta da cidade de São Manuel mostra um óleo essencial mais rico em compostos mais voláteis, não somente em número de componentes, mas também em intensidade relativa (%).

As amostras das cidades de Bauru e Botucatu não possuem abundância em compostos mais voláteis. Ambas as amostras são ricas em terpenos contendo 15 carbonos (sesquiterpenos). O que chama a atenção é a análise do óleo essencial de Bauru, já que possui o sesquiterpeno  $\beta$ -elemeno (C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>) com 55% de intensidade relativa, ou seja, mais da metade do óleo é composta por apenas um componente.

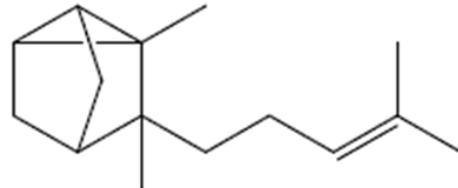
No óleo essencial analisado de Botucatu, verificou-se o mesmo, mas agora o sesquiterpeno predominante é o  $\alpha$ -santaleno (C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>) com 44,6% de intensidade relativa. Na amostra de óleo essencial de São Manuel ocorre uma distribuição mais próxima em termos de intensidade entre as

substâncias, mesmo assim, o composto biciclogermacreno ( $C_{15}H_{24}$ ) ocorre com intensidade relativa majoritária de 29,13%. As estruturas dessas substâncias se encontram na Figura 6.

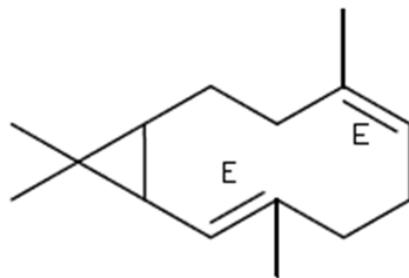
**Figura 6.** Estrutura dos principais sesquiterpenos avaliados nos óleos essenciais.



$\delta$ -elemeno ( $C_{15}H_{24}$ )



$\alpha$ -santaleno ( $C_{15}H_{24}$ )



Biciclogermacreno ( $C_{15}H_{24}$ )

Fonte: elaborado pelo autor

Dentre as substâncias, somente 5 são encontradas nas 3 amostras simultaneamente, contendo respectivamente nas cidades São Manuel, Bauru e Botucatu uma porcentagem relativa de:  $\alpha$ pineno (2,33%; 0,59%; 0,86%), germacreno D (15,25%; 1,47%; 0,86%), biciclogermacreno (29,13%; 2,83%; 12,12%),  $\delta$ cadineno (9,60%; 3,59%; 0,61%) e espatulenol (2,66%; 0,89%; 1,39%).

## CONCLUSÃO

Durante este estudo, pode-se realizar a extração e a identificação das 3 amostras de óleos essenciais através de técnicas cromatográficas. Analisando qualitativamente a presença de monoterpenos (C10), verifica-se que as os óleos essenciais de São Manuel foram os que apresentaram maior % relativa destes compostos, enquanto os óleos essenciais de Bauru e Botucatu predominaram os sesquiterpenos (C15). O óleo essencial obtido de Botucatu foi o que apresentou qualitativamente a maior quantidade de sesquiterpenos de todas as amostras.

Da amostra de obtida em Botucatu foram identificados no total a presença de 21 substâncias, sendo destes o  $\alpha$ -santaleno (44,60%), bicilogermacreno (12,12%) e  $\beta$ -santaleno (11,07%) os componentes majoritários. A análise da amostra obtida de Bauru permitiu a identificação de 23 substâncias, com destaque em um componente que representa mais da metade do óleo extraído,  $\delta$ elemeno, compondo 55,00% da amostra analisada; entretanto três substâncias não foram identificadas (picos 16, 20 e 23), esses não puderam ser encontrados nas bases de dados disponíveis para comparação. Enquanto as amostras obtidas em São Manuel foram identificadas 21 componentes, sendo duas em maior abundância: bicilogermacreno com 29,13% e germacreno D com 15,25%.

A comparação das três amostras de óleos essenciais analisadas permitiu verificar que os componentes:  $\alpha$ pineno, germacreno D, bicilogermacreno,  $\delta$ -cadineno e espatulenol foram os únicos componentes que apareceram em todos os óleos essenciais das amostras obtidas de plantas das três cidades, porém em composições diferentes.

## REFERÊNCIAS

- ADAMS, Robert P. Identification of essential oils by ion trap mass spectroscopy. Academic press, 2012.
- ADAMS, R. P.; Identification of Essential Oil by Ion Trap Mass Spectroscopy, Academic Press: San Diego, 1995.
- BALLABENI, V. et al. Novel antiplatelet and antithrombotic activities of essential oil from *Lavandula hybrida* Reverchon "grosso". *Phytomedicine*, v. 11, n. 7-8, p. 596-601, 2004.
- BAKKALI, Fadil et al. Biological effects of essential oils—a review. *Food and chemical toxicology*, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.
- BICCHI, Carlo et al. Direct resistively heated column gas chromatography (Ultrafast module-GC) for high-speed analysis of essential oils of differing complexities. *Journal of Chromatography A*, v. 1024, n. 1-2, p. 195-207, 2004.
- BORGES, Janaina de Santana. Análise comparativa do proteoma e metaboloma de raízes de dois clones de *E. grandis* x *E. camaldulensis*, sendo um tolerante e um susceptível a condições de estresse hídrico. 2013. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

BRASIL. FARMACOPEIA BRASILEIRA, volume 2 / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 694-698, 2v/il., 2010.

BROTTO, Marcelo Leandro; CERVI, Armando Carlos; SANTOS, Élide Pereira dos. O gênero *Ocotea* (Lauraceae) no estado do Paraná, Brasil. *Rodriguésia*, v. 64, n. 3, p. 495-525, 2013.

BURT, Sara. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International journal of food microbiology*, v. 94, n. 3, p. 223-253, 2004.

BUSATO, Nathália Viégas et al. Estratégias de modelagem da extração de óleos essenciais por hidrodestilação e destilação a vapor. *Ciência Rural*, v. 44, n. 9, p. 1574-1582, 2014.

CARVALHO, P. E. R. Espécies arbóreas brasileiras. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, v. 3, p.98 – 103, 2008.

CLEVENGER, J. F. Apparatus for the determination of volatile oil. *The Journal of the American Pharmaceutical Association* (1912), v. 17, n. 4, p. 345-349, 1928a.

CLEVENGER, J. F. Report on (the analysis of) fluidextract of ginger. *Assoc Off Agric Chem J*, v. 17, p. 346-349, 1928b..

CRAMERS, Carel A. et al. High-speed gas chromatography: an overview of various concepts. *Journal of chromatography A*, v. 856, n. 1-2, p. 315-329, 1999.

DA SILVA, Joyce Kelly et al. Chemical diversity, biological activity, and genetic aspects of three *Ocotea* species from the Amazon. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 18, n. 5, p. 1081, 2017.

DAVID, Frank et al. Instrumentation and applications of fast high-resolution capillary gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 842, n. 1-2, p. 309-319, 1999.

DE MORAIS, Lilia Aparecida Salgado. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. In: Embrapa Meio Ambiente-Artigo em anais de congresso (ALICE). *Horticultura Brasileira*, Brasília, DF, v. 27, n. 2, p. S3299-S3302, ago. 2009. CD-ROM. Suplemento. Trabalho apresentado no 49. Congresso Brasileiro de Olericultura, Águas de Lindóia, SP., 2009.

DE OLIVEIRA ARAÚJO, Lidiane et al. O uso de óleos essenciais na Odontologia. *Revista de Odontologia Contemporânea*, v. 5, n. 1, p. 69-78.2021

DE SOUSA, Rodrigo Ferreira; DE SOUSA, Joama Alves. Metabólicos secundários associados a estresse hídrico e suas funções nos tecidos vegetais. *Revista Brasileira de Gestão Ambiental*, v. 11, n. 1, p. 01-08, 2017.

EDRIS, Amr E. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, v. 21, n. 4, p. 308-323, 2007.

FANIN, Mauricio et al. Métodos alternativos no tratamento de infecções causadas por *Staphylococcus aureus*. *Medicina Veterinária (UFRPE)*, v. 14, n. 1, p. 24-32, 2020.

HERRES, W.. HRGC–FTIR: Capillary Gas Chromatography–Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Theory and Applications*. Huethig: Heidelberg, Germany, 1987.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. *Vocabulary of Natural Materials: ISO/D159235.2*; 2013.

- KERBAUY, G. B. *Fisiologia Vegetal*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 2004. 470p
- MALLMANN, Viviane et al. Avaliação química e biológica de óleo essencial de *Ocotea corymbosa* (Meisn.) Mez/Chemical and biological evaluation of essential oil from *Ocotea corymbosa* (Meisn.) Mez. *Brazilian Journal of Development*, v. 6, n. 4, p. 19621-19636, 2020.
- MARRIOTT, Philip J.; SHELLIE, Robert; CORNWELL, Charles. Gas chromatographic technologies for the analysis of essential oils. *Journal of Chromatography A*, v. 936, n. 1-2, p. 1-22, 2001.
- MCLAFFERTY, Fred W.; STAUFFER, Douglas B. *The Wiley/NBS registry of mass spectral data*. New York: Wiley, 1989.
- MENDES, S. S. et al. Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory effects of the essential oil of *Lippia gracilis* leaves. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 129, n. 3, p. 391-397, 2010.
- NERIO, Luz Stella; OLIVERO-VERBEL, Jesus; STASHENKO, Elena. Repellent activity of essential oils: a review. *Bioresource technology*, v. 101, n. 1, p. 372-378, 2010.
- PEZENTI, Letícia et al. TRIAGEM FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS DAS FOLHAS E CASCAS DE OCOTEA CORYMBOSA (MEISN.) MEZ.(LAURACEAE). *ANAIS DO ENIC*, n. 9, 2017.
- PICHERSKY, Eran; GERSHENZON, Jonathan. The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. *Current opinion in plant biology*, v. 5, n. 3, p. 237-243, 2002.
- PROOT, M.; SANDRA, P. High speed capillary GC on 10 m× 100 µm id FSOT Columns. *Journal of High Resolution Chromatography*, v. 9, n. 11, p. 618-623, 1986.
- RUBIOLO, Patrizia et al. Essential oils and volatiles: sample preparation and analysis. A review. *Flavour and fragrance journal*, v. 25, n. 5, p. 282-290, 2010.
- SALLEH, W. M. N.H.; AHMAD, F. Phytochemistry and biological activities of the genus *Ocotea* (Lauraceae): A review on recent research results (2000-2016). *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, v. 7, n. 5, p. 204-218, 2017.
- SALLEH, Wan Mohd Nuzul Hakimi et al. Essential oil compositions of Malaysian Lauraceae: A mini review. *Pharmaceutical Sciences*, v. 22, n. 1, p. 60-67, 2016.
- SANTOS, André Luis dos et al. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 43, n. 6, p. 413-423, 2007.
- SIMIĆ, A. et al. The chemical composition of some Lauraceae essential oils and their antifungal activities. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, v. 18, n. 9, p. 713-717, 2004.
- SIMÕES, Cláudia Maria Oliveira et al. *Farmacognosia: do produto natural ao medicamento*. Artmed Editora, 2016.
- SHARIFI-RAD, Javad et al. Biological activities of essential oils: From plant chemoecology to traditional healing systems. *Molecules*, v. 22, n. 1, p. 70, 2017.
- TELASCREA, M., ARAÚJO, C. C. D., CAVALHEIRO, A. J., MARQUES, M. O., FACANALI, R., & DE MORAES, P. L. Essential oils from leaves of *Cryptocarya* spp from the atlantic rain forest. *Química Nova*, 31(3), 503-507, 2008.,
- VAN DEN DOOL, H. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *J. Chromatogr. A*, v. 11, p. 463-471, 1963.

VAN DE BRAAK, S. A. A. J.; LEIJTEN, G. C. J. J. Essential oils and oleoresins: a survey in the Netherlands and other major markets in the European Union. CBI, Centre for the Promotion of Imports from Developing Countries, Rotterdam, v. 116, 1999.

VIZZOTTO, Márcia; KROLOW, A. C. R.; WEBER, Gisele Eva Bruch. Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância. Embrapa Clima Temperado-Documents (INFOTECA-E), 2010.

WANNES, Wissem Aidi et al. Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle (*Myrtus communis* var. *italica* L.) leaf, stem and flower. *Food and chemical toxicology*, v. 48, n. 5, p. 1362-1370, 2010.

WAR, Abdul Rashid et al. Herbivore induced plant volatiles: their role in plant defense for pest management. *Plant Signaling & Behavior*, v. 6, n. 12, p. 1973-1978, 2011.

WAR, Abdul Rashid et al. Mechanisms of plant defense against insect herbivores. *Plant signaling & behavior*, v. 7, n. 10, p. 1306-1320, 2012.

WIGGERS, Ivonei; STANGE, Carlos Eduardo Bittencourt. Manual de instruções para coleta, identificação e herborização de material botânico. Programa de Desenvolvimento Educacional-SEED-PR UNICENTRO, 45p, 2008.