

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA FLORESTAL

**ÓLEOS ESSENCIAS DE *Nectandra grandiflora* E
Ocotea acutifolia: RENDIMENTO, COMPOSIÇÃO
QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Daniela Thomas da Silva

**Santa Maria, RS, Brasil
2013**

ÓLEOS ESSENCIAS DE *Nectandra grandiflora* E *Ocotea acutifolia*: RENDIMENTO, COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS

Daniela Thomas da Silva

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Área de Concentração em Silvicultura, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Engenharia Florestal**

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Berta Maria Heinzmann

**Santa Maria, RS, Brasil
2013**

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Silva, Daniela Thomas da
ÓLEOS ESSENCIAS DE Nectandra grandiflora E Ocotea
acutifolia: RENDIMENTO, COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES
BIOLÓGICAS / Daniela Thomas da Silva.-2013.
140 p.; 30cm

Orientadora: Berta Maria Heinzmann
Coorientador: Solon Jonas Longhi
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-
Graduação em Engenharia Florestal, RS, 2013

1. Óleos essenciais 2. Lauraceae 3. Produtos
florestais não-madeireiros 4. Sazonalidade I. Heinzmann,
Berta Maria II. Longhi, Solon Jonas III. Título.

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal**

**A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado**

**ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Nectandra grandiflora* E *Ocotea acutifolia*:
RENDIMENTO, COMPOSIÇÃO QUÍMICA E
ATIVIDADES BIOLÓGICAS**

elaborada por
Daniela Thomas da Silva

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Engenharia Florestal

COMISSÃO EXAMINADORA:

Berta Maria Heinzmann, Dr^a.
(Presidente/Orientadora)

Sérgio A. Loreto Bordignon, Dr. (UNILASALLE)

Cristiane Pedrazzi, Dr^a. (UFSM)

Santa Maria, 25 de fevereiro de 2013.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal (PPGEF), por viabilizarem a realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo importante suporte financeiro através da bolsa de estudos.

À Professora Dr^a Berta Maria Heinzmann, minha orientadora, pela disponibilidade, pelos ensinamentos e amizade construída.

Ao Professor Dr. Solon Jonas Longhi, meu co-orientador, pela indicação e identificação das espécies estudadas, e pelo apoio demonstrado.

À minha família, em especial minha mãe Carla, aos meus irmãos Diego, Maurício e Gabriela, e aos meus avôs Egon e Maria Célia, pelo amor, compreensão, apoio e força sempre demonstrados ao longo dessa jornada.

Aos colegas do Laboratório de Extrativos Vegetais, pela amizade, idéias e auxílio em todas as atividades realizadas nos dois anos de curso.

Ao Engenheiro Agrônomo Jorge Diefenthaeler pela colaboração e disponibilidade sempre demonstradas nas coletas de material vegetal realizadas até a cidade de Jaguari.

Ao Dr. Sérgio Bordignon e à Dr^a. Cristiane Pedrazzi por aceitarem o convite para compor a Banca Examinadora do presente trabalho.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a concretização de mais uma etapa em minha vida.

Muito Obrigada!

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal
Universidade Federal de Santa Maria

ÓLEOS ESSENCIAS DE *Nectandra grandiflora* E *Ocotea acutifolia*: RENDIMENTO, COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS

AUTORA: DANIELA THOMAS DA SILVA

ORIENTADORA: BERTA MARIA HEINZMANN

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 25 de fevereiro de 2013.

Este trabalho visa contribuir com o conhecimento e com a obtenção de novos produtos úteis ao homem e aos animais a partir de espécies nativas, nomeadamente *Nectandra grandiflora* Nees e *Ocotea acutifolia* (Nees) Mez. Os óleos essenciais (OE) destas espécies foram extraídos através da hidrodestilação, com auxílio do aparelho Clevenger, determinando-se o rendimento (% m/m) e a composição química por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM). As análises referentes ao efeito da variabilidade sazonal sobre o rendimento e a composição do OE obtido a partir das folhas de *N. grandiflora* durante um ano também foram realizadas, a fim de se verificar a melhor época de coleta do material vegetal. Adicionalmente, objetivou-se a avaliação das propriedades sedativo-anestésicas do OE das folhas de *O. acutifolia* em jundiás, e do potencial larvicida do OE das folhas de *N. grandiflora* frente às larvas de Odonata. A análise química dos OE das folhas, inflorescências e das cascas de *N. grandiflora* evidenciou que este é formado preponderantemente por sesquiterpenóides, sendo a deidrofuquinona o composto majoritário. Para os OE das folhas e inflorescências de *O. acutifolia* identificou-se como sesquiterpenóide majoritário o óxido de cariofileno. O OE das folhas de *N. grandiflora*, apresentou rendimento significativamente maior na primavera (0,75%), que coincide com o período de floração da espécie, e o menor rendimento foi obtido durante o inverno (0,39%). No entanto, a composição química não sofreu influência das estações do ano e foram verificadas apenas pequenas diferenças quantitativas na proporção dos sesquiterpenóides majoritários no OE das folhas de *N. grandiflora*. O composto deidrofuquinona predominou durante o período de estudo, sendo encontrado em maiores teores na estação do inverno. Já na primavera, houve um incremento nos teores do composto biclogermacreno, e decréscimo nas concentrações de deidrofuquinona. O OE das folhas de *O. acutifolia* apresentou atividade anestésica frente a juvenis de jundiá (*Rhamdia quelen*), em concentrações que variaram de 300-900 $\mu\text{L L}^{-1}$. A concentração de 100 $\mu\text{L L}^{-1}$ do OE de *N. grandiflora* não mostrou ser eficiente no controle das larvas da ordem Odonata.

Palavras-chaves: Extrativos vegetais. Lauraceae. Produtos florestais não-madeireiros. Sazonalidade.

ABSTRACT

Master Dissertation
Graduate Program in Forest Engineering
Universidade Federal de Santa Maria

ESSENTIAL OILS OF *Nectandra grandiflora* AND *Ocotea acutifolia*: YIELD, CHEMICAL COMPOSITION AND BIOLOGICAL ACTIVITIES

AUTHOR DANIELA THOMAS DA SILVA
ADVISOR: BERTA MARIA HEINZMANN

This work aimed to contribute with the knowledge and generation of new and useful products to humans and animals from native species, namely, *Nectandra grandiflora* Nees and *Ocotea acutifolia* (Nees) Mez. Essential oils (EO) of these species were extracted by hydrodistillation with Clevenger apparatus in order to determine the yield (% w/w) and chemical composition using gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). Analyzes concerning the effect of seasonal variability on the yield and composition of EO obtained from leaves of *N. grandiflora* for a year were also performed in order to verify the best time for collecting the plant material. Additionally, the evaluation of the sedative/anesthetic properties of EO of leaves of *O. acutifolia* in silver catfish, and the larvicidal potential of EO of leaves of *N. grandiflora* against Odonata larvae were performed. Chemical analysis of EO of leaves, inflorescence and bark of *N. grandiflora* showed that they are composed mainly of sesquiterpenoids, being dehydrofukinone the major compound. For EO of leaves and inflorescences of *O. acutifolia*, we identified the sesquiterpenoid caryophyllene oxide as major compound. The leaves of EO of *N. grandiflora* showed significantly higher yield in the spring (0.75%), which coincides with the flowering period of the species, whereas the lowest yield was obtained during the winter (0.39%). However, the chemical composition was not influenced by the seasons of collection. There were only small quantitative differences in the proportion of the major sesquiterpenoids in the EO of the leaves of *N. grandiflora*. The compound dehydrofukinone predominated during all the period, and was found at higher concentrations in the winter. In the spring, there was an increase of the contents of bicyclogermacrene, and a decrease of the concentrations of dehydrofukinone. The leaves of EO of *O. acutifolia* showed anesthetic activity against juvenile silver catfish (*Rhamdia quelen*) at concentrations ranging from 300-900 $\mu\text{L L}^{-1}$. The concentration of 100 $\mu\text{L L}^{-1}$ of *N. grandiflora* EO was not effective to the control of larvae of the Odonata order.

Key-words: Plant extracts. Lauraceae. Non-timber forest products. Seasonality.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	8
2 OBJETIVOS	11
2.1 Geral	11
2.2 Específicos	11
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
3.1 Óleos essenciais	12
3.1.1 Funções biológicas dos óleos essenciais nas plantas	13
3.1.2 Atividades biológicas dos óleos essenciais.....	14
3.1.3 Variação sazonal dos óleos essenciais	15
3.2 O gênero <i>Nectandra</i> Rol. ex Rottb.	16
3.2.1 <i>Nectandra grandiflora</i> Nees	17
3.3 O Gênero <i>Ocotea</i> Aubl	20
3.3.1 <i>Ocotea acutifolia</i> (Nees) Mez.....	21
4 MANUSCRITOS CIENTÍFICOS	24
4.1 Manuscrito 1: Análise do efeito da sazonalidade sobre o rendimento do óleo essencial das folhas de <i>Nectandra grandiflora</i> Nees.	24
4.2 Manuscrito 2: Chemical composition of essential oils of different parts of <i>Nectandra grandiflora</i> Nees and <i>Ocotea acutifolia</i> (Nees) Mez	40
4.3 Manuscrito 3: Análise da variabilidade sazonal da composição química do óleo essencial das folhas de <i>Nectandra grandiflora</i> Nees	59
5 RESULTADOS ADICIONAIS	79
5.1 Estudo do potencial sedativo/anestésico do óleo essencial de <i>Ocotea acutifolia</i> sobre juvenis de <i>Rhamdia quelen</i>	79
5.2 Estudo do potencial larvicida do óleo essencial de <i>Nectandra grandiflora</i> contra larvas de Coenagrionidae (Odonata)	84
6 DISCUSSÃO GERAL	88
7 CONCLUSÕES	93
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94
9 ANEXOS	107

1 INTRODUÇÃO GERAL

Durante muito tempo as perspectivas florestais foram voltadas somente para os recursos madeireiros e sua exploração intensiva, desconsiderando o restante do ecossistema florestal. No entanto, a valorização apenas da produção madeireira vem sendo gradualmente modificada nos últimos anos, abrindo portas para outros produtos e benefícios que as florestas podem proporcionar (SANTOS et al., 2003). Conforme Janse e Ottitsch (2005), recentemente, a atenção europeia está voltada para a ampla gama de produtos e serviços que a sociedade pode obter dos recursos florestais, e mencionam o termo “Produtos e Serviços Florestais Não – Madeiráveis” como um dos termos usados para designar tais funções florestais, além da produção madeireira.

De acordo com a classificação da FAO (2008), produtos florestais não - madeiráveis (PFNM) são produtos biológicos para consumo humano (frutos, mel, fungos) ou outros produtos como óleos essenciais, resinas, cortiças, que são derivados de florestas nativas, sistemas agroflorestais, florestas plantadas, bem como de locais cobertos com algum tipo de vegetação. Aos serviços florestais cabe a proteção contra erosão do solo, considerando-se também os valores sociais e econômicos, como atividades de lazer (turísticas, esportivas e recreativas), valores estéticos e culturais.

Atualmente os PFNM representam um dos grupos mais desafiadores do ponto de vista mercadológico, graças a seu número, versatilidade, variedade de usos e diferenciação de outros produtos básicos (SANTOS et al., 2003). Tais produtos têm sido reconhecidos como uma importante ferramenta para a conservação e manejo dos recursos naturais (BATISH et al., 2008) e como uma fonte alternativa de renda (TORRES, 2001). Além disso, o manejo florestal voltado à produção de produtos florestais não-madeireiros pode ser ecologicamente e economicamente sustentável, desde que adequadamente utilizado (CAMPBELL; TEWARI, 1996).

Deste modo, nota-se a importância que espécies produtoras de óleos detêm no que se refere ao desenvolvimento de pesquisas, bem como de programas de reflorestamentos e alternativas de manejo sustentável da flora nativa, uma vez que

alguns PFNM, dentre eles os óleos essenciais (OE) possuem alto valor no mercado. Isso se deve às conhecidas propriedades antibióticas, anti-inflamatórias, antifúngicas, analgésicas e sedativas (PINHEIRO, 2003), além da utilização dos compostos voláteis nas indústrias farmacêuticas e de perfumaria, produtos de higiene e limpeza (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009).

O Brasil é considerado o país com a maior biodiversidade do planeta, com aproximadamente 55 mil espécies de plantas nativas distribuídas nos seis principais biomas (VIEIRA; BIZZO; DESCHAMPS, 2009). No entanto, mesmo se destacando na produção de OE, ao lado da Índia, China e Indonésia, o Brasil deve esse espaço à indústria de OE obtidos a partir de espécies cítricas, principalmente da laranja (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009), demonstrando o quanto o país ainda pode crescer neste ramo.

As espécies *Nectandra grandiflora* Nees e *Ocotea acutifolia* (Nees) Mez, conhecidas popularmente como canela-amarela e canela-branca, respectivamente, pertencem à família Lauraceae, considerada como uma das famílias de maior importância econômica em virtude de suas espécies possuírem extensa aplicação (MARQUES, 2001; MELO et al., 2006). Cita-se como exemplo as espécies *Laurus nobilis* L., *Cinnamomum zeylanicum* Blume e *Cinnamomum camphora* (L.) J. Presl, que são amplamente utilizadas em condimentos, e nas indústrias de perfumaria e medicamentos, respectivamente. Muitos representantes dos gêneros *Aniba* Aubl., *Ocotea* e *Nectandra* se destacam pelo alto valor econômico de seus óleos essenciais encontrados em grande quantidade no lenho e na casca, e também pelo potencial madeireiro (MARQUES, 2001; VIEIRA; BIZZO; DESCHAMPS, 2009). Esses são alguns exemplos da diversidade de produtos gerados por este grupo de espécies, que além de destacá-los cada vez mais no mercado, estimulam a realização de pesquisas com o intuito de aprimorar os conhecimentos biológicos e químicos, visto o potencial dessas espécies.

Esta dissertação está organizada na forma de três manuscritos. Cabe ressaltar que os mesmos estão formatados de acordo com os periódicos aos quais foram submetidos. Aqueles que serão submetidos se encontram nas normas da Universidade Federal de Santa Maria.

O item destinado à Revisão de Literatura inicia com uma breve descrição sobre óleos essenciais, apresentando após uma revisão sobre os gêneros *Nectandra* e *Ocotea*, com aspectos químicos e usos gerais relativos a eles. Em

seguida, apresentam-se as espécies estudadas, *Nectandra grandiflora* Nees e *Ocotea acutifolia* (Nees) Mez, suas respectivas características botânicas, bem como dados químicos e usos descritos.

Os manuscritos são apresentados como parte dos resultados e estão inseridos no item Manuscritos Científicos. De forma geral, o manuscrito 1 aborda a variabilidade sazonal do rendimento do OE das folhas de *N. grandiflora*, o manuscrito 2 descreve a composição química do OE de diferentes órgãos de *N. grandiflora* e de *O. acutifolia*, e por fim, o manuscrito 3 avalia a variabilidade sazonal da composição química do OE das folhas de *N. grandiflora*. Nos mesmos constam Material e Métodos, Resultados, Discussão e Referências utilizadas. Aqueles resultados que não foram descritos nos Manuscritos Científicos, são apresentados em Resultados Adicionais, e descrevem os testes biológicos realizados e os resultados obtidos.

Na Discussão Geral, buscou-se realizar uma interpretação dos resultados obtidos, bem como correlacioná-los com a literatura e entre si. A dissertação é finalizada pelas Conclusões, Referências Bibliográficas e Anexos.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

O objetivo deste trabalho é analisar o rendimento e a composição química dos óleos essenciais obtidos a partir das espécies *Nectandra grandiflora* Nees e *Ocotea acutifolia* (Nees) Mez, e avaliar suas potenciais atividades biológicas.

2.2 Específicos

- Analisar a variabilidade sazonal do rendimento do óleo essencial das folhas de *N. grandiflora*, coletada no município de Jaguari, RS, no período de um ano;
- Analisar o rendimento e a composição química dos óleos essenciais extraídos de diferentes órgãos vegetais de *N. grandiflora*, coletados na primavera;
- Analisar o rendimento e a composição química dos óleos essenciais das folhas e inflorescências de *O. acutifolia* coletada no outono, no município de São Francisco de Assis, RS;
- Analisar a variabilidade sazonal da composição química do óleo essencial das folhas de *N. grandiflora*, no período de um ano;
- Investigar a atividade anestésica do óleo essencial de *O. acutifolia*, e a atividade larvicida do óleo essencial de *N. grandiflora*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Óleos essenciais

Entre os produtos do metabolismo vegetal mais promissores e de mais fácil acesso para a pesquisa de compostos úteis ao homem e aos animais encontram-se os óleos essenciais (OE), conhecidos também por essências, óleos voláteis ou óleos etéreos (SOUZA, 2007). Correspondem a misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas, líquidas de coloração amarela ou incolor, solúveis em solventes orgânicos, e instáveis na presença de luz, calor, umidade e metais (SIMÕES; SPITZER, 2004).

Os componentes dos OE, responsáveis pelas propriedades aromáticas e odoríferas das plantas, são pequenas moléculas, de baixo ponto de ebulição e elevadas pressões de vapor à temperatura ambiente. Os mesmos são originados por vias biossintéticas distintas, em geral são derivados terpenoídicos (que resultam da polimerização de unidades de isopreno) ou fenilpropanoídicos (compostos de estrutura aromática), e podem apresentar em sua constituição diversos grupos químicos funcionais, como ésteres, éteres, aldeídos, álcoois, ácidos, cetonas, óxidos, peróxidos, etc. Os compostos terpênicos são os mais frequentes nos óleos essenciais. São classificados em monoterpenóides, sesquiterpenóides e diterpenóides, conforme o número de unidades de isopreno em sua estrutura. As duas primeiras classes de derivados terpenoídicos são comuns nos OE, enquanto a terceira aparece raramente (SIMÕES; SPITZER, 2004; GANG, 2005).

Os OE podem ser sintetizados por todos os órgãos vegetais (botões florais, folhas, sementes, frutos, galhos/ramos, raízes, lenho ou casca), sendo secretados e armazenados em estruturas secretoras como cavidades, canais/dutos, idioplastos e tricomas glandulares (SIMÕES; SPITZER, 2004; BAKKALI et al., 2008; FIGUEIREDO et al., 2008). Também são obtidos por vários métodos de extração, que incluem as técnicas de prensagem ou expressão, enfloração (*enfleurage*), extração assistida por microondas, extração com solventes orgânicos, com fluido

supercrítico, arraste a vapor e hidrodestilação (SIMÕES; SPITZER, 2004; BAKKALI et al., 2008; ZHANG; YANG; WANG, 2011).

A distribuição dos OE no reino vegetal não é muito ampla, sendo encontrados em aproximadamente 50 famílias, com rara ocorrência em Gimnospermas (exceção para a família Pinaceae), e baixa em Angiospermas Monocotiledôneas (exceção para as famílias Cyperaceae e Poaceae). Entre as Angiospermas Eudicotiledôneas, citam-se as famílias Apiaceae, Asteraceae, Fabaceae, Lamiaceae, Myrtaceae, Oleaceae, Rosaceae e Rutaceae, e entre as Angiospermas Magnoliídeas, citam-se as famílias Lauraceae e Piperaceae, bastante conhecidas por suas propriedades biológicas relacionadas à presença de OE (BRUNETON, 2001; SIMÕES; SPITZER, 2004; FIGUEIREDO et al., 2008).

3.1.1 Funções biológicas dos óleos essenciais nas plantas

Os OE foram considerados, por muito tempo, como um “desperdício fisiológico” (SIMÕES; SPITZER, 2004), ou ainda, como resíduo do metabolismo vegetal (GANG, 2005). Inúmeras hipóteses foram levantadas para explicar a real importância da síntese desses compostos nas plantas. Entretanto, nas últimas décadas, o que se tem comprovado é que os OE exercem funções importantes e específicas dentro das plantas. Mesmo não sendo requeridos para o processo do metabolismo primário, como a síntese de proteínas, muitos desses compostos são vitais para a manutenção da espécie e, portanto, não são de secundária importância (GANG, 2005).

Na natureza, os OE atuam na defesa das plantas contra seus inimigos naturais, como os herbívoros (BAKKALI et al., 2008), desempenhando um papel fundamental nas interações entre planta-inseto, bem como entre planta-planta (GLINWOOD; NINKOVIC; PETTERSSON, 2011). Esses compostos podem atuar também na proteção das folhas e meristemas contra perda de água e aumento da temperatura, contribuindo para a termotolerância da planta ao estresse abiótico e, também, na remoção de espécies reativas de oxigênio (radicais livres) (GANG, 2005; GLINWOOD; NINKOVIC; PETTERSSON, 2011). Além disso, vários óleos

voláteis se mostram como potenciais agentes defensores contra bactérias, fungos e infestantes (GANG, 2005; BAKKALI et al., 2008).

Adicionalmente, estes compostos também exercem outras funções nos vegetais. Desta forma, é aceito que as substâncias voláteis emitidas pelas flores envolvem a atração e orientação dos polinizadores, agindo ainda de maneira a proteger os órgãos de reprodução contra possíveis inimigos (DUDAREVA; PICHERSKY; GERSHENZON, 2004), como é o caso do composto metileugenol, liberado pelos órgãos florais de *Clarkia breweri* (A. Gray) Greene quando a flor está receptiva à polinização (GANG, 2005). Dentre todas as espécies de plantas que florescem, 66% dependem da polinização por insetos para sua reprodução e manutenção (SCHIESTL; AYASSE, 2002; LUCAS-BARBOSA; VAN LOON; DICKE, 2011). Outra função dos OE engloba a dispersão de sementes, ou seja, alguns de seus componentes são emitidos pelos frutos para sinalizar aos organismos que o fruto está maduro e suas sementes podem ser dispersas. Essa função é baseada no fato de que algumas substâncias são especialmente produzidas quando o fruto está maduro e estão ausentes em determinados tecidos vegetais ou em frutos imaturos (GANG, 2005; SCHWAB; DAVIDOVICH-RIKANATI; LEWINSOHN, 2008).

A atividade alelopática sobre a germinação de sementes e no crescimento de plântulas também tem sido reportada como de responsabilidade de alguns compostos presentes nos OE. Zahed et al. (2010), verificaram que os OE das folhas e frutos de *Schinus molle* L. inibiram fortemente a germinação e alongação da radícula de *Triticum aestivum* L. Do mesmo modo, os OE das espécies *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. e *Lantana camara* L. mostraram atividade inibitória sobre a germinação de *Amaranthus hybridus* L. (VERDEGUER; BLÁZQUEZ; BOIRA., 2009).

3.1.2 Atividades biológicas dos óleos essenciais

Os OE, além de possuírem importância ecológica nas relações planta-planta e planta-inseto, constituem um grupo de substâncias cada vez mais estudado por sua importância econômica. Inúmeras propriedades farmacológicas estão

relacionadas a eles, sendo observadas em mamíferos, bem como em outros organismos (SCHWAB; DAVIDOVICH-RIKANATI; LEWINSOHN, 2008).

Entre as atividades biológicas encontradas em OE, seja para um composto isolado ou para a mistura volátil, estão as atividades anestésica (CUNHA et al., 2010a; SILVA et al., 2012); antifúngica (TULLIO et al., 2007; FONTENELLE et al., 2007), repelente/inseticida (NERIO; OLIVERO-VERBEL; STASHENKO, 2010; MOSSI et al., 2011), antimicrobiana (PABON; CUCA, 2010), acaricida (RIBEIRO et al., 2010), larvicida (SANTOS et al., 2012), anti-inflamatória (APEL et al., 2006) e antioxidante (YAMAGUCHI; ALCÂNTARA; VEIGA JUNIOR, 2012).

3.1.3 Variação sazonal dos óleos essenciais

A composição química e o teor de OE de uma planta são determinados geneticamente, dependentes para cada órgão vegetal e seu estágio de desenvolvimento (SIMÕES; SPITZER, 2004; FIGUEIREDO et al., 2008). Outro ponto a ser considerado, é a existência de quimiotipos, que são muito frequentes em plantas produtoras de OE (RAGGI, 2008). Além disso, as condições ambientais, climáticas e temporais também podem exercer influência sobre o metabolismo secundário das plantas (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

A produção de OE por *Siparuna guianensis* Aubl. decresceu no período vegetativo, e aumentou nos meses reprodutivos (VALENTINI et al., 2010). Já para o OE de *Artemisia annua* L. foi observado que o constituinte majoritário, artemisinina, está presente em maiores concentrações no período vegetativo, e em maior quantidade nas folhas do que nos galhos (GUPTA et al., 2002).

As variações de rendimento e composição dos OE estão correlacionadas também com a herbivoria, com o ataque de patógenos, bem como com a altitude, solo, época de coleta, frequência de ventos, idade da planta, injúria física, poluição atmosférica e estrutura de armazenamento (LIMA; KAPLAN; CRUZ, 2003; FIGUEIREDO et al., 2008). Deste modo, a época de coleta de uma planta odorífera é um dos fatores de maior importância para que se alcance uma matéria-prima de qualidade e com concentrações desejáveis de compostos ativos (GOBBO-NETO; LOPES, 2007). Conforme Vitti e Brito (1999), o rendimento e a qualidade do OE das

folhas de *E. citriodora* Hook. (atualmente *Corymbia citriodora* (Hook.) K. D. Hill & L. A. S. Johnson) aumentam nos meses mais quentes do ano, devido ao baixo teor de umidade. Barros et al. (2009), verificaram que o teor de OE de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Br. ex Britton & P. Wilson aumenta no verão e na primavera, bem como os níveis do constituinte germacreno D na mistura volátil.

3.2 O gênero *Nectandra* Rol. ex Rottb.

A família Lauraceae tem sua distribuição geográfica nas regiões tropicais e subtropicais do planeta, sendo representada por cerca de 50 gêneros e em torno de 2.500 a 3.000 espécies de árvores e arbustos (VAN DER WERFF; RICHTER, 1996). No Brasil, ocorrem cerca de 24 gêneros e aproximadamente 400 espécies de Lauráceas (SOUZA; LORENZI, 2012).

Conforme Van der Werff (1991), o gênero *Nectandra* Rol. ex Rottb. é o segundo em importância entre as Lauráceas neotropicais, por possuir cerca de 120 espécies reconhecidas até o presente. No Brasil, o gênero *Nectandra* encontra-se representado por 43 espécies, com grande diversidade nas Florestas Amazônica e Atlântica (BAITELLO et al., 2003 apud ALVES; SARTORI, 2009). O gênero é composto por árvores ou arbustos monóicos, com folhas alternas, raras opostas e subopostas, com inflorescência tirsóide ou panícula, e fruto bacáceo, elipsóide ou sub-globuloso (QUINET; ANDREATA, 2002).

Nectandra está entre os gêneros de Lauraceae que apresentam maior número de espécies de importância econômica de Lauraceae, juntamente com *Aniba* e *Ocotea*. Esses gêneros são amplamente utilizados como temperos e especiarias na culinária, como matéria-prima para a fabricação de papel, construção civil, marcenaria, perfumes, indústria química e farmacêutica, bem como na medicina popular (GOTTLIEB, 1972; MARQUES, 2001; MELO et al., 2006).

Algumas espécies de *Nectandra* são amplamente utilizadas na medicina tradicional, como diuréticos, digestivos, antifúngicos e anestésicos (MELO et al., 2006; BRITO, 2009). Os frutos e as folhas de *N. pichurim* (Kunth) Mez são odoríferos e usados contra cólicas e problemas gástricos e o lenho de *N. rodiei* Schomb. ex Meissner é reconhecido como tônico e antipirético (MARQUES, 2001). Pesquisas

científicas evidenciaram atividade antitumoral para os extratos etanólicos das folhas de *N. rigida* (Kunth) Nees (LE QUESNE; LARRAHONDO; RAFFAUF, 1980). Propriedades anti-inflamatórias foram descritas para as espécies *N. angustifolia* (Schrad.) Nees (sin. *N. falcifolia*) e *N. megapotamica* (Spreng.) Mez (MELO et al., 2006; SILVA FILHO et al., 2004). Esta última espécie apresentou também propriedades antibacterianas contra *Candida albicans*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* e *Aspergillus niger* (BARNECHE et al., 2010). A espécie *N. salicifolia* (Kunth) Nees apresentou atividade antimalárica (BÖHLKE et al., 1996), sendo utilizada também como relaxante vascular (SLISH et al., 1999).

Os OE presentes em espécies de *Nectandra*, bem como suas propriedades biológicas são pouco estudados. Na literatura são reportados estudos farmacológicos de óleos essenciais de *N. salicina* C.K. Allen e *N. membranacea* (Sw.) Griseb., que apresentaram propriedades antitumorais (CICCIÓ; CHAVERRI; DÍAZ, 2009; WERKA; BOEHME; SETZER, 2007), e de OE de *N. megapotamica* como sendo potenciais antimicrobianos frente à bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* (BRITTO, 2009). O OE de *N. megapotamica* também exibiu propriedades anti-inflamatórias (APEL et al., 2006), e atividade anestésica frente à juvenis de robalo (TONDOLO, 2011).

3.2.1 *Nectandra grandiflora* Nees

As características botânicas da espécie *N. grandiflora* foram descritas por Lorenzi (2002) como correspondentes a:

Árvore de cerca de 10-15 m de altura, perene, dotada de copa globosa densa, com ramos novos levemente angulares. Tronco ereto e mais ou menos cilíndrico, com casca quase lisa, de 40-70 cm de diâmetro. Folhas alternas, simples, coriáceas, geralmente glabras em ambas as faces, de 5-15 cm de comprimento por 2-6 cm de largura, sobre pecíolo de 4-10 cm de comprimento. Inflorescências em panículas axilares e terminais, glabras e glaucas, contendo muitas flores de cor branca e muito perfumadas. Fruto baga elipsóide, glabra, de 15-10 mm de comprimento, com polpa carnosa e de cor preta quando madura. (LORENZI, 2002).

Considerada como endêmica do Brasil, a espécie *N. grandiflora* é encontrada predominantemente nos biomas Mata Atlântica e Cerrado, entre os estados de

Minas Gerais e Rio Grande do Sul (QUINET et al., 2010; Figura 1). Conhecida popularmente como canela-amarela, canela-fedida e canela-cheirosa, é uma planta heliófila e secundária, sendo uma das espécies de melhor regeneração dentro da floresta (PIZZATO, 1999; LORENZI, 2002).

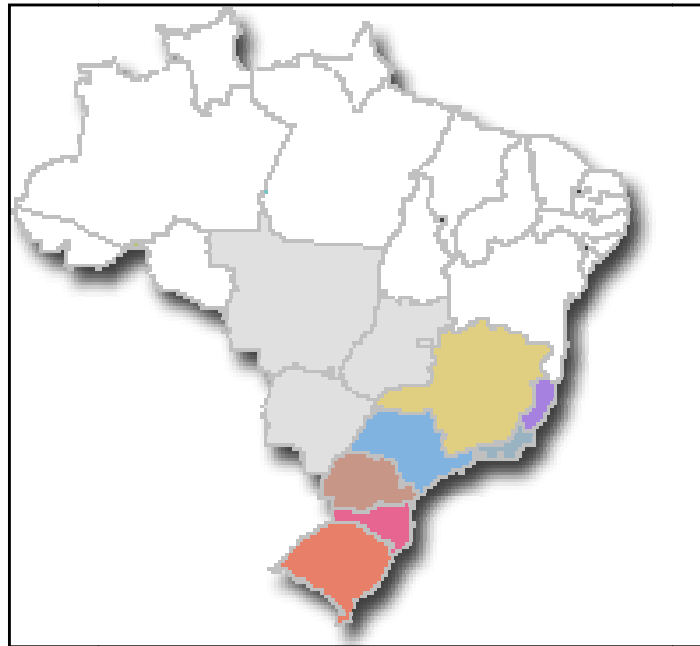


Figura 1 – Distribuição geográfica da espécie *Nectandra grandiflora* Nees.

Fonte: Flora do Brasil.

A espécie possui as seguintes sinonímias: *Gymnobalanus regnellii* Meisn., *Nectandra glauca* Warm. ex Meisn., *Nectandra grandiflora* var. *cuneata* Meisn., *Nectandra grandiflora* var. *latifolia* Nees, *Nectandra grandiflora* var. *longifolia* Meisn., *Nectandra grandiflora* var. *oblongifolia* Nees e *Nectandra grandiflora* var. *obovata* Meisn. (Tropicos.org).

No Rio Grande do Sul, esta espécie participa da composição florística, porém de forma esporádica, das Florestas do Alto Uruguai, Serra do Sudeste, Depressão Central e Campos de Cima da Serra (SOBRAL et al., 2006). É frequente em formações semi-abertas como matas ciliares, capoeiras e matas de pinhais, em altitudes compreendidas entre 600-1300 m (LORENZI, 2002), preferindo sítios bem drenados e a encosta superior de morros (MARCHIORI, 1997).

Com porte pequeno (Figura 2), *N. grandiflora* não é considerada como de grande expressão madeireira (PIZZATO, 1999). Apresenta madeira com cheiro fortemente adocicado e desagradável, porém sem o odor de excremento presente em outras espécies de Lauraceae (ZANON; GOLDENBERG; MORAES, 2009). As folhas, flores e a casca também possuem odor característico. A floração da espécie ocorre entre os meses de agosto a outubro e a frutificação de janeiro a março (MARCHIORI, 1997).

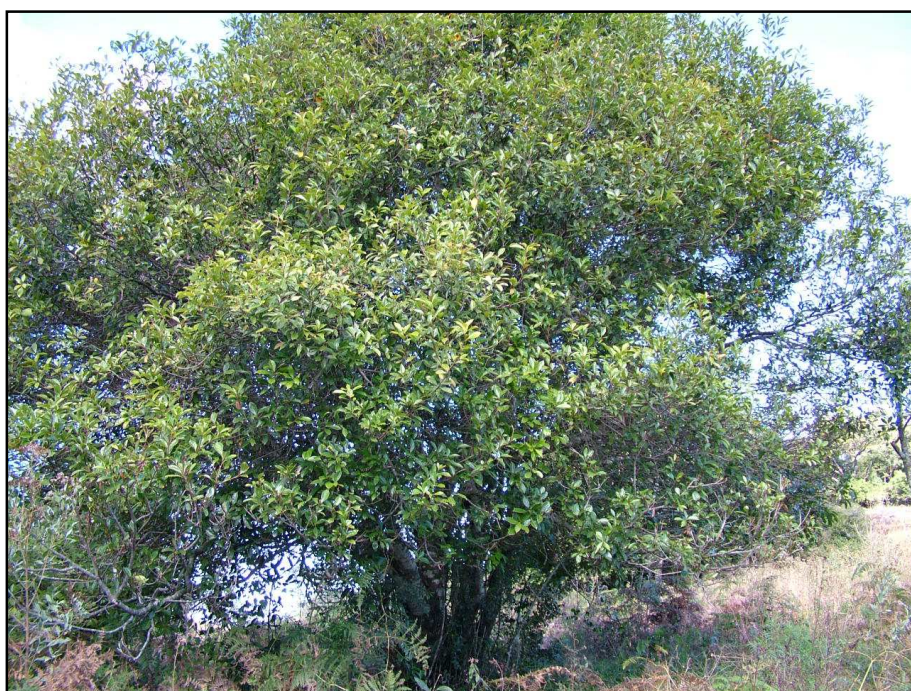


Figura 2 – Exemplar de *Nectandra grandiflora* Nees, Jaguari, RS.

Autor: Longhi, S. J.

Na medicina popular, a canela-amarela é utilizada como anti-reumática, diurética e digestiva (RAGGI, 2008). Estudos químicos e farmacológicos preliminares realizados com essa espécie evidenciaram atividade antitumoral do extrato etanólico de sua casca, que produziu efeito inibitório do sarcoma 180 e do carcinoma de Ehrlich implantados em ratos (MORENO et al., 1993). Já o extrato etanólico de suas folhas mostrou atividade antioxidante frente ao β -caroteno (RIBEIRO et al., 2005).

O OE de *N. grandiflora* foi estudado somente por Cunico et al. (2010). Estes autores identificaram um total de 33 componentes presentes no OE das folhas,

sendo eles: ciclosativeno, α -copaeno, iso- β -elemeno, β -bourboneno, β -elemeno, longifoleno, *E*-cariofileno, aromadendreno, α -himachaleno, alo-aromadendreno, 9-epi-*E*-cariofileno, 4,5-di-epi-aristolocheno, β -chamigreno, γ -muuroleno, aristocheleno, β -selineno, γ -amorfenno, viridifloreno, germacreno A, *Z*-dracunculifoliol, elemol, espatulenol, globulol, β -4 α -copaenol, epóxido de β -cedreno, 10-epi- γ -eudesmol, eremoligenol, gimnomitrol, alo-himachalol, eremofilona, esclareno e caureno. Os mesmos autores evidenciaram que o mesmo OE contém substâncias com potencial antimicrobiano frente à bactéria *S. aureus*.

3.3 O Gênero *Ocotea* Aubl.

O gênero *Ocotea* Aubl. é considerado o maior da família Lauraceae na região Neotropical, com cerca de 350 espécies, a maioria nas Américas tropical e subtropical. No Brasil, estima-se que ocorram entre 120 a 160 espécies (BAITELLO, 2001). O gênero é composto por árvores e arbustos, monóicos, dióicos ou gimnodióicos, com folhas em geral alternas, raramente opostas ou subopostas, inflorescência tirsíode-paniculada ou racemiforme, e fruto bacáceo envolvido pela cúpula (ALVES; ISHII, 2007).

Este gênero apresenta o maior número de espécies com usos medicinais, sendo utilizadas contra cefaleias, reumatismo, intoxicações metálicas, sífilis, dermatoses, problemas no trato urinário, como tônicas, estomáquicas, diuréticas, etc. (ZSCHOCKE et al., 2000a; 2000b; MARQUES, 2001; BACKES; IRGANG, 2009). Estudos científicos evidenciaram atividade antiprotozoária contra *Trypanosoma cruzi* e três cepas de *Leishmania* para alcalóides presentes em *O. lancifolia* (Schott) Mez (FOURNET et al., 2007). A atividade antinociceptiva foi descrita para substâncias presentes no extrato clorofórmico dos frutos de *O. puberula* (Rich.) Nees (MONTRUCCHIO et al., 2012), e atividade antimicrobiana contra *S. aureus*, *E. coli*, *Enterococcus faecalis* e *Salmonella tiphymurium* foi relatada para compostos isolados dos galhos de *O. macrophylla* Kunth (PABON; CUCA, 2010). Propriedades antioxidantes foram observadas para os extratos etanólicos foliares de *O. minor* Vicent., *O. nigrescens* Vicent., *O. leucoxylo* (Sw.) Laness., *O. ceanothifolia* (Nees)

Mez (YAMAGUCHI; ALCÂNTARA; VEIGA JUNIOR, 2012), e *O. catharinensis* (FUNASKI, 2006) e atividade anti-inflamatória para *O. bullata* (Burch.) E. Meyer in Drege (ZSCHOCKE et al., 2000b). Propriedades sobre o Sistema Nervoso Central foram descritas para as espécies *O. duckei* Vattimo-Gil, *O. cujumarum* Mart. e *O. opifera* Mart. (MORAIS; BARBOSA-FILHO; ALMEIDA, 1998; GIOGERTTI; NEGRI; RODRIGUES, 2007).

São muitas as pesquisas realizadas sobre a composição e atividades biológicas dos OE presentes em espécies de *Ocotea*. Entre as atividades observadas para esse grupo de metabólitos secundários podem-se citar ação antiplaquetária e vaso relaxante para o OE das folhas de *O. quixos* (Lam.) Kosterm. (BALLABENI et al., 2007), antibacteriana para os OE de *O. quixos* (BRUNI et al., 2004), *O. bofo* Kunth (GUERRINI et al., 2006) e *O. notata* (Nees & Mart.) Mez (GARRETT et al., 2007), bem como atividade antifúngica para os OE de *O. odorifera* (Vell.) Rohwer (CASTRO; LIMA, 2011) e *O. bofo* (GUERRINI et al., 2006). Werka et al. (2007), evidenciaram que o OE de *O. floribunda* (Sw.) Mez se mostrou eficiente como antibacteriano frente a *S. aureus*, citotóxico (carcinoma hepatocelular), bem como ativo contra *Artemia saligna*. Outras atividades foram descritas como de responsabilidade dos OE presentes em representantes do gênero *Ocotea*, como anti-inflamatória (BALLABENI et al., 2010), cardiovascular (BARBOSA-FILHO et al., 2008), larvicida (PINTO JUNIOR et al., 2010) e moluscicida (DIAS et al., 2006).

3.3.1 *Ocotea acutifolia* (Nees) Mez

Ocotea acutifolia (Nees) Mez é uma espécie ripária, de tamanho mediano e nativa do Uruguai, Argentina até o Brasil, onde ocorre do Mato Grosso do Sul até o Rio Grande do Sul, bem como no estado de Minas Gerais (Figura 3). No Rio Grande do Sul é encontrada na Serra do Sudeste, Campanha e Depressão Central (SOBRAL et al., 2006; QUINET et al., 2011).

Conhecida popularmente por canela ou canela-branca, *O. acutifolia* foi descrita por Klein (1966), da seguinte forma:

Espécie seletiva xerófila, bastante frequente no alto das encostas, topo de morros, bem como em declives fortes, caracterizando-se principalmente pela sua distribuição irregular através da Formação da Araucária. Parece preferir como agrupamentos preferenciais os imbuiais, bem como associações pioneiras da mata pluvial subtropical do oeste. Em virtude deste fato, observa-se uma sensível irregularidade quanto à frequência, contudo sua distribuição pela mata subtropical é um pouco mais uniforme. (KLEIN, 1966).

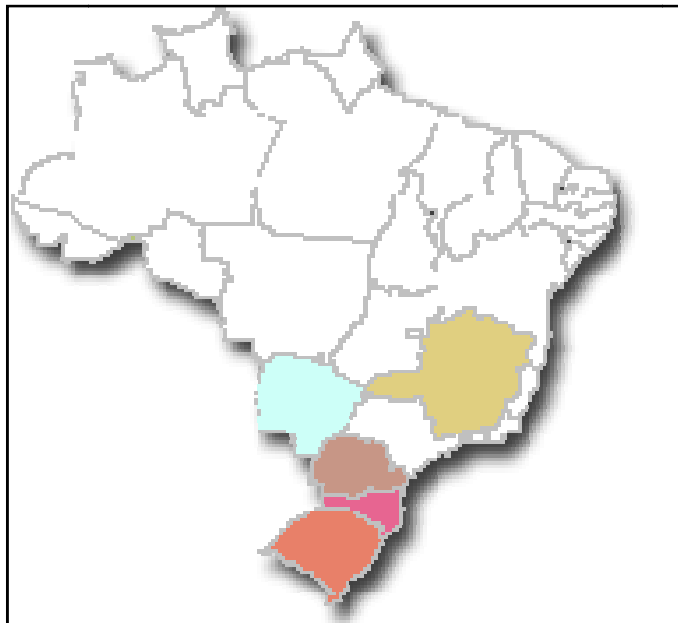


Figura 3 – Distribuição geográfica da espécie *Ocotea acutifolia* (Nees) Mez.

Fonte: Flora do Brasil.

Marques (2001) relata que a espécie possui madeira adequada para uso em marcenaria e construção civil. Os estudos fitoquímicos e biológicos relatados até o momento para esta espécie são escassos. Garcez et al. (2011) relatou a citotoxicidade de oito alcalóides aporfínóides isolados a partir do extrato etanólico das folhas e da casca do tronco de *O. acutifolia* contra células cancerígenas de humanos. Barneche et al. (2010) evidenciaram atividade antimicrobiana do extrato diclorometânico foliar, contra *S. aureus* e *B. subtilis*, e do extrato acetônico foliar, contra *S. aureus*, *B. subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *C. albicans* (Figura 4).



Figura 4 – Inflorescência de *Ocotea acutifolia* (Nees) Mez.

Fonte: FloraRS.

4 MANUSCRITOS CIENTÍFICOS

4.1 Manuscrito 1

SILVA, D. T.; BIANCHINI, N. H.; AMARAL, L. P.; LONGHI, S. J.; HEINZMANN, B. M.
Análise do efeito da sazonalidade sobre o rendimento do óleo essencial das folhas de *Nectandra grandiflora* Nees, submetido à Revista *Árvore*.

1 **Análise do efeito da sazonalidade sobre o rendimento do óleo essencial das folhas de**
2 ***Nectandra grandiflora* Nees**

3
4
5 **RESUMO**

6
7 Este estudo teve por objetivo avaliar o efeito da sazonalidade sobre o teor de óleo essencial
8 (OE) presente nas folhas de *Nectandra grandiflora* Nees e determinar se o processo de
9 secagem do material vegetal influencia no rendimento deste extrativo. Para tanto, foi coletado
10 material vegetal de 12 indivíduos ao longo de um ano e o OE foi extraído separadamente de
11 folhas frescas e folhas secas à temperatura ambiente, pelo método de hidrodestilação.
12 Paralelamente, 20 g de folhas frescas foram levados à estufa a 40°C até peso constante, para
13 determinação do teor de umidade, procedimento este realizado para cada coleta,
14 individualmente. O rendimento de OE das folhas (% m/m) foi calculado para o material
15 vegetal fresco com base à massa seca, determinado considerando o teor de umidade, bem
16 como para o material seco à temperatura ambiente. Os resultados mostraram que o teor de OE
17 das folhas da espécie apresentou variabilidade sazonal, sendo a maior produção detectada na
18 primavera ($0,75 \pm 0,06\%$), e o menor rendimento no inverno ($0,39 \pm 0,02\%$). Desse modo,
19 indica-se que a coleta de material vegetal de *N. grandiflora* seja realizada durante o período
20 da floração da espécie, ou seja, de agosto a outubro. Adicionalmente, verificou-se que não há
21 perda de teor OE durante o processo de secagem à temperatura ambiente e, desta forma esse
22 procedimento pós-colheita poderá vir a ser adotado sem comprometer o rendimento do
23 extrativo.

24
25
26
27
28
29
30
31
32
33 **Palavras-chave:** extrativos vegetais, Lauraceae, produtos florestais não-madeireiros.

34 **Analysis of the effect of seasonality on the essential oil yield of leaves of**
35 ***Nectandra grandiflora* Nees**

36
37
38 **ABSTRACT**

39
40 This study aimed to evaluate the effect of seasonal variability on the essential oil (EO) yield
41 present in leaves of *Nectandra grandiflora* Nees and as well as to determine whether the
42 drying process of the plant material influences the yield of this extractive. Plant material was
43 collected from 12 individuals over a year and EO was extracted by hydrodistillation
44 separately from fresh and dried leaves at room temperature. Simultaneously, 20 g of fresh
45 leaves was taken to stove at 40 °C to constant weight for determination of moisture content.
46 This procedure was performed for each collection individually. The yield of EO in leaves (%
47 w/w) was calculated for fresh plant material based on dry matter, determined by considering
48 the moisture content, as well as for the dried material at room temperature. Results showed
49 that the content of EO in the leaves showed seasonal variability with the highest production
50 detected in spring ($0.75 \pm 0.06\%$) and the lowest yield in winter ($0.39 \pm 0.02\%$). Thereby, it is
51 recommended that the leaves of *N. grandiflora* be collected from August to October, which is
52 the flowering period of the species. Additionally, no loss of EO content during the drying
53 process at room temperature occurred thus this postharvest procedure could be adopted
54 without compromising the extractive yield.

55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66 **Keywords:** plant extracts, Lauraceae, non-timber forest products.

67 1. INTRODUÇÃO

68

69

70 As espécies fornecedoras de produtos florestais não-madeireiros, como as produtoras
71 de óleo essencial (OE), têm sido reconhecidas como uma fonte alternativa de renda e como
72 uma importante ferramenta para conservação e o manejo dos recursos florestais (TORRES,
73 2001; BATISH et al., 2008). As plantas odoríferas podem alcançar alto valor no mercado
74 (MARQUES, 2001), além de contribuírem para o conhecimento do potencial econômico dos
75 biomas, visando à utilização sustentável de seus recursos.

76 Desde a Antiguidade, os OE são amplamente utilizados devido as suas propriedades
77 antifúngicas, antibacterianas, antiparasitárias e inseticidas. Atualmente, são conhecidos
78 aproximadamente 3000 OE, sendo que destes 300 são comercialmente importantes. Isto se
79 deve ao fato de possuírem aplicação na perfumaria, em produtos de limpeza, cosmética,
80 conservação de alimentos, como coadjuvantes de medicamentos e na indústria farmacêutica
81 (BAKKALI et al., 2008; BIZZO et al., 2009).

82 *Nectandra grandiflora* Nees (Lauraceae), conhecida popularmente como canela-
83 amarela, é uma espécie endêmica do Brasil, encontrada predominantemente nos biomas Mata
84 Atlântica e Cerrado (LORENZI, 2002). Na medicina popular, *N. grandiflora* é utilizada como
85 anti-reumática, diurética e digestiva (RAGGI, 2008). Os estudos farmacológicos realizados
86 com o OE das folhas dessa espécie são poucos e indicam potencial antimicrobiano (CUNICO
87 et al., 2010).

88 Há inúmeros fatores que podem levar a variações na quantidade e constância da
89 composição de metabólitos secundários, como fatores ambientais e climáticos, poluição
90 atmosférica, solo, bem como fatores inerentes à própria planta, como idade e ciclo de
91 desenvolvimento, etc. Desse modo, fica clara a necessidade de se desenvolver estudos que
92 avaliem as condições e épocas para coleta, conduzindo assim a uma elevada produção de
93 matéria-prima e qualidade da mesma (GOBBO-NETO e LOPES, 2007; FIGUEIREDO et al.,
94 2008). Considerando os aspectos acima expostos, o presente estudo visou analisar o efeito da
95 sazonalidade sobre o rendimento de OE das folhas de *Nectandra grandiflora*, buscando
96 definir a época de colheita do material vegetal em função da maior produção de compostos
97 voláteis. Adicionalmente, buscou-se determinar se há diminuição dos teores de OE após a
98 secagem do material, com o objetivo de avaliar o possível uso deste procedimento pós-
99 colheita.

100 2. MATERIAL E MÉTODOS

101

102

103 2.1 Obtenção do material vegetal

104

105 O material vegetal de *N. grandiflora* Nees foi coletado em população nativa, em área
106 no município de Jaguari, Rio Grande do Sul, localizada sob as coordenadas geográficas -29°
107 26'25,09" de latitude e -54°40'27,73" de longitude. A espécie foi identificada pelo Prof.
108 Solon Jonas Longhi, e uma exsicata de registro SMDB 13.162 encontra-se arquivada no
109 herbário do Departamento de Biologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).
110 Para a avaliação do rendimento sazonal do OE, foram coletadas folhas de doze indivíduos
111 (três indivíduos em cada estação) da espécie entre os meses de julho 2011 até junho de 2012.

112

113 2.2 Determinação do teor de umidade

114

115 Para a determinação da umidade, preparou-se uma amostra de aproximadamente 20 g
116 de folhas frescas de cada indivíduo. Após, estas foram submetidas à secagem em estufa a
117 40°C, até peso constante. O teor de umidade presente em cada amostra foi calculado através
118 da fórmula $\frac{P_{úmido} - P_{seco}}{P_{úmido}} \times 100$. A fim de se comprovar a influência do teor de água sobre o
119 teor de OE, utilizaram-se, para os cálculos de rendimento, os valores de massa das folhas
120 frescas em relação à massa fresca (MF BU) e à massa seca (MF BS) do material vegetal. A
121 massa foliar à base seca (MF BS) foi corrigida pelo teor de umidade presente no material
122 vegetal, através da fórmula $MF\ BU - \frac{TU - MF\ BU}{100}$, em que MF BU é equivalente à massa das
123 folhas frescas usadas nas extrações dos OE.

124

125 2.3 Obtenção do óleo essencial

126

127 O material vegetal picado, composto de folhas frescas e folhas secas à temperatura
128 ambiente e à sombra, durante 15 dias, foi submetido separadamente à hidrodestilação,
129 utilizando-se o aparelho Clevenger modificado (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010),
130 acoplado a um balão de fundo redondo, com capacidade de 5 L, durante 3 h. As extrações
131 foram realizadas em triplicatas, com aproximadamente 500 g de folhas frescas e 300 g de
132 folhas secas em cada balão. O teor de OE foi obtido por pesagem em balança de precisão e

133 posterior cálculo do rendimento (% m/m), em relação à massa foliar à base úmida (MF BU),
134 massa foliar à base seca (MF BS) e massa foliar seca à temperatura ambiente (FS). Os OE
135 obtidos foram armazenados em frascos de vidro âmbar, vedados e conservados à - 4°C.

136

137 2.4 Análise estatística

138

139 Os valores dos rendimentos foram transformados para $\text{arc sen } \frac{\sqrt{R\%}}{100}$, antes da análise
140 estatística. Para a verificação da normalidade dos dados e homogeneidade de variâncias, os
141 dados foram submetidos aos testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. A análise de
142 variância (ANOVA) de uma via, os testes Tukey, Mann-Whitney e teste t foram usados para
143 comparar os dados de rendimento, que estão apresentados por média \pm EPM. As análises
144 foram realizadas no software SigmaPlot, versão 11.0, com o nível mínimo de significância
145 ($P < 0,05$).

146

147

148 3. RESULTADOS

149

150

151 O rendimento médio obtido para o OE das folhas frescas (MF BS) de *N. grandiflora*
152 em um ano de coleta foi igual a $0,54 \pm 0,03\%$, enquanto que para folhas secas, o rendimento
153 médio correspondente foi de $0,51 \pm 0,02\%$. O OE extraído das folhas frescas (MF BS) de *N.*
154 *grandiflora* apresentou variabilidade sazonal significativa em relação ao rendimento
155 segundo o teste Tukey, uma vez que aqueles indivíduos coletados durante a primavera
156 apresentaram teores significativamente maiores em comparação com os indivíduos coletados
157 nas demais estações do ano (Figura 1).

158

159 A quantidade de OE armazenado nas folhas frescas (MF BS) de *N. grandiflora*
160 apresentou um rendimento máximo de $0,75 \pm 0,06\%$ na primavera, período que coincide com
161 a floração da planta, e com o maior nível de umidade (49,09%). Durante o inverno foi
162 verificado um menor rendimento de OE nas folhas frescas (MF BS), igual a $0,39 \pm 0,02\%$,
163 período este em que o teor de umidade das folhas também foi o mais baixo (40,76%) (Figura

164 A fim de se avaliar a influência da secagem sobre o teor de OE de *N. grandiflora*, os
165 rendimentos obtidos para as folhas secas à temperatura ambiente (FS) foram comparados

166 com aqueles obtidos para as folhas frescas, corrigidos pela umidade (MF BS), onde foi
167 observado que não há diferença significativa entre ambos os rendimentos para cada estação
168 do ano. Esses resultados indicam que houve perda por dessecação das folhas, não tendo
169 ocorrido diminuição do teor de OE por influência da secagem à temperatura ambiente.

170 Realizou-se, paralelamente, a contraprova desse resultado, uma vez que os dados
171 obtidos para os rendimentos da MF BU são diferentes estatisticamente daqueles obtidos a
172 partir de MF BS e FS, em cada período sazonal (Figura 3). Esta análise somente foi descrita
173 a fim de se confirmar que há influência do teor de água presente nas folhas sobre o teor de
174 voláteis, sendo necessária a retirada da massa de água dos cálculos e avaliações de
175 rendimento.

176

177

178 4. DISCUSSÃO

179

180

181 O rendimento médio anual à base seca do OE das folhas frescas (MF BS) de *N.*
182 *grandiflora* verificado no presente estudo foi inferior ao encontrado em espécies de outros
183 gêneros da família Lauraceae, considerando-se o mesmo órgão vegetal. A espécie *Ocotea*
184 *porosa* (Nees & Mart.) Barroso apresentou um teor de 0,82% (BRITO, 2009), enquanto que
185 Taveira et al. (2003) obtiveram rendimentos entre 0,5-0,8% para *Aniba canelilla* (Kunth)
186 Mez. Já *O. quixos* (Lam) Kosterm apresentou teor de OE equivalente a 1,6% (SACCHETTI et
187 al., 2006). No entanto, em comparação com outras espécies de *Nectandra*, verificou-se que o
188 OE obtido da canela-amarela apresentou um rendimento superior à *N. salicina* C. K. Allen e à
189 *N. megapotamica* (Spreng.) Mez (APEL et al., 2006; CICCIO et al., 2009).

190 O efeito da sazonalidade sobre o rendimento de OE também foi verificado para
191 espécies como *O. porosa* e *N. megapotamica*, *A. canelilla*, *O. odorifera* (Vell.) Rohwer,
192 *Corymbia s citriodora* (Hook.) K.D. Hill & L.A.S. Johnson e *Siparuna guianensis* Aubl.
193 (VITTI and BRITO; 1999; TAVEIRA et al., 2003; CASTELANI et al., 2006; BRITO, 2009;
194 VALENTINI et al., 2010). Nesses estudos, observou-se que a quantidade e a composição
195 volátil muitas vezes são dependentes da espécie e das fases fenológicas em que a mesma se
196 encontra. Conforme Gobbo-Neto e Lopes (2007), a tendência no aumento do rendimento dos
197 OE é mais susceptível ao ciclo vegetativo que às variações climáticas observadas.

198 Pesquisas fenológicas com *N. grandiflora* realizadas no sul do Brasil confirmam que a
199 espécie floresce de agosto a outubro (CARVALHO, 1980; MARCHIORI, 1997). O período
200 de floração coincidiu com os maiores teores de OE das folhas de *N. grandiflora*, ou seja,
201 houve um aumento significativo no teor de OE durante a estação da primavera. A
202 variabilidade sazonal encontrada para o OE das folhas de *N. grandiflora* é similar à observada
203 para as partes aéreas de *Baccharis dracunculifolia* DC. e *B. uncinella* DC., que conforme
204 FRIZO et al. (2008), devem ser coletadas durante a estágio de plena floração.

205 Adicionalmente, foi observado que os níveis de umidade presentes nas folhas foram
206 diretamente proporcionais aos teores de OE no mesmo material vegetal durante o período de
207 estudo. Desse modo, há indícios que o rendimento de OE possa estar ligado também à
208 disponibilidade hídrica do solo, como detectado em *O. odorifera* e *Casearia sylvestris* Sw.
209 (CASTELANI et al., 2006).

210 Os compostos voláteis são produzidos por células secretoras especializadas que
211 minimizam o risco de autotoxicidade e, simultaneamente, permitem a presença de
212 concentrações elevadas de metabólitos secundários em locais onde sua função de defesa e/ou
213 atração pode ser vital (FIGUEIREDO et al., 2008). Uma das possíveis explicações para a
214 permanência de compostos voláteis nas folhas de *N. grandiflora* mesmo após sua secagem
215 relaciona-se à morfoanatomia das suas folhas. As substâncias lipofílicas e mucilaginosas
216 presentes em espécies da família Lauraceae são secretadas por estruturas internas
217 denominadas idioblastos, que são encontrados em meio ao parênquima paliçádico e/ou
218 esponjoso (FARAGO et al., 2005; COUTINHO et al., 2006; FIGUEIREDO et al., 2008;
219 MARANHO et al., 2009). Os idioblastos secretores se distinguem das estruturas
220 multicelulares pelo conteúdo, forma, tamanho e espessamento da parede (FARAGO et al.,
221 2005), motivo pelo qual o OE contido nessas estruturas possui um padrão de volatilidade
222 distinto daquele OE presente em estruturas secretoras externas como os tricomas, que
223 dependendo do método de secagem, são fortemente afetados (VENSKUTONIS, 1997;
224 HAMOROUNI SELLAMI et al., 2012).

225 No entanto, estudos da literatura indicam que mesmo que os OE estejam armazenados
226 em células internas, a análise dos métodos de secagem deve ser realizada. Costa et al. (2005)
227 relatam o uso do desumidificador como um método eficiente para a secagem do material
228 vegetal antes da extração do OE, visando manter as características originais de *Cymbopogon*
229 *citratus* (DC.) Stapf.

230

231 5. CONCLUSÃO

232

233

234 A espécie *Nectandra grandiflora* apresenta variação sazonal do rendimento do óleo
235 essencial das folhas, que pode ocorrer em função da sua fenologia e teor de umidade presente
236 no material vegetal. O melhor rendimento foi obtido no período de floração, ou seja, indica-se
237 que a coleta de material vegetal seja realizada entre os meses de agosto a outubro. Uma vez
238 que não houve perda de óleo essencial através do processo de secagem branda, o material
239 vegetal pode ser submetido a este processamento pós-colheita sem comprometer o rendimento
240 do extrativo. No entanto, pesquisas envolvendo a composição química do óleo essencial bem
241 como a comparação entre diferentes métodos de secagem devem ser realizadas a fim de se
242 otimizar a obtenção do extrativo das folhas desta espécie.

243

244

245 6. AGRADECIMENTOS

246

247

248 Este estudo teve o suporte financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do
249 Rio Grande do Sul (FAPERGS/PRONEX, Documento No. 10/0016-8), do Conselho Nacional
250 de Pesquisa e Desenvolvimento Científico (CNPq, Documento No. 470964/2009-0). Os
251 autores são gratos à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pesquisa de Nível Superior
252 (CAPES) e ao CNPQ pelas bolsas concedidas, bem como ao Engenheiro Agrônomo Jorge
253 Diefenthaler pela colaboração na coleta do material vegetal.

254

255

256 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

257

258

259 APEL, M. A. et al. Screening of the biological activity from essential oils of native species
260 from Atlantic rain forest (São Paulo - Brazil). **Pharmacologyonline**, v. 3, p. 376-383, 2006.

261

262

- 263 BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils – A Review. **Food and Chemical**
264 **Toxicology**, v. 46, p. 446-475, 2008.
- 265
266
- 267 BATISH, D. R. et al. *Eucalyptus* essential oil as a natural pesticide. **Forest Ecology and**
268 **Management**, v. 256, p. 2166-2174, 2008.
- 269
270
- 271 BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C. e REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos
272 gerais, desenvolvimento e perspectivas **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 588-594, 2009.
- 273
274
- 275 BRITO, A. F. R. **Análise da variação sazonal e das atividades antifúngica e**
276 **antimicrobiana em óleos essenciais de *Ocotea porosa* (Nees) Barroso e *Nectandra***
277 ***megapotamica* (Spreng.) Mez.** 2009. 261 f.. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) –
278 Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.
- 279
280
- 281 CARVALHO, P. E. R. Levantamento florístico da região de Irati-PR (1ª aproximação).
282 **Circular Técnica EMBRAPA**, n. 3, Curitiba, PR, 1980.
- 283
284
- 285 CASTELLANI, D. C. et al. Produção de óleo essencial em canela (*Ocotea odorifera* Vell) e
286 guaçatonga (*Casearia sylvestris* Swartz) em função da época de colheita. **Revista Brasileira**
287 **de Plantas Mediciniais**, v. 8, n.4, p.104-107, 2006.
- 288
289
- 290 CICCIO, J. F.; CHAVERRI, C. e DÍAZ, C. Volatile compounds of *Nectandra salicina*
291 (Lauraceae) from Costa Rica and their cytotoxic activity on cell lines. **Química Nova**, v. 32,
292 n. 2, p. 417-420, 2009.
- 293
294

- 295 COSTA, L. C. B. et al. Secagem e fragmentação da matéria seca no rendimento e composição
296 do óleo essencial do capim-limão. **Horticultura Brasileira**, v. 23, p. 956-959, 2005.
297
298
- 299 COUTINHO, D. F. et al. Morfo-anatomia foliar de *Ocotea gardneri* (Meisn.) Mez
300 (Lauraceae-Lauroideae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 16, p. 178-184, 2006.
301
302
- 303 CUNICO, M. M. et al. Estudo preliminar antimicrobiano e fitoquímico do óleo essencial
304 foliar da *Nectandra grandiflora* Nees (canela-amarela). In: INTERNATIONAL
305 CONFERENCE ON EDUCATION FOR SUSTAINABLE DEVELOPMENT, 2010, Curitiba.
306 **Anais ...Curitiba, Brasil: UFPR, 2010.**
307
308
- 309 **FARMACOPEIA BRASILEIRA**, 5a ed. São Paulo: Atheneu, 2010.
310
311
- 312 FARAGO, P. V. et al. Análise morfoanatômica de folhas de *Ocotea puberula* (Rich.) Nees,
313 Lauraceae. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 15, p. 250-255, 2005.
314
315
- 316 FIGUEIREDO, A. C. et al. Factors affecting secondary metabolite production in plants:
317 volatile components and essential oils. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 23, p. 213-226,
318 2008.
319
320
- 321 FRIZO, C. D. et al. Essential oil variability in *Baccharis uncinella* DC and *Baccharis*
322 *dracunculifolia* DC growing wild in southern Brazil, Bolivia and Uruguay. **Flavour and**
323 **Fragrance Journal**, v. 23, p. 99-106, 2008.
324
325
- 326 GOBBO-NETO, L. e LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de
327 metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, p. 374-381, 2007.

328

329

330 HAMROUNI SELLAMI, I. et al. Drying sage (*Salvia officinalis* L.) plants and its effects on
331 content, chemical composition, and radical scavenging activity of the essential oil. **Food and**
332 **Brioprocess Technology**, v. 5, p. 2978-2989, 2012.

333

334

335 LORENZI, H. **Árvores Brasileiras**: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas
336 nativas do Brasil. Nova Odessa: Editora Plantarum, 2002. v. 2.

337

338

339 MARANHO, L. T.; PREUSSLER, K. H. e ROCHA, L. D. Organização estrutural da casca de
340 *Persea major* Kopp (Lauraceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 23, p. 509-515, 2009.

341

342

343 MARCHIORI, J. N. C. **Dendrologia das angiospermas**: das magnoliáceas às flacurtiáceas.
344 Santa Maria: Editora da UFSM, 1997.

345

346

347 MARQUES, C. A. Importância da família Lauraceae Lindl. **Floresta e Ambiente**, v. 8, p.
348 195-206, 2001.

349

350

351 RAGGI, L. **Estudo da composição química e das atividades biológicas dos óleos voláteis**
352 **de espécies de Lauraceae, em diferentes épocas do ano**. 2008. 67 f. Dissertação (Mestrado
353 em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) - Instituto de Botânica da Secretaria de Estado
354 do Meio Ambiente, São Paulo, 2008.

355

356

357 SACCHETTI, G. et al. Essential oil of wild *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. (Lauraceae)
358 leaves from Amazonian Ecuador. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 21; p. 674-676, 2006.

359

360

361 TAVEIRA, F. S. N. et al. Seasonal essential oil variation of *Aniba canelilla*. **Biochemical**
362 **Systematics and Ecology**, v. 31, p. 69-75, 2003.

363

364

365 TORRES, M. R. **Compilación y análisis sobre los productos forestales no madereros**
366 **(PFNM) en el Perú**. 2001. 59 f. (Estudios nacionales sobre productos no madereros en
367 América Latina – GCP/RLA /133/EC). San Tiago: FAO, 2001.

368

369

370 VALENTINI, C. M. A. et al. Variação anual do rendimento e composição química dos
371 componentes voláteis da *Siparuna guianensis* Aublet. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p.1506-
372 1509, 2010.

373

374

375 VENSKUTONIS, P. R. Effect of drying on the volatile constituents of thyme (*Thymus*
376 *vulgaris* L.) and sage (*Salvia officinalis* L.). **Food Chemistry**, v. 59, n. 2; p. 219-227, 1997.

377

378

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

382

383

384

385

386

387

388

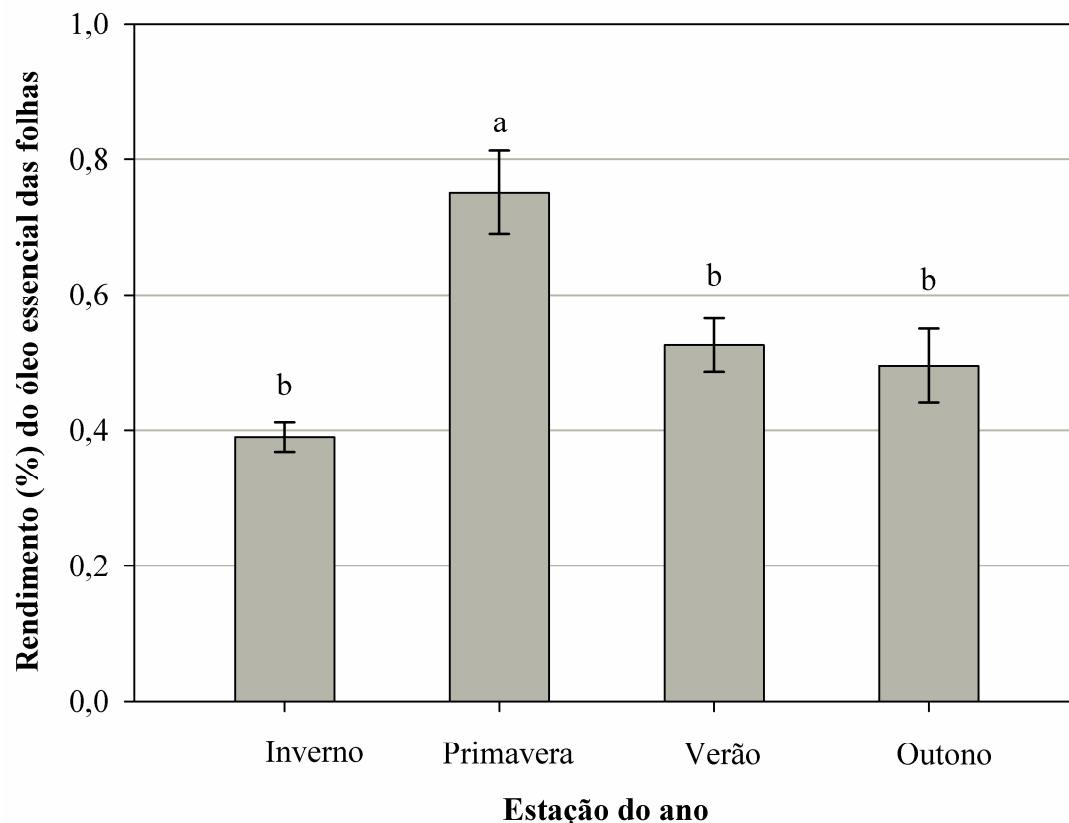
389

390

391

392

393



394

395 **Figura 1** – Rendimentos médios (%) dos óleos essenciais das folhas frescas (MF BS)
396 obtidas de 12 indivíduos de *Nectandra grandiflora* nas quatro estações do ano (três coletas
397 por estação).

398 Diferentes letras minúsculas indicam diferenças significativas entre os rendimentos, pelo
399 teste Tukey, $P < 0,05$.

400

401 **Figure 1** – Average yields (%) of essential oils of fresh leaves (MF BS) obtained from 12
402 individuals of *Nectandra grandiflora* in four seasons (three collections per season).

403 Different lowercase letters indicate significant differences between yields, based on Tukey
404 test, $P < 0.05$.

405

406

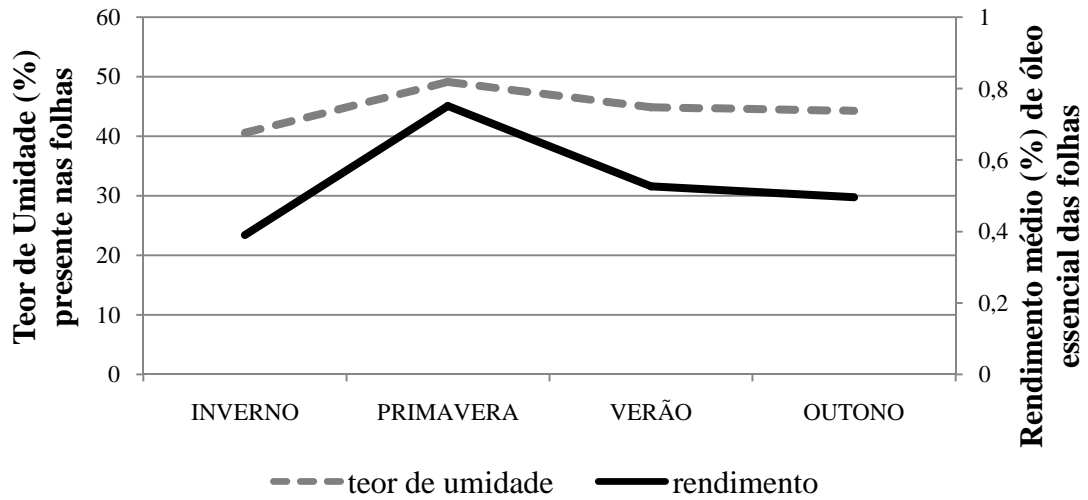
407

408

409

410

411



412

413 **Figura 2** – Representação gráfica da variação sazonal do rendimento do óleo essencial das
 414 folhas frescas (MF BS) de *Nectandra grandiflora* e do teor de umidade presente no mesmo
 415 material vegetal.

416

417 **Figure 2** – Graphical representation of seasonal variability of essential oil yields of fresh
 418 leaves (MF BS) of *Nectandra grandiflora* and the moisture content present in the same plant
 419 material.

420

421

422

423

424

425

426

427

428

429

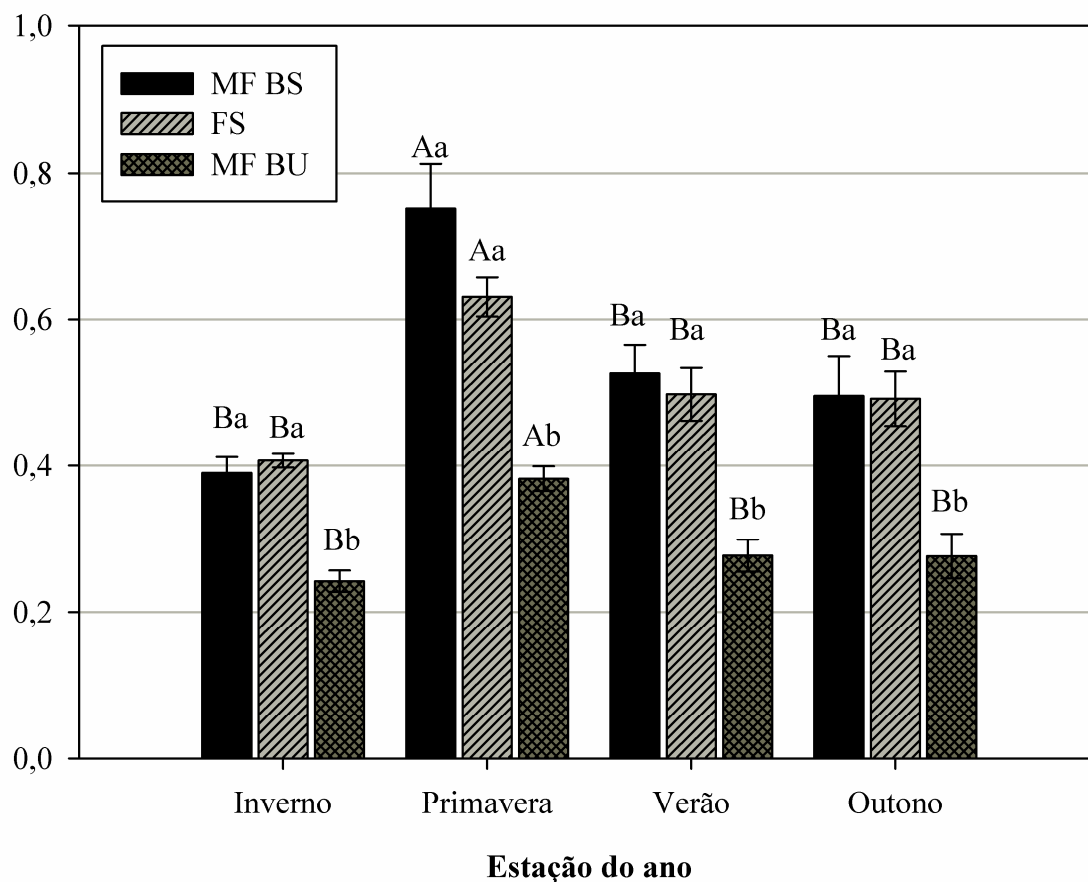
430

431

432

433

434



435

436 **Figura 3** – Rendimentos (%) dos óleos essenciais das folhas frescas determinados à base
 437 seca (MF BS) e à base úmida (MF BU), e das folhas secas (FS) de *Nectandra grandiflora*
 438 nas quatro estações do ano.

439 Diferentes letras maiúsculas indicam diferenças significativas de rendimento entre os grupos
 440 e diferentes letras minúsculas indicam diferenças significativas entre os rendimentos dentro
 441 do mesmo grupo, pelo teste Tukey, $P < 0,05$.

442

443 **Figure 3** – Yields (%) of essential oils of fresh leaves based on dry (MF BS) and fresh
 444 weight (MF BU), and of dry leaves (FS) of *Nectandra grandiflora* in four seasons.

445 Different uppercase letters indicate significant differences of yields between groups and
 446 different lowercase letters indicate significant differences between yields of the same group,
 447 based on Tukey test, $P < 0.05\%$.

448

449

450

4.2 Manuscrito 2

SILVA, D. T.; BIANCHINI, N. H.; LONGHI, S. J.; MALLMANN, C. A.; HEINZMANN, B. M. Chemical composition of essential oils from different parts of *Nectandra grandiflora* Nees and *Ocotea acutifolia* (Nees) Mez.

Chemical composition of essential oils from different parts of *Nectandra grandiflora* Nees and *Ocotea acutifolia* (Nees) Mez

Daniela Thomas da Silva¹, Nádia Helena Bianchini², Solon Jonas Longhi^{1,2,3}, Carlos Augusto Mallmann⁴, Berta Maria Heinzmann^{5,6,7}

¹Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, BR-97105-900, Brazil

²Curso de Engenharia Florestal, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, BR-97105-900, Brazil

³Departamento de Ciências Florestais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, BR-97105-900, Brazil

⁴Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, BR-97105-900, Brazil

⁵Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, BR-97105-900, Brazil

⁶Curso de Farmácia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, BR-97105-900, Brazil

⁷Departamento de Farmácia Industrial, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, BR-97105-900, Brazil

***Correspondence**

Prof.^a Dra. Berta Maria Heinzmann. Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Farmácia Industrial, Prédio 26, Campus Universitário, Avenida Roraima nº 1000, Bairro Camobi, Santa Maria – RS, Brasil, BR-97105-900. E-mail: berta.heinzmann@gmail.com. Phone: +5 55 3220 9674 Fax: +55 55 3220 8248.

ABSTRACT

The present study aimed to perform a comparative analysis of the chemical composition of the essential oils (EO) obtained from different organs of *Nectandra grandiflora* Nees and *Ocotea acutifolia* (Nees) Mez, collected in south of Brazil, in their respective flowering periods. Leaves and inflorescences of both species and bark of *N. grandiflora* were collected, and the EO from the fresh samples were separately extracted by hydrodistillation in a Clevenger apparatus and analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). In total, 56 different compounds were identified, and oxygenated sesquiterpenoids comprised the largest part of volatile composition of both species. The main compound of the EO from leaf, inflorescence and bark of *N. grandiflora* was dehydrofukinone, in variable proportions. The chemical composition of inflorescence and leaf EO of *O. acutifolia* also did not differ significantly. Additionally, the compounds caryophyllene oxide and calarene epoxide make up the major percentage of them. In conclusion, the volatile composition observed for the EO of both species differed from those found in other species of Lauraceae family studied yet.

Keywords: Sesquiterpenoids. Lauraceae. Plant extracts. Volatile composition.

1 INTRODUCTION

The Lauraceae is a predominantly tropical and large family of trees and shrubs, with about 50 genera and 2500-3000 species currently recognized in the world (VAN DER WERFF; RICHTER, 1996). Economically, Lauraceae are an important group due to the different purposes for which their species can be used (GOTTLIEB, 1972; MARQUES, 2001; BAKKALI et al., 2008; VIEIRA; BIZZO; DESCHAMPS, 2009; YAMAGUCHI; ALCÂNTARA; VEIGA JUNIOR, 2012). There is increasing researches for the essential oils (EO) of species belonging to this group, since they are promising survey of new compounds which may be useful to the society.

Brazil has an important participation in the EO world market, being the fourth largest producer, after India, China and Indonesia (VIEIRA; BIZZO; DESCHAMPS, 2009). Despite Brazil is considered the country with the greatest biodiversity on the planet, this participation is mainly due to the export of EO obtained from *Citrus* species, like orange, lemon and lime (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009; VIEIRA; BIZZO; DESCHAMPS, 2009).

The species *Nectandra grandiflora* Nees and *Ocotea acutifolia* (Nees) Mez (Lauraceae) are native trees from Brazil, whose leaves, inflorescences and bark have intense odor. Previous researches have demonstrated the antimicrobial properties of both species (BARNECHE et al., 2010; CUNICO et al., 2010). Literature data on the EO of other members of Lauraceae indicate that there is a great diversity of chemical composition within the same species, depending on the plant organ, time place of collection, among other factors (BRITO, 2009; GARCEZ et al., 2009; ROMOFF et al., 2010). On the other hand, very little is known about the potential of *N. grandiflora* and *O. acutifolia* for the production of EO, especially about the richness and diversity of their chemical composition. Therefore, this study was designed to perform a comparative analysis of the chemical composition of the EO obtained from different organs of these species growing in south Brazil, in their respective flowering periods.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Plant materials

The aerial parts of *Nectandra grandiflora* Nees and *Ocotea acutifolia* (Nees) Mez were, collected, respectively, in Jaguari (October 2011, -29° 26'25,09" S and -54°40'27,73 W), and in São Francisco de Assis (April 2012, -29°32'18,8" S and -55°05'15,1" W), State of Rio Grande do Sul (south of Brazil). The species were identified by Prof. Solon Jonas Longhi, and voucher specimens (SMDB n° 13.162 and n° 13.450, respectively) were deposited in the herbarium of Department of Biology, UFSM.

2.2 Essential oil extraction and analysis

The essential oils (EO) of leaf, inflorescence and bark of *N. grandiflora*, and leaf and inflorescence of *O. acutifolia* were separately extracted by hydrodistillation using a Clevenger type apparatus for 3 h (EUROPEAN PHARMACOPEIA, 2007), in triplicates. The EO were stored at -4°C in amber glass bottles sealed until analysis by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS). EO yields on the dried weight of different parts of the plants were calculated w/w (%).

GC-MS TIC analysis was performed using an Agilent-6890 gas chromatograph coupled with an Agilent 5973 mass selective detector, using an HP5-MS column (5% phenyl - 95% methylsiloxane, 30 m x 0.25 mm i. d. x 0.25 µm) and EI-MS of 70 eV. The operating conditions were: split inlet 1:100; temperature program, 40-320°C at 4°C min⁻¹; carrier gas He; flow rate 1 mL min⁻¹; injector and detector temperature 250°C. The constituents of EO were identified by comparison of the mass spectra with a mass spectral library (NIST, 2005), and the Kovats retention index with literature data (ADAMS, 2001).

3 RESULTS

A total of 56 compounds were identified in the EO obtained from different parts of *N. grandiflora* and *O. acutifolia*, accounting for 87.2-93.6% and 94.7-96.8% of the volatile composition, respectively, and their yields are present in Table 1. The EO obtained from both species showed a chemical profile of terpenic nature, with predominance of oxygenated sesquiterpenoids (Table 2).

Of the 47 identified compounds in EO of *N. grandiflora*, 29 belong to the class of sesquiterpenoids and 17 substances comprise monoterpenoids. The oxygenated sesquiterpenoids represented 40.8 to 82.4% of EO obtained from this species. The bark oil showed the highest content of oxygenated sesquiterpenoids (82.4%), due to the high percentage of dehydrofukinone making up 53.3% of the volatile composition. Additional oxygenated sesquiterpenoids found in percentages above 2% in the EO of all organs were selin-11-en-4- α -ol, and two not yet identified substances, named compound "F" and compound "M".

The inflorescence and bark EO of *N. grandiflora* were composed by small amount of oxygenated monoterpenoids (1.6% and 0.2%, respectively) and diterpenoids (0.6% and 0.5%, respectively). The chemical composition of leaf EO of *N. grandiflora* differed from the inflorescence and bark oils, since it presented higher amounts of sesquiterpene hydrocarbons (26.1%), like bicyclogermacrene (11.4%), valence (4.4%) and drima-7,9(11)-diene (3.8%). Moreover, 15.3% of leaf oil is composed by monoterpene hydrocarbons, which represents higher content than found in inflorescence (12.5%) and bark (2.3%) oils. The major monoterpene hydrocarbons identified in leaf, inflorescence and bark EOs were α -pinene, β -pinene and β -*E*-ocimene (Figure 1).

The analysis of the EO obtained from *O. acutifolia* allowed the identification 19 compounds which are a blend of eight different oxygenated sesquiterpenoids, totaling 77.1-79.4% of the volatile composition. Both inflorescence and leaf EO showed caryophyllene oxide as the major constituent (62.9% and 59.1%, respectively), following by calarene epoxide (10.3% and 13.2%, respectively). Other substances belonging to this class are *Z-Z*- α -bisabolene epoxide, spathulenol, (*Z,E*)-farnesol, bicyclovetivenol, *Z*- α -santalol and β -chenopodiol.

The sesquiterpene hydrocarbons accounting for 6.6% of the leaf EO and 11.5% of the inflorescence EO, and were represented by δ -elemene, bicyclogermacrene, α -guaiene and germacrene D. The remainder components of the EO of *O. acutifolia* were oxygenated monoterpenoids (1.2% in leaf and 0.3% in inflorescence) and monoterpene hydrocarbons (8.2% in leaf and 3.4% in inflorescence) (Figure 2).

4 DISCUSSION

Despite the wide distribution of the genus *Nectandra* in Brazil, with about 43 described species (BAITELLO et al., 2003 apud ALVES; SARTORI, 2009), little research has been done on their EO. However, comparison with other species previously studied indicates that the yields of EO obtained from leaves of *N. grandiflora* are higher than found for *N. megapotamica* and *N. salicina* (APEL et al., 2006; CICCIO; CHAVERRI; DÍAZ, 2009).

There are several reports about the EO of plants belonging to *Ocotea* genus, however no study for EO of *O. acutifolia* is described. The yield found for leaf EO of *O. acutifolia* was lower when compared for the same organ of *O. quixos* (1.6%) (SACCHETTI et al., 2006), but was similar to the yields found for leaves of *O. gomezii*, *O. morae* (CHAVERRI; DÍAZ; CICCIO, 2011), *O. foetens* (PINO et al., 2004) and *O. porosa* (BRITO, 2009). The yield of inflorescence EO achieved by *O. acutifolia* was higher than found in the same organ of *O. quixos* (1.9%) (BALLABENI et al., 2010).

The chemical characteristics observed for the EO of the leaves of *N. grandiflora* and *O. acutifolia* (Table 1) are different and uncommon when compared with the corresponding data described to other species of the Lauraceae family yet, which reports the occurrence mostly of mono and sesquiterpene hydrocarbons (MENUT et al., 2002; CHAVERRI; CICCIO, 2005; WU et al., 2006; TAKATU; HABER; SETZER, 2007; BARBOSA-FILHO et al., 2008; CICCIO; CHAVERRI; DÍAZ, 2009; SILVA et al., 2011). This variability can be explained by the influence of abiotic

factors such as rainfall, sunlight, wind, as well as by factors inherent to own plant as vegetative cycle and genotype (FIGUEIREDO et al., 2008).

The leaf EO of *N. grandiflora* collected in Paraná (Brazil), showed 33 compounds in total, and among them eromoligenol, elemol, β -elemene, β -bourbonene, spathulenol, germacrene A, globulol and kaurene (CUNICO et al., 2010), which were also detected in this work. However, there were no reports on the occurrence of the major compound of the EO of this species found in our study, dehydrofukinone, in Lauraceae species. This sesquiterpenoid has been described as a constituent of *Senecio* species (Asteraceae) (POOTER et al., 1986; BOLZAN, 2007; NIEMEYER; 2009). Other species of *Nectandra* showed atractylone, bicyclogermacrene, β -caryophyllene, β -selineno, β -pinene and δ -cadinene as major compounds in their EO (WU et al., 2006; WERKA; BOEHME; SETZER, 2007; CICCIO; CHAVERRI; DÍAZ, 2009; SILVA et al., 2011).

The chemical composition observed to the EO of *O. acutifolia* is very similar to those described by Silva et al. (2013, data not published), for the same species. This fact is not surprising, since the location, the season of collection and the population to which the specimen sampled belonged were the same. The major component identified, caryophyllene oxide, is common to diverse EO of different plant families, and is also frequently found in members of Lauraceae family, but in these it had been described in low concentrations (BRUNI et al., 2004; CHALCHAT; ÖZCAN; 2008). For the EO obtained from species of *Ocotea* the presence of the hydrocarbons α -pinene, β -pinene, *E*-caryophyllene, α -humulene, germacrene D and *p*-cymene has been described in high proportions (TAKATU; HABER; SETZER, 2007; BARBOSA-FILHO et al., 2008; SILVA et al., 2011). Some of those compounds were also detected in the present study, but in low concentrations. However, there are some *Ocotea* species, whose EO have a different chemical profile, even considering the chemical class of the major compounds. Thus, for example, the phenylpropanoid derivatives *E*-cinnamaldehyde (27.9%) and methylcinnamate (21.6%) were found in flower calices EO of *O. quixos* (BRUNI et al., 2004) and ethyl *p*-coumarate were described as the major compound of the leaf EO of *O. foetens* (69.6%) (PINO et al., 2004). In contrast, phenylpropanoid derivative were not detected in our study.

Likewise to observed for inflorescence and leaf EO of *O. acutifolia*, Silva et al. (2011) reported a similar chemical composition for the EO obtained from steam, leaf

and inflorescence of *O. puberula*. Minimal differences are seen between the quantity of the major constituents, bicyclogermacrene and β -caryophyllene, in this species. Bicyclogermacrene is often found as a constituent of the EO of Lauraceae species in southern Brazil (BRITO, 2009; ROMOFF et al., 2010), and also appears in percentages of 5.96 and 10.36%, in leaf and inflorescence EO of *O. acutifolia*, respectively.

5 CONCLUSION

The chemical compositions verified for different organs of *Nectandra grandiflora* and *Ocotea acutifolia* are quite unusual for EO of Lauraceae species described yet. The major compound found for bark, leaf and inflorescence *N. grandiflora* EO was dehydrofukinone which range from 17.08 to 53.38%. This is the first time that this compound is described for Lauraceae. For leaf and inflorescence EO of *O. acutifolia*, the oxygenated sesquiterpenoid caryophyllene oxide occurred at higher concentrations (59.09-62.93%).

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by research funds from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS/PRONEX, Document No. 10/0016-8) and Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico (CNPq, Document No. 470964/2009-0). C. A. Mallmann and S. J. Longhi are grateful to CNPq for research fellowships; D.T. Silva is grateful to Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for their postgraduate fellowships.

LITERATURE CITED

ADAMS R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy**. Illinois: Allured Publishing Corporation, 2001. 456 p.

ALVES, F. M.; SARTORI A. L. B. *Nectandra* Rol. ex Rottb. (Lauraceae) no Mato Grosso do Sul, Brasil. **Acta Botânica Brasilica**, v. 23, n. 1, p. 118-129, 2009.

APEL, M. A. et al. Screening of the biological activity from essential oils of native species from Atlantic rain forest (São Paulo - Brazil). **Pharmacologyonline**, v. 3, p. 376-383, 2006.

BAITELLO, J. B. et al. Lauraceae. In: WANDERLEY, M. G. L.; SHEPHERD, G. J.; GIULIETTI, A. M.; MELHEM T. S. (eds.). **Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo**. São Paulo: Ed. Rima, v.3. São Paulo, FAPESP-Rima, p. 159-223, 2003.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils – A Review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446-475, 2008.

BALLABENI, V. et al. *Ocotea quixos* Lam. essential oil: In vitro and in vivo investigation on its anti-inflammatory properties. **Fitoterapia**, v. 81, p. 289-295, 2010.

BARBOSA-FILHO, J. M. et al. GC-MS Analysis and cardiovascular activity of the essential oil of *Ocotea duckei*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 1, p. 37-41, 2008.

BARNECHE, S. et al. Prospección química y microbiológica del bosque de galería del río Uruguay. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 6, p. 878-885, 2010.

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

BOLZAN, A. A. **Constituintes de *Senecio platensis* Arech. Isolamento, elucidação estrutural e avaliação antibacteriana**. 2007. 164 f. Dissertação

(Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.

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

BRUNI, R. et al. Chemical composition and biological activities of Ishpingo essential oil, a traditional Ecuadorian spice from *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. (Lauraceae) flower calices. **Food Chemistry**, v. 85, p. 415-421, 2004.

CHAVERRI, C; CICCÍÓ, J. F. Essential oil of trees of the genus *Ocotea* (Lauraceae) in Costa Rica. *Ocotea brenesii*. **Revista de Biología Tropical**, v. 53, n. 3-4, p. 431-436, 2005.

CICCÍÓ, J. F.; CHAVERRI, C.; DÍAZ, C. Volatile compounds of *Nectandra salicina* (Lauraceae) from Costa Rica and their cytotoxic activity on cell lines. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 417-420, 2009.

CHALCHAT, J-C.; ÖZCAN, M. M. Comparative essential oil composition of flowers, leaves, and steams of basil (*Ocimum basilicum* L.) used as herb. **Food Chemistry**, v. 110, p. 501-503, 2008.

CHAVERRI, C. DÍAZ, C.; CICCÍÓ, J. F. Chemical analysis of essential oils from *Ocotea gomezzi* W.C. Burger and *Ocotea morae* Gómez-Laur. (Lauraceae) collected at “Reserva Biológica Alberto M. Brenes” in Costa Rica and their cytotoxic activity on tumor cell lines. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 4, p. 741-745, 2011.

CUNICO, M. M. et al. Estudo preliminar antimicrobiano e fitoquímico do óleo essencial foliar da *Nectandra grandiflora* Nees (canela-amarela). In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON EDUCATION FOR SUSTAINABLE DEVELOPMENT, 2010, Curitiba. **Anais...** Curitiba, Brasil: UFPR, 2010.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA. 6th ed. Strassbourg: European Directorate for the Quality of Medicines, 2007.

FIGUEIREDO, A. C. et al. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 23, p. 213-226, 2008.

GARCEZ, F. R. et al. Fenilpropanóides e outros constituintes bioativos de *Nectandra megapotamica*. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 407-411, 2009.

GOTTLIEB, O. R. Chemosystematics of the Lauraceae. **Phytochemistry**, v.13, p.1537-1570, 1972.

MARQUES, C. A. Importância da família Lauraceae Lindl. **Floresta e Ambiente**, v. 8, n. 1, p. 195-206, 2001.

MENUT, C. et al. Chemical and biological studies of *Ocotea comoriensis* bark essential oil. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 17, p. 459-461, 2002.

NIEMEYER, H. M. Composition of essential oils from five aromatic species of Asteraceae. **The Journal of Essential Oil Research**, v. 21, n. 4, p. 350-353, 2009.

NIST/ EPA/ NIH mass spectral library and search/ analysis programs. Hoboken, NJ: J. Wiley and Sons, 2005.

PINO, J. A. et al. Chemical composition of the leaf oil of *Ocotea foetens* (Alt.) Benth. et Hook. from Madeira. **The Journal of Essential Oil Research**, v. 16, p. 131-132, 2004.

POOTER, H. L. et al. The volatile fraction of *Senecio glaucus* subsp. *Coronopifolius*. **Flavor and Fragrance Journal**, v. 1, n. 4-5, p. 159-163, 1986.

ROMOFF, P. et al. Chemical composition of volatile oils from leaves of *Nectandra megapotamica* Spreng. (Lauraceae). **Química Nova**, v. 33, n. 5, p. 1115-1121, 2010.

SACCHETTI, G. et al. Essential oil of wild *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. (Lauraceae) leaves from Amazonian Ecuador. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 21, p. 674-66, 2006.

SILVA, G. T. et al. Óleo volátil de espécies de *Ocotea* e *Nectandra* nativas do Rio Grande do Sul: análise química e investigação da atividade anti-inflamatória e antioxidante *in vitro*. In: ANAIS SALÃO INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL, 2011, Porto Alegre. **Anais eletrônicos...** Porto Alegre: UFRGS, 2011. Available on:

<http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/47966/Poster_10586.pdf?sequence=2>. Accessed on: 15 Out. 2012.

SILVA, L. L. et al. Anesthetic activity of Brazilian native plants in silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Neotropical Ichthyology**. 2013. Submitted.

TAKATU, S., HABER, W. A.; SETZER, W. N. Leaf essential oil composition of 10 species of *Ocotea* (Lauraceae) from Monteverde, Costa Rica. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, p. 525-532, 2007.

VAN DER WERFF, H.; RICHTER, H. G. Toward and improved classification of Lauraceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 8, n. 3, p. 419-432, 1996.

VIEIRA, R. F.; BIZZO, H. R.; DESCHAMPS, C. Genetic resources of aromatic plants from Brazil. **Israel Journal of Plant Sciences**, v. 58, p. 263-271, 2009.

WERKA, J. S.; BOEHME, A. K.; SETZER, W. N. Biological activities of essential oils of Monteverde, Costa Rica. **Natural Product Communications**, v. 2, n. 12, p. 1215-1219, 2007.

WU, X.; et al. A Phytochemical investigation of *Nectandra membranaceae* from Monteverde, Costa Rica. **Natural Products Communications**, v. 1, n. 6, p. 465-468, 2006.

YAMAGUCHI, K. K. L.; ALCÂNTARA, J. M.; VEIGA JUNIOR, V. F. Investigação do potencial antioxidante e anticolinesterásico de 20 espécies da família Lauraceae. **Acta Amazonica**, v. 42, n. 4, p. 541-546, 2012.

Table 1 – Characteristics of essential oils obtained from *Nectandra grandiflora* and *Ocotea acutifolia*.

Species	Plant organ	Yield (w/w %)	Compounds identified	% Identified
<i>N. grandiflora</i>	Inflorescence	1,46		
<i>N. grandiflora</i>	Leaf	0,72	47	87,2-93,6
<i>N. grandiflora</i>	Bark	0,022		
<i>O. acutifolia</i>	Inflorescence	2,31		
<i>O. acutifolia</i>	Leaf	0,79	19	94,7-96,8

Table 2 – Chemical composition of the essential oils of different parts of *Nectandra grandiflora* and *Ocotea acutifolia*.

Peak	Compound	RI calc		RI ref	Percentage of chemical composition				
		INF	SUP		<i>N. grandiflora</i>			<i>O. acutifolia</i>	
					L	IN	B	L	IN
1	α -Pinene	929	933	930	4.98	4.06	0.13	0.36	0,30
2	Camphene	944		945	0.29	0.27	0.06	-	-
3	β -Pinene	972	974	974	3.84	3.20	0.12	0.20	-
4	β -Mircene	990		990	0.30	0.24	0.05	-	-
5	α -Phelandrene	1000		1000	-	-	0.05	-	-
6	3-Carene	1006		1008	-	-	0.04	-	-
7	α -Terpinene	1013		1012	0.03	0.03	-	-	-
8	Limonene	1025		1026	0.50	0.49	0.06	-	-
9	Eucalyptol	1027		1028	0.33	0.21	-	-	-
10	β -Z-ocimene	1036	1038	1037	0.84	0.54	0.14	1.00	0.39
11	β -E-ocimene	1043	1050	1048	4.56	3.63	0.87	6.70	2.68
12	τ -Terpinolene	1057		1061	-	0.05	-	-	-
13	α -Terpinolene	1086		1085	0.06	0.07	0.83	-	-
14	β -Linalool	1098	1100	1100	1.12	0.68	0.09	1.15	0.33
15	1-Terpinen-4-ol	1175		1175	0.10	0.07	-	-	-
16	Z-3-hexenyl-1-butyrate	1187		1186	0.50	0.42	-	-	-
17	Borneol acetate	1285		1286	0.30	0.22	0.15	-	-
18	δ -Elemene	1336	1337	1338	0.27	0.17	0.04	-	0.30
19	α -Cubebene	1348		1348	-	-	0.04	-	-
20	β -Bourbonene	1384	1385	1388	0.20	0.12	0.05	-	-
21	β -Elemene	1392		1391	1.27	0.69	0.77	-	-
22	α -Gurjenene	1409		1410	-	0.04	-	-	-
23	β -Caryophyllene	1419		1418	0.68	1.24	0.92	-	-

24	α -Guaiene	1438	1442	1440	1.21	0.65	0.36	0.49	0.76
25	α -Caryophyllene	1453		1454	0.36	0.33	0.27	-	-
26	Dehydro aromadendrene	1460		1463	0.19	0.12	-	-	-
27	Drima-7.9(11)-diene	1469	1471	1471	3.85	2.33	1.02	-	-
28	τ -Muurolene	1480	1482	1480	1.03	1.17	0.18	-	-
29	Germacrene D	1480	1481	1485	-	-	-	0.30	0.10
30	Valencene	1487	1488	1488	4.44	2.44	1.98	-	-
31	Byciclogermacrene	1496	1500	1500	11.47	7.40	2.41	5.96	10.36
32	Germacrene A	1504	1506	1509	0.93	0.64	0.23	-	-
33	γ -Cadinene	1517		1514	0.11	-	-	-	-
34	δ -Cadinene	1524		1523	0.10	0.12	-	-	-
35	Kessane	1540	1541	1539	1.65	0.96	2.08	-	-
36	2(1H)-Naphthalenone, 7-ethynyl-4a.5.6.7.8.8a-hexahydro	1547		1548	0.11	0.11	-	-	-
37	Elemol	1550	1551	1549	0.10	0.11	0.48	-	-
38	Viridiflorol	1568		1568	0.09	0.16	-	-	-
39	Caryophyllene oxide	1551	1554	1555	-	-	-	59.09	62.93
40	Spathulenol	1576	1583	1578	2.15	0.33	0.37	-	0.55
41	Globulol	1584	1586	1585	0.63	0.59	0.22	-	-
42	Humulane-1.6-dien-3-ol	1624	1625	1619	0.30	0.30	0.31	-	-
43	Eromoligenol	1633	1633	1631	0.85	0.71	1.45	-	-
44	τ -Cadinol	1643	1644	1642	0.51	0.54	0.74	-	-
45	Compound "F"	1658	1659	*	10.67	11.50	9.37	-	-
46	Selin-11-en-4- α -ol	1661	1662	1660	2.85	2.69	4.82	-	-
47	Z-Z- α -Bisabolene epoxide	1667	1668	**	-	-	-	1.60	1.89
48	(Z,E)-Farnesol	1681		1690	-	-	-	0.95	0.48
49	Calarene epoxide	1717	1719	**	-	-	-	13.22	11.04
50	Bicyclovetivenol	1777	1778	1773	-	-	-	0.33	0.66

51	Z- α -Santalol	1783	1784	**	-	-	-	1.25	1.09
52	β -Chenopodiol	1793	1795	1812	-	-	-	0.72	0.83
53	Iso-longifolol acetate	1812	1813	1812	-	-	-	0.70	1.79
54	Dehydrofukinone	1816	1825	**	17.08	30.78	53.38	-	-
55	Compound "M"	1824	1831	*	3.64	6.24	8.99	-	-
56	Kaurene	2040	2044	2043	4.25	0.63	0.56	0.75	-
Compounds identified					88.75	87.24	93.60	94.77	96.82
Monoterpene hydrocarbons					15.40	12.57	2.34	8.26	3.37
Oxygenated monoterpenoids					2.36	1.60	0.24	1.15	0.33
Sesquiterpene hydrocarbons					26.12	17.40	8.27	6.65	11.52
Oxygenated sesquiterpenoids					40.85	55.18	82.42	77.16	79.45
Diterpenes					4.25	0.63	0.56	0.75	0.0
Others					0.0	0.0	0.0	0.701	1.79
Compounds unidentified					11.25	12.76	6.40	5.23	3.184

RI calc: calculated Kovats retention Index; RI ref: reference Kovats retention index (Adams, 2001; Nist, 2005); L: leaves; IN: inflorescence; B: bark.

* The structures are being elucidated.

** RI not reported.

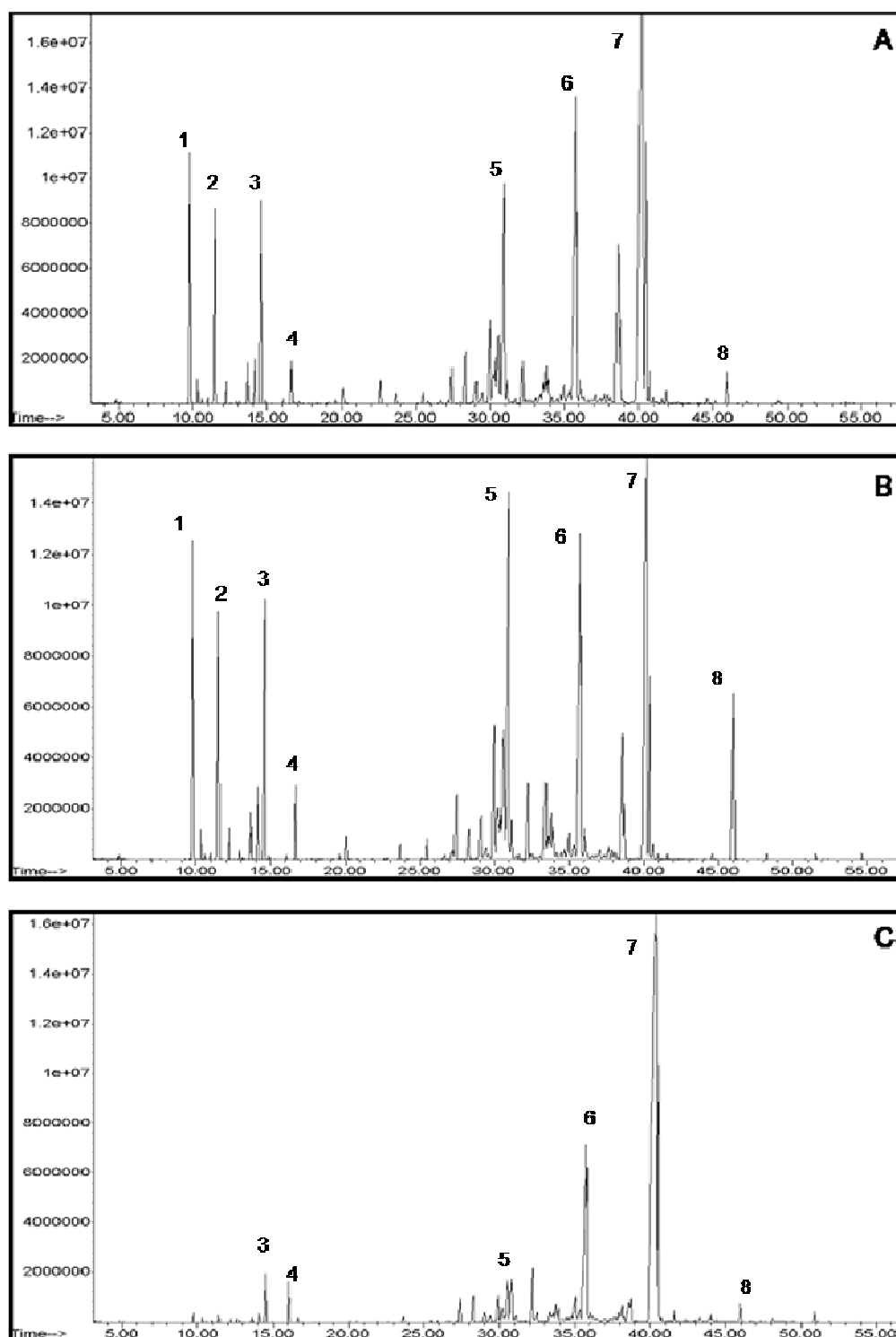


Figure 1 – Typical GC chromatograms for inflorescence (A), leaf (B) and bark (C) *Nectandra grandiflora* essential oils. HP5-MS column was used.

1=α-Pinene; 2=β-Pinene; 3=β-*E*-Ocimene; 4=β-Linalool; 5=Bicyclogermacrene; 6=Compound F; 7=Dehydrofukinone; 8=Kaurene.

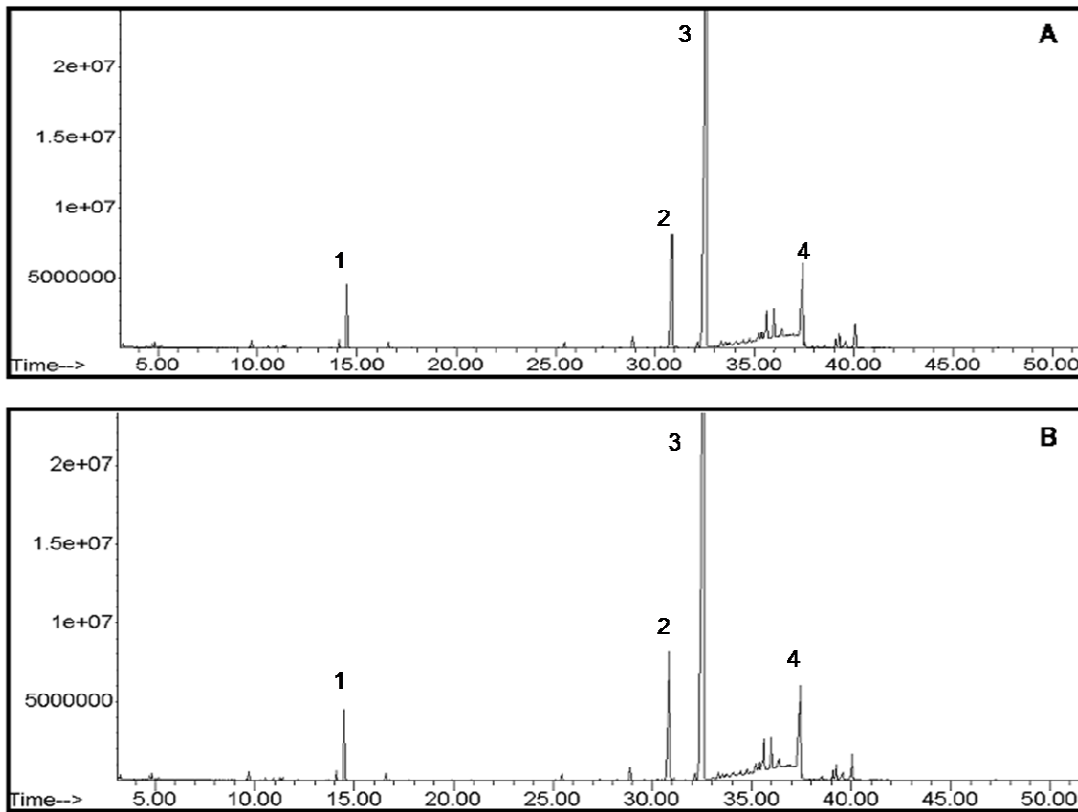


Figure 2 – Typical GC chromatograms for inflorescence (A) and leaf (B) *Ocotea acutifolia* essential oils. HP5-MS column was used.

1= β -*E*-Ocimene; 2=Bicyclogermacrene; 3=Caryophyllene oxide; 4=Calarene epoxide.

4.3 Manuscrito 3

SILVA, D. T.; BIANCHINI, N. H; AMARAL, L. P.; SCHINDLER, B.; LONGHI, S. J.; MALLMANN, C. A.; HEINZMANN, B. M. Análise da variabilidade sazonal da composição química do óleo essencial das folhas de *Nectandra grandiflora* Nees.

**Análise da variabilidade sazonal da composição química do óleo essencial das
folhas de *Nectandra grandiflora* Nees**

Daniela Thomas da Silva¹, Nádia Helena Bianchini², Lúcio de Paula Amaral¹, Bianca
Schindler², Solon Jonas Longhi^{1,2}, Carlos Augusto Mallmann³,
Berta Maria Heinzmann^{1,4,5}

¹Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, BR-97105-900, Brazil

²Curso de Engenharia Florestal, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, BR-97105-900, Brazil

³Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, BR-97105-900, Brazil

⁴Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, BR-97105-900, Brazil

⁵Curso de Farmácia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, BR-97105-900, Brazil

⁶Departamento de Farmácia Industrial, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, BR-97105-900, Brazil

***Correspondência:**

Prof.^a Dra. Berta Maria Heinzmann. Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Farmácia Industrial, Prédio 26, Campus Universitário, Avenida Roraima nº 1000, Bairro Camobi, Santa Maria – RS, Brasil, BR-97105-900. E-mail: berta.heinzmann@gmail.com. Phone: +5 55 3220 9674 Fax: +55 55 3220 8248.

RESUMO

Este estudo foi delineado visando avaliar o efeito da sazonalidade sobre a composição química do óleo essencial (OE) de uma população nativa de *Nectandra grandiflora* Nees do município de Jaguari (Rio Grande do Sul). O OE das folhas frescas foi obtido de três indivíduos por estação e extraído por hidrodestilação, por um período de 3 h. As doze amostras de OE obtidas foram analisadas por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM). A variação sazonal foi avaliada através da Análise de Componentes Principais (ACP) e da Análise Hierárquica de Cluster (AHC). Os sesquiterpenóides predominaram em todas as estações do ano, variando entre 66,7 a 80,4% da composição volátil total, sendo o constituinte majoritário em todas as amostras a deidrofuquinona. As ACP e AHC evidenciaram a formação de cinco agrupamentos distintos para o OE, sendo a variabilidade observada independente da estação do ano, sugerindo que seja decorrente da pequena variabilidade genética entre os indivíduos, bem como dos fatores fisiológicos da planta.

Palavras-chave: Lauraceae. Sazonalidade. Terpenóides.

ABSTRACT

This study was designed to evaluate the effect of seasonality on the chemical composition of the essential oil (EO) of a native population of *Nectandra grandiflora* Nees growing in Jaguari (Rio Grande do Sul). The EO of fresh leaves was obtained from three individuals per season and extracted by hydrodistillation, for a period of 3 h. The twelve OE samples obtained were analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). The seasonal variation was assessed by Principal Component Analysis (PCA) and Hierarchical Cluster Analysis (HCA). The sesquiterpenoids predominated in all seasons, ranging from 66.7 to 80.4% of the total volatile composition, being dehydrofukinone the major constituent in all samples. The ACP and AHC showed formation of five distinct clusters for the EO, being the variability observed regardless of the season, suggesting that it is caused by small genetic variability among the individuals as well as physiological factors of the plant.

Keywords: Lauraceae. Seasonality. Terpenoids.

1 INTRODUÇÃO

A heterogeneidade na composição química e a falta de constância na produção de óleo essencial (OE) por parte das plantas pode ser advinda da variação geográfica, presença de pragas ou doenças, local e clima no momento da coleta. No entanto, tão importante quanto as condições ambientais, a fisiologia, a idade, o estágio de desenvolvimento e a genética de uma planta exercem significativa influência quando a abordagem é a composição química do OE (LIMA; KAPLAN; CRUZ, 2003; FIGUEIREDO et al., 2008). É de fundamental importância a avaliação da variabilidade dos OE, uma vez que seus metabólitos são, muitas vezes, os responsáveis pelas propriedades biológicas, como fungicida, bactericida, inseticida, anti-inflamatória, entre outras, observadas nas plantas (SAYYAH et al., 2003; BAKKALI et al., 2008; ISMANN; MACHIAL, 2006).

Os inventários botânicos confirmam que a família Lauraceae está, em termos florísticos e econômicos, entre as mais importantes famílias de Angiospermas (BAITELLO, 2001). No entanto, as pesquisas com OE de espécies, principalmente do gênero *Nectandra*, são poucas, mas promissoras. A espécie *Nectandra grandiflora* Nees, conta com poucos estudos fitoquímicos e farmacológicos, sendo evidenciado somente potencial antimicrobiano para o OE de suas folhas (MORENO et al., 1993; CUNICO et al., 2010).

O objetivo desse trabalho foi investigar a variabilidade sazonal dos principais compostos presentes no OE das folhas de *N. grandiflora* Nees, a fim de verificar se há influência das estações do ano sobre sua composição química. Para esse estudo, as amostras de OE, coletadas em diferentes estações do ano, juntamente com os constituintes voláteis foram submetidos à Análise de Componentes Principais e à Análise Hierárquica de Cluster, a fim de detectar o padrão de distribuição das amostras e identificar quais os constituintes são os responsáveis pela diferenciação dos grupos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção do material vegetal

O material vegetal de *Nectandra grandiflora* Nees foi coletado em um fragmento de Floresta Estacional Decidual (IBGE, 1962), localizado em área rural do município de Jaguari, no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil, localizada sob as coordenadas geográficas - 29°26'25,09" de latitude e -54° 40'27,73" de longitude. A espécie foi identificada pelo Prof. Solon Jonas Longhi e uma exsicata foi depositada no herbário do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), sob o registro SMDB 13.162. Para a realização das coletas, foram selecionados nove diferentes indivíduos de *N. grandiflora*, dentre os quais, um indivíduo foi escolhido para coletas sazonais de suas folhas, ou seja, uma a cada estação. Os outros oito indivíduos tiveram suas folhas coletadas aleatoriamente ao longo dos meses julho de 2011 até junho de 2012, totalizando assim, três coletas por estação. Desta forma foram obtidas 12 amostras de material vegetal para a posterior extração dos OE. Essas amostras estão representadas pelas siglas OUT 1, OUT 2, OUT 3, INV 1, INV 2, INV 3, PRI 1, PRI 2, PRI3, VER 1, VER 2 e VER 3, e correspondem, respectivamente, ao material vegetal obtido de três indivíduos no outono, inverno, primavera e verão.

2.2 Extração e análise do óleo essencial

O material vegetal, composto de folhas frescas picadas, foi submetido à hidrodestilação, utilizando-se o aparelho Clevenger modificado (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010), acoplado a um balão de fundo redondo, com capacidade de 5 L, durante 3 h. As extrações foram realizadas em triplicatas, com aproximadamente 500 g de folhas em cada balão, sendo os OE armazenados em frascos de vidro

âmbar, vedados e conservados à - 4°C antes da análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM).

A análise por CG-EM foi realizada usando cromatógrafo gasoso Agilent 6890 acoplado com detector seletivo de massas em série Agilent 5973 com uma coluna capilar de sílica fundida HP5-MS (Hewlett Packard, 5% fenilmetilsiloxano, 30 m x 0,25 mm, espessura do filme: 0,25 µm) e energia de ionização de 70 eV. As condições de operação foram as seguintes: *split inlet* 1:100; temperatura do programa de 40 °C (Ti) por 4 min; 40-320 °C , 4 °C min⁻¹; Hélio como gás carreador; taxa de fluxo 1 mL min⁻¹; temperatura do injetor e detector de 250 °C; banco de dados: NIST, 2005.

Os componentes dos óleos essenciais foram identificados com base no índice de retenção (IR), determinados através da utilização de uma curva de calibração de uma série homóloga de *n*-alcanos (C8-C32) injetados nas mesmas condições cromatográficas das amostras e nos modelos de fragmentação dos espectros de massas, sendo ambos comparados com dados da literatura (ADAMS, 2001; NIST, 2005). A concentração dos constituintes foi calculada através da área integral de seus respectivos picos, relacionada com a área total de todos os constituintes da amostra, obtida pela análise utilizando o cromatógrafo gasoso.

2.3 Análises estatísticas multivariadas

Foram realizadas as Análises de Componentes Principais (ACP) e Hierárquica de Cluster (AHC) para avaliar a variabilidade sazonal do OE de *N. grandiflora*, com base nas porcentagens relativas dos 17 constituintes majoritários.

Para a AHC, a divergência entre as amostras foi quantificada a partir da Distância Euclidiana, como medida de dissimilaridade. Com base na distância entre as amostras, estas foram agrupadas utilizando o método do Vizinho mais Próximo, ou de ligação simples (SAITOU; NEI, 1987). A ACP foi utilizada para estabelecer quais as variáveis que mais contribuíram para os agrupamentos e a correlação com as amostras analisadas. Para a análise da matriz dos dados (12 amostras de OE,

três em casa estação do ano, 17 componentes com $\geq 1.0\%$ pelo menos em uma amostra) foi utilizado o software STATISTICA 6.0.

3 RESULTADOS

Através da análise por CG-EM, foram identificados 50 constituintes nas 12 amostras de OE estudadas, perfazendo 87,6-96,5% da composição química total. Dos 17 constituintes voláteis com percentagens $\geq 1.0\%$ considerados para as análises (Figura 1), predominaram os sesquiterpenóides (66,7-80,4%), enquanto que os monoterpenóides compreenderam 3,0-17,7%, e os diterpenóides 2,6-11,0%. Os sesquiterpenóides predominaram em todas as estações, sendo que no inverno foi verificada a maior percentagem de sesquiterpenóides oxigenados (38,7%). Do mesmo modo, observa-se uma pequena variabilidade sazonal quantitativa dos constituintes majoritários do OE durante as estações estudadas.

Entre os sesquiterpenóides majoritários destacam-se a deidrofuquinona, o composto "F" (sesquiterpenóide oxigenado ainda não identificado), o valenceno e o biciclogermacreno. Observando-se as variações das concentrações desses compostos durante o período analisado (Figura 2), nota-se uma estreita correlação entre os constituintes deidrofuquinona e composto "F", sendo esses sesquiterpenóides oxigenados, enquanto que valenceno e biciclogermacreno correspondem a hidrocarbonetos sesquiterpênicos. Considerando os dados referentes às 12 amostras de OE, observa-se que no inverno houve uma maior proporção de deidrofuquinona (24,97%) e do composto "F" (11,18%) no OE das folhas de *N. grandiflora*. Por outro lado, é nessa estação que os teores de biciclogermacreno e valenceno são os mais baixos (8,45 e 4,84%, respectivamente). Já na estação da primavera, observa-se um declínio das concentrações relativas de deidrofuquinona e do composto "F", bem como um aumento dos níveis de biciclogermacreno e valenceno.

Os resultados obtidos a partir da ACP e AHC revelaram a inexistência de variabilidade sazonal da composição química dos OE das folhas de *N. grandiflora* coletadas na mesma população durante o período em análise. A ACP evidenciou 11

componentes principais (CP), sendo que o primeiro CP representa 42,01% da variância total, e os quatro primeiros CP, com autovalores superiores a 1,0 (Tabela 1), explicam 87,54% da variância total, indicando a significância da escolha de quatro CP.

Entre as variáveis que possuem maior importância na análise e que contribuem para o CP 1 estão os constituintes α e β -pineno, β -E-ocimeno, entre outros, como mostra a Tabela 1. O CP 2, que explica 22,05% da variância total, agrupou as variáveis α -guaïeno, biciclogermacreno, composto "F" e a deidrofuquinona como as variáveis relevantes. Também é possível verificar que as variáveis β -cariofileno, composto "M", rimueno e caureno, contribuem pouco para os dois primeiros CP (Figura 3A). Através da análise comparativa entre as Figuras 3A e 3B verifica-se que as variáveis C10 e C3 estão relacionadas com a segunda amostra de OE coletada no outono (OUT 2), assim como a variável C14 está ligada às amostras INV 2, PRI 3 e OUT 3, enquanto que as variáveis C1 e C2 estão correlacionadas com a amostra PRI 1.

A AHC indicou a divisão das 12 amostras de OE em 5 grupos químicos A, B, C, D e E, conforme o dendrograma (Figura 4). O primeiro grupo (A) foi formado por uma amostra apenas (OUT 2), divisão essa resultante da presença do composto biciclogermacreno em alta concentração no OE (21,8%). A amostra PRI 1 também formou um agrupamento separado das demais, por apresentar em sua composição volátil maiores teores de α e β -pineno, ambos com aproximadamente 4%, e caracteriza o grupo B. As amostras que apresentavam porcentagens do composto deidrofuquinona de aproximadamente 20% e o composto rimueno compuseram o agrupamento C.

As amostras INV 2, VER 3, OUT 3 e PRI 3 foram agrupadas no grupo D e correspondem àquelas obtidas a partir de um mesmo indivíduo, coletado nas quatro estações do ano. Nota-se também que os OE referente às coletas INV 2 e OUT 3 possuem a maior similaridade, pois foi fazer parte da primeira ligação formada no dendrograma, ou seja, possuem a menor Distância Euclidiana. O grupo E foi caracterizado pelas amostras que possuíam a predominância, em quantidades de aproximadamente 10% do constituinte caureno, sendo elas INV 1, OUT 1 e PRI 2.

4 DISCUSSÃO

São crescentes as pesquisas que relacionam os fatores climáticos, ambientais, genéticos, geográficos, etc., com a produção e a constância dos metabólitos secundários das plantas, e comprovam a influência destas variáveis sobre a biossíntese de constituintes, principalmente sobre os terpenóides (LIMA; KAPLAN; CRUZ, 2003; TAVEIRA et al., 2003; COSTA et al., 2009; DUARTE et al., 2012). Para o OE das folhas de *Aniba canelilla* (Kunth) Mez foi verificado que a variação quantitativa dos constituintes majoritários é devido às condições ambientais locais e à estação de coleta (TAVEIRA et al., 2003). De maneira semelhante, foi observado que os OE das folhas de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Br. ex Britton & P. Wilson (BARROS et al., 2009), *Myrcia tomentosa* (Aubl.) DC. (SÁ et al., 2012), *Cryptocarya mandioccana* Meisn. (TALASCREA et al., 2007) e *Eugenia uniflora* L. (COSTA et al., 2009) apresentam variabilidade sazonal.

O agrupamento aleatório das 12 amostras pelas análises ACP e AHC, independente do período de coleta, indica a ausência da influência da sazonalidade sobre a composição química do OE das folhas de *N. grandiflora*. A pequena variação observada entre as amostras pode ser devida em grande parte aos fatores genéticos dos indivíduos analisados, conforme anteriormente descrito para o OE da espécie *Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg (DUARTE et al., 2012). O estudo realizado por Jug-Dujakovic et al. (2012), o qual avaliou a composição do OE de *Salvia officinalis* Poved. em 25 diferentes populações indígenas, também propôs que a variação observada é devido aos aspectos genéticos, uma vez que o fator ambiental é controlado.

Outro fator influenciador dos agrupamentos pode estar relacionado à fisiologia da plantas, que sintetizam terpenóides em diferentes estágios de seu desenvolvimento para vários propósitos biológicos (McGARVEY; CROTEAU, 1995). A amostra de OE da coleta PRI 1, que coincide com o estágio de plena floração e brotação da planta, contou com os maiores níveis de monoterpenos (α -pineno e β -E-ocimeno). Há relatos que esses compostos são os responsáveis pelas defesas, indireta e direta, bem como pela polinização de algumas plantas, justificando o aparecimento nesse período (DAS et al., 2013). Conforme Baby et al. (2010), é nos

estágios iniciais de crescimento que a planta correlaciona a expansão do seu território (brotação/desenvolvimento foliar) com o aumento metabólico das necessidades de defesa. Dessa maneira, os monoterpenos, sendo compostos mais facilmente emitidos para o ar circundante, devido às altas pressões de vapor, podem promover muitas vezes uma defesa química à planta (BABY et al., 2010).

O incremento na concentração da deidrofuiquinona no OE de *N. grandiflora* observado no inverno sugere uma função de defesa para esse composto. Uma vez que sesquiterpenóides são muitas vezes fitoalexinas, produzidas pelos vegetais como proteção contra o ataque direto de microrganismos (LUNA-HERRERA et al., 2007; BABY et al., 2010; HUFFAKER et al., 2011), o aumento na biossíntese deste constituinte majoritário pode ter ocorrido como consequência indireta das condições ambientais de umidade e temperatura presente nesta estação, o que propicia o desenvolvimento microbiano (LI et al., 2012). Esta suposição é reforçada por Cunico et al. (2010), que verificaram o potencial antimicrobiano do OE das folhas de *N. grandiflora*. Adicionalmente, a atividade antibacteriana da deidrofuquinona foi descrita na literatura (BOLZAN, 2007).

Os resultados aqui descritos se assemelham aos encontrados por Barbosa et al. (2012) para a espécie *Copaifera multijuga* Hayne, que também reportaram o aumento do composto β -cariofileno na estação chuvosa, devido a sua função de defesa contra a intensificação do ataque de insetos herbívoros. Relatos sobre respostas químicas aos danos causados por herbívoros ou patógenos por parte das plantas têm revelado que os voláteis induzidos nessas ocasiões exercem funções de defesa e atração (DUDAREVA; PICHERSKY; GERSHENZON, 2004; GLINWOOD; NINKOVIK; PETTERSSON, 2011). Um estudo realizado com o OE de *Curcuma haritha* Mangaly & Sabu indicou que o equilíbrio entre os mono e sesquiterpenóides é causado pelas diferenças nas taxas de biossíntese desses compostos e também pelo desvio de recursos nos níveis genético/molecular/enzimático em diferentes estágios de crescimento da espécie (BABY et al., 2010).

5 CONCLUSÃO

Não foi observada variabilidade significativa na composição química do OE das folhas de *Nectandra grandiflora* nas quatro estações do período em estudo. Houve a predominância dos sesquiterpenóides e o composto majoritário foi a deidrofuquinona em todas as amostras analisadas. As pequenas diferenças observadas nas amostras de OE indicam que o padrão de variabilidade encontrado no presente estudo é controlado geneticamente, uma vez que os indivíduos coletados estão sob as mesmas condições ambientais, assim como fisiologicamente. Através da Análise Hierárquica de Cluster as amostras de OE foram divididas em 5 grupos químicos de acordo com a concentração, presença e/ou ausência dos compostos voláteis identificados. O incremento da concentração da deidrofuquinona no inverno parece estar relacionado ao aumento das necessidades de defesa da planta contra o ataque microbiano.

AGRADECIMENTOS

Este estudo teve o suporte financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS/PRONEX, Documento No. 10/0016-8), do Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico (CNPq, Documento No. 470964/2009-0). Os autores são gratos à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pesquisa de Nível Superior (CAPES) e ao CNPQ pelas bolsas concedidas. Ao Engenheiro Agrônomo Jorge Diefenthaler pela colaboração na coleta dos dados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy**. Illinois: Allured Publishing Corporation, 2001.

BABY, S. et al. Volatile chemistry of a plant: mono-sesquiterpenoid pattern in the growth cycle of *Curcuma haritha*. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 25, p. 35-40, 2010.

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

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils – A Review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446-475, 2008.

BARBOSA, P. C. S. et al. Influence of abiotic factors on the chemical composition of copaiba oil (*Copaifera multijuga* Hayne): soil composition, seasonality and diameter at breast height. **Journal of the Brazilian Chemistry Society**, v. 23, n. 10, p. 1823-1833, 2012.

BARROS, F. M. C. et al. Variabilidade sazonal e biossíntese de terpenóides presentes no óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 861-867, 2009.

BOLZAN, A. A. **Constituintes de *Senecio platensis* Arech. Isolamento, elucidação estrutural e avaliação antibacteriana**. 2007. 164 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.

COSTA, D. P. et al. Seasonal variability of essential oils of *Eugenia uniflora* leaves. **Journal of the Brazilian Chemistry Society**, v. 20, n. 7, p. 1287-1293, 2009.

CUNICO, M. M. et al. Estudo preliminar antimicrobiano e fitoquímico do óleo essencial foliar da *Nectandra grandiflora* Nees (canela-amarela). In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON EDUCATION FOR SUSTAINABLE DEVELOPMENT, 2010, Curitiba. **Anais...** Curitiba, Brasil: UFPR, 2010.

DAS, A. et al. Plant volatiles as method of communication. **Plant Biotechnology Report**, v. 7, p. 9-26, 2013.

DUARTE, A. R. et al. Influence of spatial, edaphic and genetic factors on phenols and essential oils of *Myrciaria cauliflora* fruits. **Journal of the Brazilian Chemistry Society**, v. 23, n. 4, p. 737-746, 2012.

DUDAREVA, N.; PICHERSKY, E.; GERSHENZON, J. Biochemistry of plant volatiles. **Plant Physiology**, v. 135, n. 1893-1902, 2004.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 5ª ed. São Paulo: Atheneu, 2010.

FIGUEIREDO, A. C. et al. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 23, p. 213-226, 2008.

GLINWOOD, R.; NINKOVIK, V.; PETTERSSON, J. Chemical interaction between undamaged plants – Effects on herbivores and natural enemies. **Phytochemistry**, v. 72, p. 1683-1689, 2011.

HUFFAKER, A. et al. Novel acidic sesquiterpenoids constitute a dominant class of pathogen-induced phytoalexins in maize. **Plant Physiology**, v. 156, p. 2082–2097, 2011.

JUG-DUJAKOVIC, M. et al. High diversity of indigenous populations of Dalmatian Sage (*Salvia officinalis* L.) in essential oil composition. **Chemistry and Biodiversity**, v. 9, p. 2309-2323, 2012.

IBGE. **Manual técnico da vegetação brasileira**. Rio de Janeiro: IBGE, 1992. 91p.

ISMANN, M. B.; MACHIAL, C. M. Pesticides based on plant essential oils: from traditional practice to commercialization. **Advances in Phytomedicine Naturally Occuring Bioactive Compounds**, v.3, p. 29–44, 2006.

LI, A. et al. Experimental study on microorganism ecological distribution and contamination mechanism in supply air ducts. **Energy and Buildings**, v. 47, p. 497-505, 2012.

LIMA, H. R. P.; KAPLAN, M. A. C.; CRUZ, A. V. M. Influência dos fatores abióticos na produção e variabilidade de terpenóides em plantas. **Floresta e Ambiente**, v. 10, n. 2, p. 71-77, 2003.

LUNA-HERRERA, M. C. et al. Synergistic antimycobacterial activities of sesquiterpene lactones from *Laurus* spp. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, p. 548–552, 2007.

McGARVEY, D. J.; CROTEAU, R. Terpenoid Metabolism. **The Plant Cell**, v. 7, p. 1015-1026, 1995.

MORENO, P. R. H. et al. Chemical constituents and antitumor activity of *Nectandra grandiflora*. **International Journal of Pharmacognosy**, v.31, p.189-192, 1993.

NIST/ EPA/ NIH mass spectral library and search/ analysis programs. Hoboken, NJ: J. Wiley and Sons, 2005.

SÁ, F. A. S. et al. Essential oils in aerial parts of *Myrcia tomentosa*: composition and variability. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, n. 6, p. 1233-1240, 2012.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, p. 406-425, 1987.

SAYYAH, M. et al. Analgesic and anti-inflammatory activity of the leaf essential oil of *Laurus nobilis* Linn. **Phytotherapy Research**, v. 17, p. 733-736, 2003.

TAVEIRA, F. S. N. et al. Seasonal essential oil variation of Aniba canelilla. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 31, p. 69-75, 2003.

TELASCREA, M. et al. Essential oil from leaves of *Cryptocarya mandioccana* Meisner (Lauraceae): Composition and intraspecific chemical variability. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 25, p. 222-232, 2007.

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

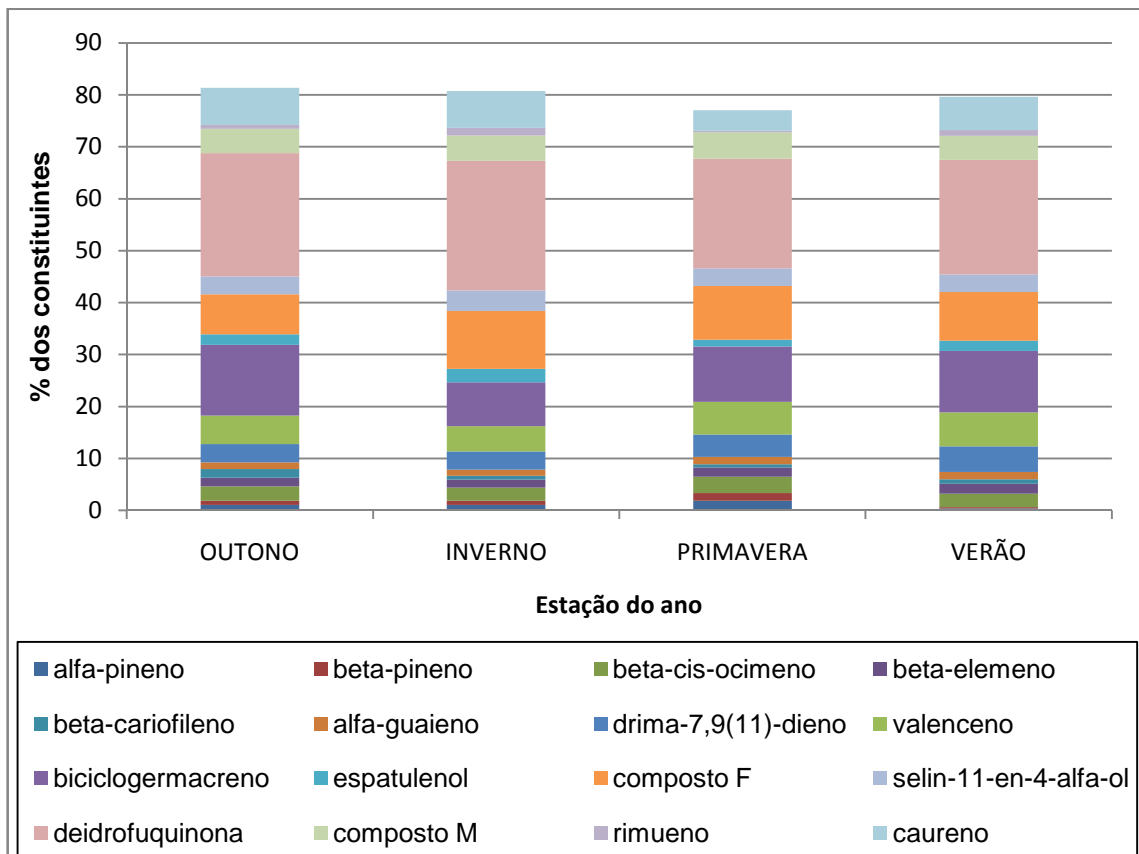


Figura 1 – Representação gráfica da porcentagem média dos 17 constituintes majoritários presentes nas 12 amostras de óleo essencial extraído das folhas de *Nectandra grandiflora* nas diferentes estações do ano. (N=3).

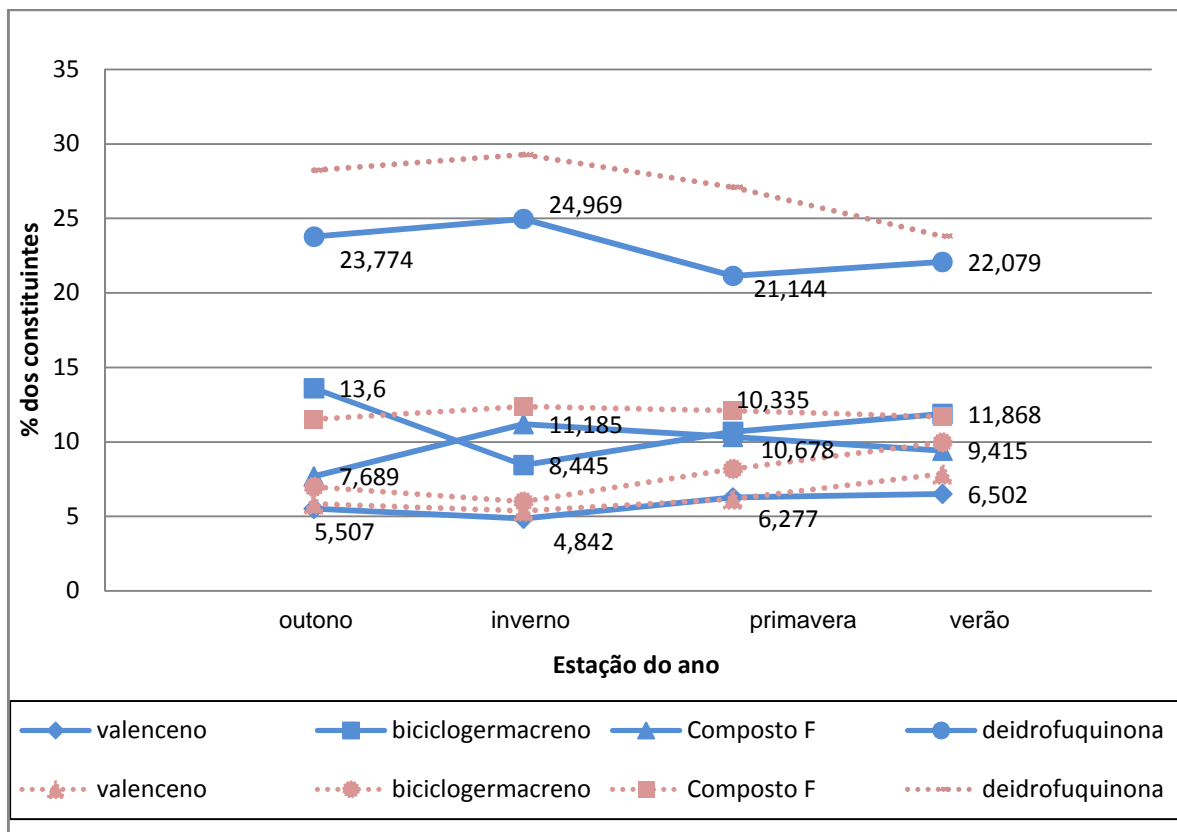


Figura 2 – Variação sazonal dos sesquiterpenóides majoritários presentes no óleo essencial das folhas de *Nectandra grandiflora*.

Linha contínua azul=referente as 12 amostras de óleo essencial; Linha pontilhada rosa=referente ao mesmo indivíduo.

Tabela 1 – Autovalores e percentual da variância explicada de cada componente principal, baseada na matriz de correlação, e variáveis relacionadas.

Número de componentes	Autovalores	% da variância explicada	Autovalores acumulados	% da variância explicada acumulada	Variáveis
1	7,141623	42,00955	7,14162	42,0095	α-pineno, β-pineno, β-E-ocimeno, β-elemeno, drima-7,9(11)-dieno, valenceno
2	3,749176	22,05398	10,89080	64,0635	α-guaieno, biciclogermacreno, composto "F", deidrofuquinona
3	2,201164	12,94802	13,09196	77,0116	Caureno
4	1,786797	10,51057	14,87876	87,5221	Rimueno
5	0,933147	5,48910	15,81191	93,0112	
6	0,534443	3,14378	16,34635	96,1550	
7	0,370111	2,17712	16,71646	98,3321	
8	0,154991	0,91171	16,87145	99,2438	
9	0,073743	0,43378	16,94519	99,6776	
10	0,049017	0,28833	16,99421	99,9659	
11	0,005790	0,03406	17,00000	100,0000	

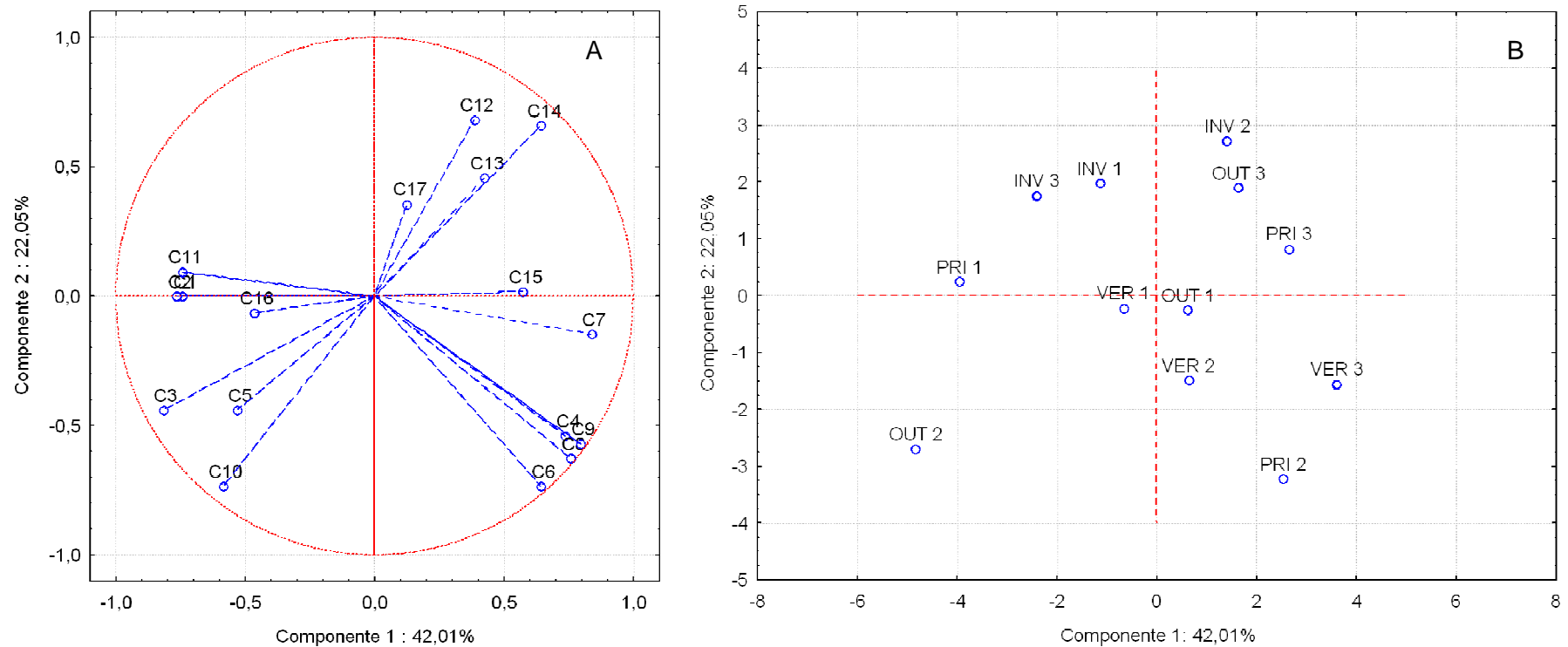


Figura 3 – Análise de Componentes Principais baseada na composição química de 12 amostras de óleos essenciais obtidos a partir das folhas de *Nectandra grandiflora* nas diferentes estações do ano.

A=Representação das variáveis no plano dos componentes principais 1 e 2; B=Representação das amostras no plano dos componentes principais 1 e 2. C1-C17: 17 constituintes com percentagens $\geq 1,0\%$ considerados na análise; PRI 1, 2 e 3: amostras obtidas na primavera; VER 1, 2 e 3: amostras obtidas no verão; OUT 1, 2 e 3: amostras obtidas no outono; INV 1, 2 e 3: amostras obtidas no inverno.

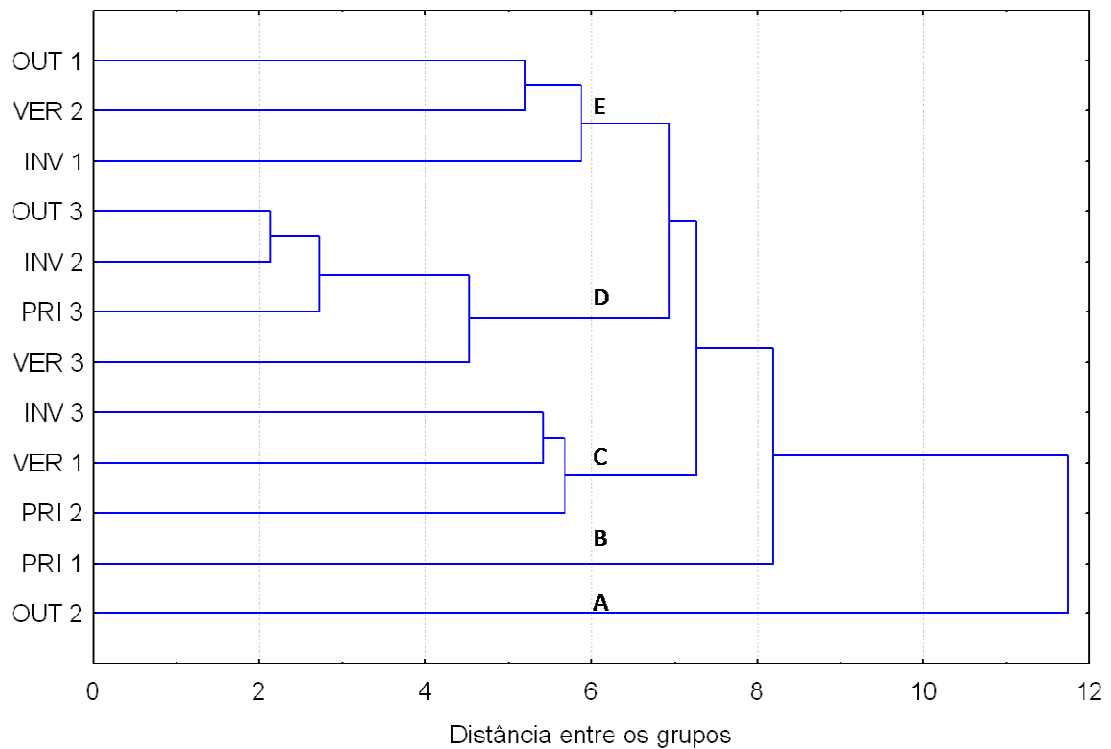


Figura 4 – Dendrograma referente à composição química das 12 amostras de óleo essencial de *Nectandra grandiflora*, através do método de agrupamento do Vizinho mais Próximo, e com a Distância Euclidiana como medida de dissimilaridade, mostrando a divisão das amostras em 5 grupos A, B, C, D e E.

PRI 1, 2 e 3: amostras obtidas na primavera; VER 1, 2,e 3: amostras obtidas no verão; OUT 1, 2 e 3: amostras obtidas no outono; INV 1, 2 e 3; amostras obtidas no inverno.

5 RESULTADOS ADICIONAIS

5.1 Estudo do potencial sedativo/anestésico do óleo essencial de *Ocotea acutifolia* sobre juvenis de *Rhamdia quelen*

5.1.2 Material e Métodos

5.1.2.1 Material vegetal e extração do óleo essencial

Folhas de *Ocotea acutifolia* (Nees) Mez foram coletadas em área rural do município de São Francisco de Assis (Maio, 2011). A espécie foi identificada pelo Prof. Solon Jonas Longhi, e uma exsicata encontra-se arquivada no herbário do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), sob o registro SMDB nº 13.450.

O OE foi extraído por hidrodestilação, utilizando-se aparelho Clevenger modificado, durante 3 h (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010). Após, foi armazenado em frasco de vidro âmbar, vedado e conservado à - 4°C até o momento do ensaio biológico. O teor de OE foi obtido por pesagem em balança de precisão e posterior cálculo do rendimento (% m/m), em relação à massa fresca do material vegetal.

5.1.2.2 Animais

Os juvenis de jundiá (*Rhamdia quelen*) foram adquiridos de um viveiro local, transportados ao Laboratório de Fisiologia Animal e mantidos em aeração contínua em tanques de 250 L, com parâmetros de água controlados. Oxigênio dissolvido ($8.97 \pm 0.39 \text{ mg L}^{-1}$) e temperatura ($19.55 \pm 0.69^\circ\text{C}$) foram mensurados com

oxímetro YSI (Modelo Y5512); pH (7.8 ± 0.03) foi determinado com phmetro DMPH-2, e os níveis de amônia total ($0.90 \pm 0.04 \text{ mg L}^{-1}$) foram mensurados pela método de salicilato (VERDOUW; VAN ECHELD; DEKKERS, 1978). Um sistema semi-estático foi utilizado, pelo qual 50% do volume de água era trocado diariamente. Os peixes eram alimentados uma vez ao dia com ração comercial (28% de proteína), permanecendo em jejum por 24 h antes do início dos experimentos biológicos. A metodologia usada foi aprovada pelo Comitê de Ética e Bem Estar Animal da UFSM (Processo nº 46/2010).

5.1.2.3 Ensaio biológico

Os juvenis de dimensões $12,68 \pm 0,70 \text{ g}$ e $10,85 \pm 0,23 \text{ cm}$, foram transferidos ao aquário contendo 1 L de água continuamente aerada e as concentrações de OE primeiramente diluídas em etanol destilado (1:10). As concentrações de 50, 100, 150, 300, 600 e $900 \mu\text{L L}^{-1}$ do OE de *O. acutifolia* foram as testadas. Para avaliar o tempo requerido para a indução da anestesia, 6 juvenis foram utilizados para cada concentração testada e, cada animal foi usado uma única vez, de acordo com Schoettger e Julian (1967). O método desenvolvido por esses autores envolve seis estágios, em que os seguintes parâmetros foram observados: sedação leve e profunda (estágios 1 e 2, respectivamente), perda parcial e total de equilíbrio (estágios 3a e 3b, respectivamente), anestesia profunda (estágio 4) e colapso medular (estágio 5). O tempo máximo de observação foi de 30 minutos. Após a indução à anestesia, os juvenis foram transferidos para um aquário contendo água aerada para mensurar o tempo de recuperação. Os animais foram considerados recuperados quando mostravam comportamento normal de nado em resposta a um estímulo externo. Após a recuperação os animais foram agrupados de acordo com o protocolo de anestesia e submetidos à observação em um tanque de 40 L de água continuamente aerada por 48 h, a fim de verificar qualquer comportamento anormal, doenças ou mortalidade.

5.1.2.4 Análise estatística

Os dados estão apresentados como média \pm EPM. A relação entre o tempo requerido para a indução à anestesia e a concentração do anestésico foi determinada pelo software Slide Write Plus versão 4.0. Para verificar a homogeneidade das variâncias e a normalidade, todos os dados foram submetidos aos testes de Levene e Shapiro-Wilk, respectivamente. Análise de variância de uma via e teste Tukey foram usados para os dados de indução a anestesia e recuperação. O estágio 3b com OE de *O. acutifolia* foi submetido ao teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste Dunn. As análises estatísticas foram realizadas no software SigmaPlot versão 11.0, com o nível mínimo de significância $P < 0,05$.

5.1.3 Resultados

O OE de *O. acutifolia* mostrou efeitos anestésicos e sedativos em juvenis de jundiá, através da administração de banho. O controle de etanol equivalente às maiores concentrações utilizadas para diluir o OE, não produziu nenhum efeito anestésico quando aplicado individualmente.

Os peixes expostos ao OE de *O. acutifolia* alcançaram anestesia profunda nas concentrações que variaram de 300 (13 min) a 900 $\mu\text{L L}^{-1}$ (18 min), enquanto que baixas concentrações (50-150 $\mu\text{L L}^{-1}$) não induziram a anestesia durante o período avaliado (30 min) (Figura 1). Somente 50% dos animais expostos a 150 $\mu\text{L L}^{-1}$ e 17% dos peixes expostos a 300 $\mu\text{L L}^{-1}$ recuperaram durante o tempo de observação, contudo, todos os animais testados na concentração de 50 $\mu\text{L L}^{-1}$ retornaram ao comportamento normal dentro de aproximadamente 11 min. Efeito adverso como a secreção de muco foi observado para os peixes expostos a 900 $\mu\text{L L}^{-1}$, no entanto nenhuma mortalidade foi evidenciada até 48h após a exposição ao OE de *O. acutifolia*. A atividade anestésica do OE de *O. acutifolia* foi relatada juntamente com a atividade de OE de outras duas espécies vegetais, em manuscrito científico submetido e aceito pelo periódico Neotropical Ichthyology (em Anexo).

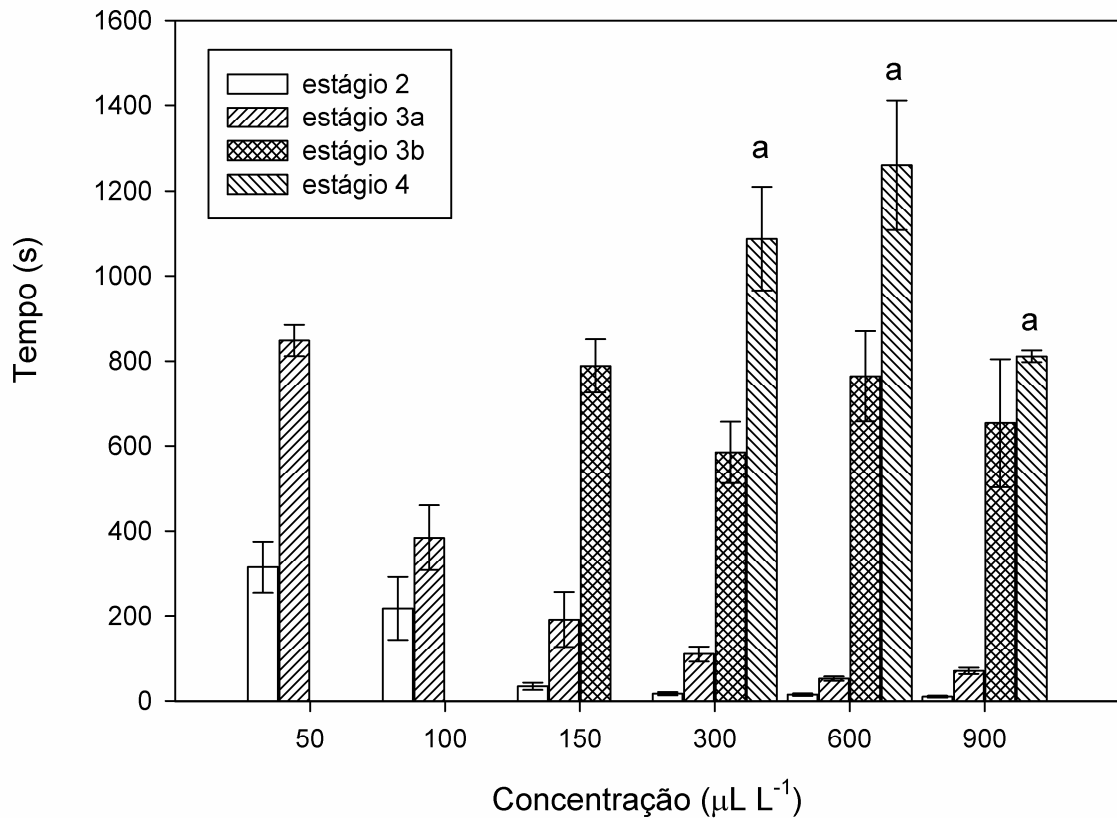


Figura 1 – Tempo de indução à anestesia apresentado por diferentes concentrações do óleo essencial de *Ocotea acutifolia* em juvenis de jundiá. Estágios são definidos de acordo com Schoettger e Julian (1967). Tempo máximo de observação foi 30 min.

Dados estão apresentados como média \pm EPM (N=6). Diferentes letras indicam diferença significativa entre as concentrações para o mesmo estágio ($P < 0,05$).

Tabela 1 – Correlação entre o tempo requerido para alcançar os estágios de indução à anestesia e a concentração de óleo essencial (OE) de *Ocotea acutifolia* em juvenis de jundiá.

OE	Estágio de indução à anestesia				Tempo de Recuperação
	2	3a	3b	4	
<i>O. acutifolia</i>	$\ln y = 1,15 + 34,36/x^{0,5}$ ($R^2 = 0,91$)	$\ln y = 3,20 + 25,62/x^{0,5}$ ($R^2 = 0,97$)	$y = 1401,54 - 5,80x + 0,013x^2 - 0,00000793x^3$ ($R^2 = 1$)	-----	-----

Onde x=concentração de óleo essencial ($\mu\text{L L}^{-1}$); y=tempo para alcançar a indução e a recuperação a partir da anestesia (Schoettger and Julian, 1967), dado em segundos (s).

5.2 Estudo do potencial larvicida do óleo essencial de *Nectandra grandiflora* contra larvas de Coenagrionidae (Odonata)

5.2.1 Material e Métodos

5.2.1.1 Material vegetal e extração do óleo essencial

Folhas de *Nectandra grandiflora* Nees foram coletadas em área rural do município de Jaguari (Outubro de 2011). A espécie foi identificada pelo Prof. Solon Jonas Longhi, e uma exsicata encontra-se depositada no herbário do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), sob o registro SMDB nº 13.162.

O OE foi extraído por hidrodestilação, utilizando-se aparelho Clevenger modificado, durante 3 h (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010), sendo armazenado em frasco de vidro âmbar, vedado e conservado à - 4°C até a realização do ensaio biológico. O teor de OE foi obtido por pesagem em balança de precisão e posterior cálculo do rendimento (% m/m), em relação à massa fresca do material vegetal.

5.2.1.2 Coleta e identificação das larvas de Coenagrionidae

As larvas da família Coenagrionidae foram coletadas em açudes do Departamento de Zootecnia da UFSM em Outubro de 2011. Essas coletas foram realizadas no período da manhã, com o auxílio de redes entomológicas para capturar as larvas presentes no substrato ao longo das margens do açude. As larvas coletadas foram acondicionadas em sacos plásticos contendo água do próprio açude, e após o experimento foram armazenadas em recipientes com etanol (70%) para a sua identificação (CARVALHO, 2007).

5.2.1.3 Ensaio biológico

Para avaliar o potencial larvicida do OE de *N. grandiflora*, uma amostra de OE na concentração de $100 \mu\text{L L}^{-1}$, foi diluída em etanol destilado (95%) (1:10), e aplicada em aquário contendo 0,5 L de água destilada e cinco larvas de Coenagrionidae. Controles de água e etanol na mesma proporção usada para diluir o OE também foram realizados. A amostra foi avaliada em triplicata, cada qual com larvas de tamanho heterogêneo e de similares características morfológicas. A heterogeneidade no tamanho das larvas foi mantida para mimetizar as condições encontradas nos tanques de aquicultura. A mortalidade das larvas foi computada em 10 diferentes tempos após o tratamento. A última contagem ocorreu 19 h após o início do experimento, devido à observação de mortalidade no controle de água. As larvas foram consideradas mortas quando não respondiam a estímulos externos, ou quando mostravam posições anormais e sem ascensão para a superfície (SANTOS et al., 2012).

5.2.1.4 Análise estatística

Os dados foram transformados para *arcosseno* antes da análise estatística. Para a verificação da homogeneidade das variâncias os dados foram submetidos ao teste de Levene. A mortalidade entre as amostras em diferentes tempos de exposição foi analisada pelos testes de Kruskal-Walis e Mann-Whitney, utilizando-se o software SPSS ($P < 0,05$). Os dados estão apresentados por média \pm EPM.

5.2.2 Resultados

A identificação das larvas ocorreu somente em nível de gênero, sendo identificados os gêneros *Acanthagrion*, *Homeoura*, *Ischnura* e *Oxyagrion* (COSTA; SOUZA; OLDRINI, 2004).

O OE de *N. grandiflora* na concentração de 100 $\mu\text{L L}^{-1}$ promoveu efeito larvicida somente após 6 h de exposição. A última observação realizada às 19 h evidenciou a morte de $25,0 \pm 14,43\%$ do total das larvas (Tabela 2).

Tabela 2 – Mortalidade e análise estatística dos resultados obtidos no ensaio da atividade larvívora do óleo essencial de *Nectandra grandiflora* frente às larvas de Coenagrionidae.

Amostra	Mortalidade (%)				
	1 min	4 h	6 h	9 h	19 h
Controle de água	0,0 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,0 ^a	4,17 ± 4,17 ^a
Controle de etanol	0,0 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,0 ^a
<i>N. grandiflora</i>	0,0 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,0 ^a	8,33 ± 8,33 ^a	8,33 ± 8,33 ^a	25,0 ± 14,43 ^a

6 DISCUSSÃO GERAL

Os inventários botânicos têm revelado que a família Lauraceae está, em termos florísticos e econômicos, entre as mais importantes famílias de Angiospermas (BAITELLO, 2001). Acoplado a isso, a falta de manejo florestal é um dos fatores que colocam em perigo de extinção a maior parte das suas espécies (QUINET; ANDREATA, 2002). Os gêneros *Ocotea* e *Nectandra* são os mais representativos entre as Lauráceas, com espécies que frequentemente estão no foco das pesquisas científicas mundiais. Considerando-se OE de ambos os gêneros, verifica-se através da literatura, que os estudos são crescentes e promissores. Uma grande fatia dos estudos envolve o gênero *Ocotea*, não obstante, é o gênero que possuiu cerca de 350 espécies, destas 120-170 ocorrem no Brasil, das quais 110 são endêmicas (BAITELLO, 2001; QUINET et al., 2012). Além disso, é o grupo com o maior número de espécies utilizadas para as mais diversas finalidades, principalmente na medicina popular (MARQUES, 2001). O gênero *Nectandra* é o segundo em importância das Lauráceas (ALVES; SARTORI, 2009), no entanto, as pesquisas relacionadas às espécies desse gênero são relativamente escassas, principalmente no que diz respeito aos seus OE.

A produção de OE não depende somente do estado metabólico da planta e do tecido vegetal sintetizador, mas está altamente interligada com sua função fisiológica na planta, bem como aos fatores ecofisiológicos e ambientais (SANGWAN et al., 2001). Deste modo, um estudo visando à produção de OE deve iniciar avaliando os fatores que culminam na variabilidade e heterogeneidade dos mesmos (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Quando analisamos a composição química do OE de *N. grandiflora*, durante um ano, observou-se que o período em que houve a maior concentração de deidrofuquinona na composição volátil coincide com o inverno, e é nesta estação em que se obteve o menor rendimento de OE das folhas dessa espécie. Observa-se também que houve grande variação na porcentagem do composto deidrofuquinona entre as 12 amostras analisadas, que variou de 17,07 até 29,29 % (matriz de dados não publicada), indicando a influência do fator genético na concentração deste

composto no OE, assim como a época de floração, conforme o observado no Manuscrito 2.

Já nas estações da primavera e verão, período reprodutivo da planta, observa-se teores crescentes de biciclogermacreno, diferente do encontrado em *Myrcia tomentosa* (Aubl.) DC., que apresentou um aumento dos níveis desse composto no mês de junho, que corresponde ao período vegetativo da planta (SÁ et al., 2012). Não obstante, foi evidenciado que a porcentagem do composto biciclogermacreno no OE de *Hypericum perforatum* L. é também dependente das fases fenológicas, apresentando a maior porcentagem durante a floração plena da espécie, sendo este também o período ideal para a extração do OE, visto seu alto rendimento (AZIZI; BETTI; SCHMIDT, 2005). Do mesmo modo, foi na estação da primavera que o OE das folhas de *N. grandiflora* apresentou o maior rendimento, período que coincide com a floração da espécie.

A atividade anestésica observada para o OE de *O. acutifolia* no presente estudo não foi totalmente inesperada. Recentes estudos com espécies pertencentes à família Lauraceae mostraram que esse grupo de espécies possui substâncias que apresentam propriedades sobre o Sistema Nervoso Central (SNC), como as atividades analgésicas, sedativas e vasorrelaxantes (MORAIS; BARBOSA-FILHO; ALMEIDA, 1998; BEIRITH et al., 1999; SLISH et al., 1999; ZSCHOCKE et al., 2000b; SILVA FILHO et al., 2004; ZHANG, 2004; GIOGERTTI; NEGRI; RODRIGUES, 2007; TONDOLO, 2011).

Práticas modernas de aquicultura frequentemente expõem os animais aquáticos a uma variedade de fatores estressores que afetam negativamente o desempenho e a sobrevivência dos mesmos. Para assegurar o bem estar e minimizar a hiper mobilidade dos peixes, os agentes anestésicos se tornam necessários e são cada vez mais recomendados. Neste caso, os anestésicos são usados para auxiliar na manipulação dos peixes durante as práticas de enumeração, análises patológicas, implante de hormônios, vacinações, bem como no transporte, amostragem, captura e no abate (BARTON, 2002; INOUE; NETO; MORAES, 2003; COOKE et al., 2004; COYLE; DURBOROW; TIDWELI, 2004; ZAHL; SAMUELSEN; KIESSLING, 2012).

A busca por substâncias anestésicas obtidas a partir de fontes naturais é crescente. Entre os agentes que possuem efeitos sedativo-anestésicos já descritos para diferentes espécies de peixes estão os OE de *Eugenia caryophyllata* Thunb. e

E. aromatica O. Berg (INOUE; NETO; MORAES, 2003; BRESSLER; RON, 2004), *Cinnamomum cassia* (L.) D. Don (POWER; FUENTES; HARRISON, 2010), *Melaleuca alternifolia* (HAJEK, 2011), e *Ocimum gratissimum* L. (BENOVIT et al., 2012; SILVA et al., 2012). Os compostos isolados eugenol (CUNHA et al., 2010b) e mentol (FAÇANHA; GOMES, 2005) também possuem propriedades anestésicas descritas.

A atividade anestésica observada para o OE de *O. acutifolia*, pode ser explicada pela ação de seu constituinte majoritário, o óxido de cariofileno. Esse composto teve as propriedades antinociceptiva e analgésica descritas para roedores (CHAVAN; WAKTE; SHINDE, 2010), e mais recentemente, Benovit (2012) verificou seu efeito sedativo em jundiás em concentrações que variaram de 10 a 40 mg L⁻¹. No entanto, também foi observada perda de muco (efeito adverso) nos animais após a imersão em solução de 40 mg L⁻¹ desse composto. O óxido de cariofileno, mesmo sendo um artefato formado em consequência do processo de extração do OE, é uma substância aprovada pelo FDA (Food and Drug Administration) como conservante de alimentos e cosméticos (FDA, 1973), assim como foi incluído, pelo Conselho Europeu, na lista das substâncias flavorizantes naturais e sintéticas, sendo bem tolerado, seguro e não tóxico em concentrações usuais (YANG et al., 2000).

A secreção de muco verificada para o OE avaliado no bioensaio de anestesia, no entanto, não é um fator determinante na escolha de novas substâncias anestésicas, visto que os atuais anestésicos sintéticos usados na aquicultura, como o 2-fenoxietanol, sulfato de quinaldina e a benzocaína também promovem efeitos adversos dessa esfera ou mais fortes como irritabilidade dos olhos (INOUE; NETO; MORAES, 2003; VELISEK et al., 2007).

As pesquisas relacionadas com a utilização dos OE como pesticidas, que abrangem os inseticidas, herbicidas e fungicidas, estão sendo desenvolvidas e representam uma alternativa natural aos atuais pesticidas sintéticos disponíveis no mercado. De fato, é comprovado que os inseticidas químicos sintéticos, conhecidos como agrotóxicos, dentre eles os organofosforados, organoclorados e carbamatos, possuem propriedades cancerígenas, além de serem bioacumulativos na cadeia alimentar, permanecendo por longo período no meio ambiente (FLORES et al., 2004; MENEZES, 2005; ALVES et al., 2010).

Os pesticidas derivados de OE possuem muitas vantagens sobre os sintéticos, uma vez que devido às suas características físicas, são rapidamente

volatilizados, são biodegradáveis, possuem de baixa à moderada toxicidade e alta seletividade, existindo, desse modo, um menor risco ao ambiente e à saúde humana (MENEZES, 2005; ISMAN; MACHIAL, 2006). Os produtos naturais representam, desse modo, uma alternativa para a proteção das culturas agrícolas/animais, uma vez que é crescente a demanda por produtos alimentícios saudáveis e isentos de resíduos de pesticidas (ISMANN, 2000; MENEZES, 2005).

As larvas da ordem Odonata, em sua forma jovem, são consideradas como um dos principais predadores de larvas de peixes e outros invertebrados. Deste modo, esses organismos podem ser uma fonte significativa de perda econômica em piscicultura e um entrave nos programas de repovoamento de peixes, dificultando a obtenção de juvenis (LOUARN; CLOAREC, 1997; SOARES; HAYASHI; REIDEL, 2003).

Muitas investigações confirmam que algumas espécies de plantas contêm OE ou compostos ativos que agem como inseticidas, larvicidas, repelentes e como inibidores da alimentação de insetos (ISMANN, 2000; CAVALCANTI et al., 2004; ISMANN; MACHIAL, 2006; NERIO; OLIVERO-VERBEL; STASHENKO, 2010). Mesmo que o OE de *N. grandiflora* não tenha apresentado intensa atividade contra as larvas de Odonata, pesquisas futuras para avaliar sua atividade larvicida frente a outras espécies de insetos podem fornecer resultados promissores. Isso se deve ao fato de que recentes estudos mostraram que OE de representantes da família Lauraceae são potenciais larvicidas para o controle de *Aedes aegypti*, *Spodoptera litura*, *Trichoplusia ni* e *Choristoneura rosaceana* (GONZALÉZ-COLOMA et al., 1994; LEITE et al., 2009; MACHIAL et al., 2010). Com relação ao efeito larvicida sobre larvas da ordem Odonata, apenas um relato foi encontrado na literatura até o momento, em que Tomazelli Júnior et al. (2011), verificaram o efeito positivo do extrato alcoólico de cinamomo (*Melia azedarach* L.) no controle dessa praga.

Foi observado que alguns pontos são essenciais para a aplicabilidade dos OE seja qual for seu uso. Estudos envolvendo as quantidades totais necessárias de material vegetal para a obtenção dos produtos, sua padronização e refinamento, além da avaliação da variabilidade química dos OE. Neste último ponto, recomenda-se analisar as práticas silviculturais, o local de plantio e a época de coleta mais adequadas, para que sejam obtidos produtos com equilibrada e constante qualidade e desempenho. No entanto, a regulamentação das substâncias por parte dos países se torna uma barreira para a utilização dos produtos naturais, uma vez que devem

ser aprovadas pelos órgãos de controle e registro de cada país, além da exclusividade de mercado que algumas empresas propõem como forma de recuperar os custos investidos, como a proteção através de patentes.

7 CONCLUSÕES

- O rendimento do óleo essencial das folhas de *Nectandra grandiflora* apresentou variabilidade sazonal, sendo significativamente maior na estação da primavera, quando a espécie se encontra em seu período reprodutivo;
- A composição química dos óleos essenciais das folhas, inflorescências e da casca de *N. grandiflora* apresentam como componente majoritário a deidrofuquinona, mas em proporções diferentes;
- A presença da deidrofuquinona foi pela primeira vez descrita para uma espécie da família Lauraceae;
- A composição química dos óleos essenciais das folhas e inflorescências de *O. acutifolia* é semelhante, e tem como componente majoritário o óxido de cariofileno;
- A composição química do óleo essencial de *N. grandiflora* não apresentou variabilidade sazonal durante o período em estudo, sendo que os sesquiterpenóides predominaram e o composto deidrofuquinona foi o majoritário;
- O óleo essencial das folhas de *O. acutifolia* demonstrou ser alternativa para os anestésicos sintéticos de utilização atual em piscicultura;
- O óleo essencial das folhas de *N. grandiflora* não foi eficiente no controle de larvas de Odonata na concentração avaliada.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, F. M.; ISHII, I. H. Lauraceae no município de Corumbá, Mato Grosso do Sul, Brasil. **Rodriguésia**, v. 58, n. 1, p. 179-192, 2007.

ALVES, F. M.; SARTORI A. L. B. *Nectandra* Rol. ex Rottb. (Lauraceae) no Mato Grosso do Sul, Brasil. **Acta Botânica Brasilica**, v. 23, n. 1, p. 118-129, 2009.

ALVES, M. I. R. et al. Avaliação da contaminação por pesticidas organoclorados em recursos hídricos do Estado de Goiás. **Revista Brasileira de Recursos Hídricos**, v. 15, n. 1, p. 67-74, 2010.

APEL, M. A. et al. Screening of the biological activity from essential oils of native species from Atlantic rain forest (São Paulo - Brazil). **Pharmacologyonline**, v. 3, p. 376-383, 2006.

AZIZI, M.; BETTI, G.; SCHMIDT, M. Study of the phytochemical variability of the essential oil of *Hypericum perforatum* in relation to vegetative stage. In: ANNUAL CONGRESS OF THE SOCIETY FOR MEDICINAL PLANT RESEARCH, 53. 2005, Florence. **Anais...** Florence, Italy: 2005.

BACKES, P.; IRGANG, B. **Árvores do Sul: Guia de Identificação & Interesse Ecológico**. 2^a ed. Porto Alegre, RS: Paisagens do Sul, 2009.

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

BAITELLO, J. B. et al. Lauraceae. In: WANDERLEY, M. G. L.; SHEPHERD, G. J.; GIULIETTI, A. M.; MELHEM T. S. (Eds.). **Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo**. São Paulo: Ed. Rima, v.3. São Paulo, FAPESP-Rima, p. 149-223, 2003.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils – A Review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446-475, 2008.

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

BALLABENI, V. et al. *Ocotea quixos* Lam. essential oil: In vitro and in vivo investigation on its anti-inflammatory properties. **Fitoterapia**, v. 81, p. 289-295, 2010.

BARBOSA-FILHO, J. M. et al. GC-MS Analysis and cardiovascular activity of the essential oil of *Ocotea duckei*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 1, p. 37-41, 2008.

BARNECHE, S. et al. Prospección química y microbiológica del bosque de galería del río Uruguay. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 6, p. 878-885, 2010.

BARROS, F. M. C. et al. Variabilidade sazonal e biossíntese de terpenóides presentes no óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 861-867, 2009.

BARTON, B. A. Stress in fishes: A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. **Integrative and Comparative Biology**, v. 42, p. 517-525, 2002.

BATISH, D. R. et al. *Eucalyptus* essential oil as a natural pesticide. **Forest Ecology and Management**, v. 256, p. 2166-2174, 2008.

BEIRITH, A. et al. Study of the antinociceptive action of the ethanolic extract and the triterpene 24-hydroxytormentonic acid isolated from the stem bark of *Ocotea suaveolens*. **Planta Medica**, v. 65, p. 50-55, 1999.

BENOVIT, S. C. **Composição e atividade sedativa e anestésica do óleo essencial de *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook.) Troncoso (Verbenaceae) em jundiás (*Rhamdia quelen*)**. 2012. 90 f. (Mestrado em Farmacologia). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2012.

BENOVIT, S. C. et al. Anesthesia and transport of brazilian flounder, *Paralichthys orbignyanus*, with essential oils of *Aloysia gratissima* and *Ocimum gratissimum*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 43, n. 6, p. 896-900, 2012.

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

BOLZAN, A. A. **Constituintes de *Senecio platensis* Arech. Isolamento, elucidação estrutural e avaliação antibacteriana.** 2007. 164 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria. 2007.

BÖHLKE, M. et al. Costaricine, a new antiplasmodial bisbenzylisoquinoline alkaloid from *Nectandra salicifolia* trunk bark. **Journal of Natural Products**, v. 59, n. 6, p. 576-580, 1996.

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

BRESSLER, K.; RON, B. Effect of anesthetics on stress and the innate immune system of gilthead seabream (*Sparus aurata*). **The Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgeh**, v. 56, p. 5-13, 2004.

BRUNETON, J. **Farmacognosia Fitoquímica Plantas medicinales.** 2ª ed. Zaragoza: Editora Acribia, 2001.

BRUNI, R. et al. Chemical composition and biological activities of Ishpingo essential oil, a traditional Ecuadorian spice from *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. (Lauraceae) flower calices. **Food Chemistry**, v. 85, p. 415-421, 2004.

CAMPBELL, J. Y.; TEWARI, D. D. Increased development of non-timber forest products in India: some issues and concerns. **Unasyuva**, v. 47, n. 187, p. 26-31, 1996.

CARVALHO, A. L. Recomendações para coleta, criação e colecionamento de larvas de Odonata. **Arquivos do Museu Nacional**, v. 65, p. 3-15, 2007.

CASTRO, R. D.; LIMA, E. O. Atividade antifúngica dos óleos essenciais sassafrás (*Ocotea odorifera* Vell.) e alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) sobre o gênero *Candida*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 13, n. 2, p. 203-208, 2011.

CAVALCANTI, E. S. B. et al. Larvicidal activity of essential oils from Brazilian plants against *Aedes aegypti* L. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, p.541–544, 2004.

CHAVAN, M. J.; WAKTE, P. S.; SHINDE, D. B. Analgesic and anti-inflammatory activity of caryophyllene oxide from *Annona squamosa* L. bark. **Phytomedicine**, v. 17, p. 149-151, 2010.

CICCIÓ, J. F. CHAVERRI, C.; DÍAZ, C. Volatile compounds of *Nectandra salicina* (Lauraceae) from Costa Rica and their cytotoxic activity on cell lines. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 417-420, 2009.

COOKE, S. J. et al. Behavioral and physiological assessment of low concentrations of clove oil anaesthetic for handling and transporting largemouth bass (*Micropterus salmoides*). **Aquaculture**, v. 239, p. 509–529, 2004.

COSTA, J. M.; SOUZA L. O.; OLDRINI, B. B. Chave para famílias e gêneros das larvas de Odonata citadas para o Brasil: comentários e registros bibliográficos. **Publicações Avulsas do Museu Nacional**, v. 99, p. 1–44, 2004.

COYLE, S. D.; DURBOROW, R. M.; TIDWELI, J. H. Anesthetics in aquaculture. **Southern Regional Aquaculture Center**, v. 3900, p. 1-6, 2004.

CUNHA, M. A. et al. Essential oil of *Lippia alba*: a new anesthetic for silver catfish, *Rhamdia quelen*. **Aquaculture**, v. 306, p. 403-406, 2010a.

CUNHA, M. A. et al. Anesthesia of silver catfish with eugenol: time of induction, cortisol response and sensory analysis of fillet. **Ciência Rural**, v. 40, p.2107-2114, 2010b.

CUNICO, M. M. et al. Estudo preliminar antimicrobiano e fitoquímico do óleo essencial foliar da *Nectandra grandiflora* Nees (canela-amarela). In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON EDUCATION FOR SUSTAINABLE DEVELOPMENT, 2010, Curitiba. **Anais...** Curitiba, Brasil: UFPR, 2010.

DIAS, C. S. et al. Análise por CG-EM e atividade moluscicida do óleo essencial das folhas de *Ocotea gadneri* (Meins.) Mez (Lauraceae). In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 29. 2006, Águas de Lindóia. **Anais...** Águas de Lindóia, SP: 2006.

DUDAREVA, N.; PICHERSKY, E.; GERSHENZON, J. Biochemistry of plant volatiles. **Plant Physiology**, v. 135, n. 1893-1902, 2004.

FAÇANHA, M. F.; GOMES, L. C. Efficacy of menthol as an anesthetic for tambaqui (*Colossoma macropomum*, Characiformes: Characidae). **Acta Amazonica**, v. 35, p. 71-75, 2005.

FAO, 2008. **Non-Wood Forest Products**. Disponível em: <<http://www.fao.org/forestry/nwfp/6388/en/>> Acesso em: 25/05/2011.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 5ª ed. São Paulo: Atheneu, 2010.

FDA - FOOD and DRUG ADMINISTRATION (FDA). Food and drugs, food additives, synthetic flavoring substances and adjuvants. **Fed Regist**, v. 95, n. 38, p. 12913-12914, 1973.

FIGUEIREDO, A. C. et al. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 23, p. 213-226, 2008.

FLORES, A. C. et al. Organoclorados: um problema de saúde pública. **Ambiente & Sociedade**, v. 7, n. 2, p. 1-15, 2004.

FOURNET, A. et al. Phytochemical and antiprphotozoal activity of *Ocotea lancifolia*. **Fitoterapia**, v. 78, p. 382-384, 2007.

FONTENELLE, R. O. S. et al. Chemical composition, toxicological aspects and antifungal activity of essential oil of *Lippia sidoides* Cham. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, p. 934-940, 2007.

FUNASKI, M. **Estruturas, atividade biológica e biossíntese de metabólitos secundários de *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae)**. 2006. 147 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

GANG, D. R. Evolution of Flavors and Scents. **Annual Reviews of Plant Biology**, v. 56, p. 301-25, 2005.

GARCEZ, F. R. et al. Cytotoxic aporphine alkaloids from *Ocotea acutifolia*. **Planta Medica**, v. 77, p. 383-387, 2011.

GARRETT, R. et al. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Ocotea notata* guiada pelo ensaio de toxicidade sobre *Artemia saligna* Leach. **Boletín**

Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, v. 6, p. 344-345, 2007.

GIORGETTI, M.; NEGRI, G.; RODRIGUES, E. Brazilian plants with possible action on the central nervous system: A study of historical sources from the 16th to 19th century. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, p. 338-347, 2007.

GLINWOOD, R.; NINKOVIK, V.; PETTERSSON, J. Chemical interaction between undamaged plants – Effects on herbivores and natural enemies. **Phytochemistry**, v. 72, p. 1683-1689, 2011.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Quím. Nova**, v. 30, p. 374-381, 2007.

GONZÁLEZ-COLOMA, A. et al. Insecticidal activity screening of Japanese Lauraceae. **Applied Entomology and Zoology**, v. 29, n. 2, p. 289-292, 1994.

GOTTLIEB, O. R. Chemosystematics of the Lauraceae. **Phytochemistry**, v.13, p.1537-1570, 1972.

GUERRINI, A. et al. Composition of the volatile fraction of *Ocotea bofo* Kunth. (Lauraceae) Calyces by GC-MS and NMR fingerprinting and its antimicrobial and antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 7778-7788, 2006.

GUPTA, S. K. et al. Morphogenetic variation for artemisinin and volatile oil in *Artemisia annua*. **Industrial Crops and Products**, v. 16, p. 217-224, 2002.

HAJEK, G. J. The anaesthetic-like effect of tea tree oil in common carp *Cyprinus carpio* L. **Aquaculture Research**, v. 42, p. 296-300, 2011.

INOUE, L. A. K. A.; NETO, C. S.; MORAES, G. Clove oil as anesthetic for juveniles of matrinxã *Brycon cephalus* (Gunther, 1969). **Ciência Rural**, v. 33, p. 943-947, 2003.

ISMANN, M. B. Plant essential oils for pest and disease management. **Crop Protection**, v. 19, p. 603–608, 2000.

ISMANN, M. B.; MACHIAL, C. M. Pesticides based on plant essential oils: from traditional practice to commercialization. **Naturally Occuring Bioactive Compounds**, v.3, p. 29–44, 2006.

JANSE, G.; OTTITSCH, A. Factors influencing the role of non-timber forest products and services. **Forest Policy and Economics**, v. 7, p. 309-319, 2005.

KLEIN, R. M. Importância e fidelidade das lauráceas na “formação de araucária” do estado de Santa Catarina”. In: CONGRESSO DE BOTÂNICA BRASÍLIA, 17. 1966, Itajaí. **Anais...** Itajaí, SC, UFSC, 1966.

LE QUESNE, P. W.; LARRAHONDO, J. E. ; RAFFAUF, R. F. Antitumor plants x Constituents of *Nectandra rigida*. **Journal of Natural Products**, v. 43, n. 3, p. 353-359, 1980.

LEITE, A. M. et al. Preliminary study of the molluscicidal and larvicidal properties of some essential oils and phytochemicals from medicinal plants. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, p. 842–846, 2009.

LIMA, H. R. P.; KAPLAN, M. A. C.; CRUZ, A. V. M. Influência dos fatores abióticos na produção e variabilidade de terpenóides em plantas. **Floresta e Ambiente**, v. 10, n. 2. P. 71-77, 2003.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 4ª ed. Nova Odessa, SP: Editora Plantarum, 2002.

LOUARN, H. L.; CLOAREC, A. Insect predation on pike fry. **Journal of Fish Biology**, v. 50, p. 366–370, 1997.

LUCAS-BARBOSA, D.; VAN LOON, J. J. A.; DICKE, M. The effects of herbivore-induced plant volatiles on interactions between plants and flower-visiting insects. **Phytochemistry**, v. 72, p. 1647-1654, 2011.

MACHIAL, C. M. et al Evaluation of the toxicity of 17 essential oils against *Choristoneura rosaceana* (Lepidoptera: Tortricidae) and *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae). **Pest Management Science**, v. 66, p. 1116-1121, 2010.

MARQUES, C. A. Importância da família Lauraceae Lindl. **Floresta e Ambiente**, v. 8, n. 1, p. 195-206, 2001.

MARCHIORI, J. N. C. **Dendrologia das angiospermas**: das magnoliáceas às flacurtiáceas. Santa Maria, RS: Ed. UFSM, 1997.

MELO, J. O. et al. Anti-inflammatory activity of crude extract and fractions of *Nectandra falcifolia* leaves. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, n. 11, p. 2241-2245, 2006.

MENEZES, E. L. A. Inseticidas botânicos: Seus princípios ativos, modo de ação e uso agrícola. **Embrapa Agrobiologia**, v. 205, 58 p., 2005.

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

MORAIS, L. C. S. L.; BARBOSA-FILHO, J. M.; ALMEIDA, R. N. Central depressant effects of reticuline extracted from *Ocotea duckei* in rats and mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 62, p. 57–61, 1998.

MORENO, P. R. H. et al. Chemical constituents and antitumor activity of *Nectandra grandiflora*. **International Journal of Pharmacognosy**, v.31, p.189-192, 1993.

MOSSI, A. J. et al. Insecticidal and reppelency activity of essential oil of *Eucalyptus* sp., against *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera, Curculionidae). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, p. 273-277, 2011.

NERIO, L. S. OLIVERO-VERBEL, J.; STASHENKO, E. Repellent activity of essential oils: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 372–378, 2010.

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

PINHEIRO, A. L. **Produção de óleos essenciais**. Viçosa-MG: CPT, 2003, 140 p.

PINTO JUNIOR, A. R. et al. Bioatividade de óleos essenciais de sassafrás e eucalipto em cascudinho. **Ciência Rural**, v. 40, n. 3, p. 637-643, 2007.

PIZATTO, W. **Avaliação biométrica da estrutura e da dinâmica de uma Floresta Ombrófila Mista em São João do Triunfo – PR: 1995 a 1998**. 1999. 172 f.

Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1999.

POWER, D. M.; FUENTES, J.; HARRISON, A. P. A noninvasive monitoring device for anesthetics in fish. **Open Access Animal Physiology**, v. 2, p. 17-23, 2010.

QUINET, A.; ANDREATA, R. H. P. Lauraceae Jussieu na Reserva Ecológica de Macaé de Cima, Município de Nova Friburgo, Rio de Janeiro, Brasil. **Rodriguésia**, v. 53, n. 82, p. 59-121, 2002.

QUINET, A.; BAITELLO, J. B. ; MORAES, P. L. R. 2010. **Lauraceae**. In: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB008428>>. Acesso em: 25/04/2011.

QUINET, A.; BAITELLO, J. B. ; MORAES, P. L. R. 2011. **Lauraceae**. In: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2011/FB030205>>. Acesso em: 25/04/2011.

QUINET, A. et al. 2012. **Lauraceae**. In: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB008440>>. Acesso em: 24/01/2013.

RAGGI, L. **Estudo da composição química e das atividades biológicas dos óleos voláteis de espécies de Lauraceae, em diferentes épocas do ano**. 2008. 67 f. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) - Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo, 2008.

RIBEIRO, A. B. et al. A new neolignan and antioxidant phenols from *Nectandra grandiflora*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.16, n. 3, p. 526-530, 2005.

RIBEIRO, V. L. S. et al. Acaricidal properties of the essential oil *Hesperozygis ringens* (Lamiaceae) on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 2506-2509, 2010.

SÁ, F. A. S. et al. Essential oils in aerial parts of *Myrcia tomentosa*: composition and variability. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, n. 6, p. 1233-1240, 2012.

SANGWAN, N. S. et al. Regulation of essential oil production in plants. **Plant Growth Regulation**, v. 34, p. 3-21, 2001.

SANTOS, A. J. et al. Produtos não madeireiros: Comercialização, classificação, valoração e mercados. **Revista Floresta**, v. 33, n. 2, p. 215-224, 2003.

SANTOS, G. K. N. et al. Essential oils from *Alpinia purpurata* (Zingiberaceae): Chemical composition, oviposition deterrence, larvicidal and antibacterial activity. **Industrial Crops and Products**, v. 40, p. 254-260, 2012.

SCHIESTL, F. P.; AYASSE, M. Do changes in floral odor cause speciation in sexually deceptive orchids? **Plant Syst. Evol.**, v. 234, p. 111-119, 2002.

SCHOETTGER, R. A.; JULIN, M. Efficacy of MS-222 as an anesthetic on four salmonids. **Investigations in Fish Control**, v.13, p. 1-15, 1967.

SCHWAB, W.; DAVIDOVICH-RIKANATI, R; LEWINSOHN, E. Biosynthesis of plant-derived of flavor compounds. **The Plant Journal**, v. 54, p. 712-732, 2008.

SILVA FILHO, A. A. et al. Evaluation of analgesic and anti-inflammatory activities of *Nectandra megapotamica* (Lauraceae) in mice and rats. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 56, p. 1179-1184, 2004.

SILVA, L. L. et al. Essential oil of *Ocimum gratissimum* L.: anesthetic effects, mechanism of action and tolerance in silver catfish, *Rhamdia quelen*. **Aquaculture**, v. 350-353, p. 91-97,2012.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos essenciais. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS / Editora da UFSC, 2004. p. 467-495.

SLISH, D. F. et al. Ethnobotany in the search for vasoactive herbal medicines. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 66, p. 159-165, 1999.

SOARES, C. M.; HAYASHI, C.; REIDEL, A. Predação de pós-larvas de curimba (*Prochilodus lineatus*, Valenciennes, 1836) por larvas de Odonata (*Pantala*, Fabricius, 1798) em diferentes tamanhos. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 25, p. 95–100, 2003.

SOBRAL, M. et al. **Flora Arbórea e Arborescente do Rio Grande do Sul, Brasil**. São Carlos: RiMa: Novo Ambiente, 2006. 350 p.

SOUZA, T. J. T. **Determinação da composição química e avaliação preliminar das atividades antioxidante e anticolinesterásica dos óleos voláteis de espécies de *Eupatorium* L. (Asteraceae)**. 2007. 225 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática - Guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG III**. 3ª Ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2012.

TOMAZELLI JÚNIOR, R. et al. Efeito do extrato de *Melia azedarach* L. sobre a predação de alevinos de carpa comum (*Cyprinus carpio*) por larvas de *Neuraeschna* (Odonata: Aeshnidae). **Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology**, v. 15, n. 1, p. 19-25, 2011.

TONDOLO, J. S. M. **Atividade anestésica em robalos-peva (*Centropomus parallelus*) e caracterização química do óleo essencial das folhas de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez (Lauraceae)**. 2011. 75 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2011.

TORRES, M. R. **Compilación y análisis sobre los productos forestales no madereros (PFNM) en el Perú**. (Estudios nacionales sobre productos no madereros en América Latina – GCP/RLA /133/EC). San Tiago: FAO, 2001. 59 p.

TROPICOS.ORG. **Missouri Botanical Garden: *Nectandra grandiflora***. Disponível em: <<http://www.tropicos.org/Name/17801065?tab=synonyms>>. Acesso em: 08/06/2012.

TULLIO, V.; et al. Antifungal activity of essential oils against filamentous fungi determined by broth microdilution and vapour contact methods. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, p. 1544-1550, 2007.

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

VAN DER WERFF, H.; RICHTER, H. G. Toward and improved classification of Lauraceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 8, n. 3, p. 419-432, 1996.

VIEIRA, R. F.; BIZZO, H. R.; DESCHAMPS, C. Genetic resources of aromatic plants from Brazil. **Israel Journal of Plant Sciences**, v. 58, p. 263-271, 2009.

VELISEK, J. T. et al. Effects of 2-phenoxyethanol anaesthesia on sheatfish (*Silurus glanis* L.). **Veterinarni Medicina**, v. 52, p. 103-110, 2007.

VERDEGUER, M.; BLÁZQUEZ, M. A.; BOIRA, H. Phytotoxic effects of *Lantana camara*, *Eucalyptus camaldulensis* and *Eriosephalus africanus* essential oils in weeds of Mediterranean summer crops. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 37, p. 362-369, 2009.

VERDOUW, H.; VAN ECHELD, C. J. A.; DEKKERS, E. M. J. Ammonia determination based on indophenol formation with sodium salicylate. **Water Research**, v. 12, p. 399-402, 1978.

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

WERKA, J. S.; BOEHME, A. K.; SETZER, W. N. Biological activities of essential oils of Monteverde, Costa Rica. **Natural Product Communications**, v. 2, n. 12, p. 1215-1219, 2007.

YAMAGUCHI, K. K. L.; ALCÂNTARA, J. M.; VEIGA JUNIOR, V. F. Investigação do potencial antioxidante e anticolinesterásico de 20 espécies da família Lauraceae. **Acta Amazonica**, v. 42, n. 4, p. 541-546, 2012.

YANG D. et al. Use of caryophyllene oxide as an antifungal agent *in vitro* experimental model of onychomycosis. **Mycopathologia**, v. 148, p. 79-82, 2000.

ZAHED, N. et al. Allelopathic effect of *Schinus molle* essential oils on wheat germination. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 32, p. 1221-1227, 2010.

ZAHL, I. H.; SAMUELSEN, O.; KIESSLING, A. Anesthesia of farmed fish: implications for welfare. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 38, p. 201-218, 2012.

ZANON, M. M. F.; GOLDENBERG, R.; MORAES, P. L. R. O gênero *Nectandra* Rol. ex Rottb. (Lauraceae) no Estado do Paraná, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 23, n. 1, p. 22-35, 2009.

ZHANG, H-F.; YANG, X-H.; WANG, Y. Microwave assisted extraction of metabolites from plants: Current status and future directions. **Trends in Food Science and Technology**, v. 22, p. 672-688, 2011.

ZHANG, Z. J. Therapeutic effects of herbal extracts and constituents in animal models of psychiatric disorders. **Life Sciences**, v. 75, p. 1659-1600, 2004.

ZSCHOCKE, S. et al. Analytical and pharmacological investigation of *Ocotea bullata* (black stinkwood) bark and leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, n. 1-2, p. 219-230, 2000a.

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

9 ANEXOS



Anesthetic activity of Brazilian native plants in silver catfish (*Rhamdia quelen*)



Journal:	<i>Neotropical Ichthyology</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	<p>Silva, Lenise; Universidade Federal de Santa Maria, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia</p> <p>Silva, Daniela; Universidade Federal de Santa Maria, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal</p> <p>Garlet, Quelen; Universidade Federal de Santa Maria, Departamento de Farmácia Industrial</p> <p>Cunha, Mauro; Universidade Federal de Santa Maria, Departamento de Fisiologia e Farmacologia</p> <p>Mallmann, Carlos; Universidade Federal de Santa Maria, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva</p> <p>Baldisserotto, Bernardo; Universidade Federal de Santa Maria, Fisiologia e Farmacologia</p> <p>Longhi, Solon; Universidade Federal de Santa Maria, Departamento de Ciências Florestais</p> <p>Pereira, Ana; Universidade de Ribeirão Preto,</p> <p>Heinzmann, Berta; Universidade Federal de Santa Maria, Departamento de Farmácia Industrial</p>
Keyword:	essential oil, <i>Hesperozygis ringens</i> , <i>Lippia sidoides</i> , <i>Ocotea acutifolia</i> , Stress

SCHOLARONE™
Manuscripts

1
2
3
4 **1 Anesthetic activity of Brazilian native plants in silver catfish (*Rhamdia quelen*)**

5
6 Lenise de Lima Silva^{1*}, Daniela Thomas da Silva^{2*}, Quelen Iane Garlet³, Mauro Alves
7
8 Cunha⁴, Carlos Augusto Mallmann⁵, Bernardo Baldisserotto⁴, Solon Jonas Longhi⁶, Ana
9
10 Maria Soares Pereira⁷, and Berta Maria Heinzmann³
11
12

13
14
15 ¹Universidade Federal de Santa Maria, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia,
16
17 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.

18
19 ²Universidade Federal de Santa Maria, Programa de Pós-Graduação em Engenharia
20
21 Florestal, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.

22
23 ³Universidade Federal de Santa Maria, Departamento de Farmácia Industrial, 97105-
24
25 900, Santa Maria, RS, Brazil.

26
27 ⁴Universidade Federal de Santa Maria, Departamento de Fisiologia e Farmacologia,
28
29 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.

30
31 ⁵Universidade Federal de Santa Maria, Departamento de Medicina Veterinária
32
33 Preventiva, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.

34
35 ⁶Universidade Federal de Santa Maria, Departamento de Ciências Florestais, 97105-
36
37 900, Santa Maria, RS, Brazil.

38
39 ⁷Universidade de Ribeirão Preto, 14100-000, Ribeirão Preto, SP, Brazil

40
41
42
43
44 * These two authors contributed equally to this work.
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

ABSTRACT

There is an increasing demand for inexpensive and safe anesthetics that can reduce fish stress caused by some procedures such as capture and handling. In this context, the present study evaluated the potential of essential oils of three Brazilian native plants (*Hesperozygis ringens*, *Lippia sidoides* and *Ocotea acutifolia*) as anesthetics for silver catfish (*Rhamdia quelen*). Moreover, an analysis was made of the chemical composition of these oils and their influence on stress parameter. Essential oils (EOs) of *H. ringens* and *O. acutifolia* were effective as anesthetics, without behavioral side effects. EO of *O. acutifolia* (150 $\mu\text{L L}^{-1}$) promoted an increase in blood glucose level. Regarding to the composition, pulegone accounts for 96.63% of the EO of *H. ringens*, and caryophyllene oxide amounts to 56.90% of the EO of *O. acutifolia*. Two chemotypes, thymol and carvacrol (68.40% and 67.89%, respectively) were verified for EOs of *L. sidoides*. Both samples of *L. sidoides* oils showed anesthetic activity in silver catfish, but exposure also caused loss of mucus and mortality. Thus, only the EOs of *H. ringens* and *O. acutifolia* are advised for anesthetic use.

RESUMO

Existe uma crescente demanda por anestésicos baratos e seguros capazes de reduzir o estresse em peixes produzido durante procedimentos como captura e manuseio. Neste contexto, o presente estudo avaliou o potencial como anestésico dos óleos essenciais de três espécies vegetais nativas (*Hesperozygis ringens*, *Lippia sidoides* and *Ocotea acutifolia*) frente a jundiás (*Rhamdia quelen*). Adicionalmente, a composição química desses óleos e suas influências sobre o estresse também foram avaliadas. Os óleos essenciais (EOs) de *H. ringens* e *O. acutifolia* foram efetivos como anestésicos sem

1
2
3
4 45 efeitos adversos detectáveis. EO de *O. acutifolia* (150 $\mu\text{L L}^{-1}$) promoveu um aumento na
5
6 46 glicemia. Em relação a sua composição, pulegona correspondeu a 96,63% do EO de *H.*
7
8 47 *ringens*, e óxido de cariofileno a 56,90% do EO de *O. acutifolia*. Dois quimiotipos,
9
10 48 timol e carvacrol (68,40% e 67,89%, respectivamente) foram verificados para os EOs de
11
12 49 *L. sidoides*. Ambas as amostras de óleo de *L. sidoides* oils apresentaram atividade
13
14 50 anestésica em jundiás, contudo exposição produziu perda de muco e mortalidade. Desta
15
16 51 forma, somente os EOs de *H. ringens* e *O. acutifolia* tem seu uso como anestésico
17
18 52 recomendável.
19
20
21
22
23

24 54 **Key words:** Essential oil; *Hesperozygis ringens*; *Lippia sidoides*; *Ocotea acutifolia*;
25
26 55 Stress.
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Introduction

It has been shown that anesthetics can be useful in fisheries and fish biology procedures to immobilize the animals during handling, thus preventing physical injury and stress (Inoue *et al.*, 2003; Bressler & Ron, 2004). Stress response corresponds to neuroendocrine and metabolic adjustments of fish attempting to overcome the challenges imposed (Barton, 2002; Mormède *et al.*, 2007), and the glucose levels correspond to a common indicator for the same changes (Greenweel *et al.*, 2003).

In this context, some studies have been conducted with plant essential oils and their isolated compounds in order to find new anesthetics that are more effective, safer and less expensive than the currently available synthetic drugs (Inoue *et al.*, 2003; Guénette *et al.*, 2007). Examples of anesthetics obtained from natural sources with action upon different fish species are eugenol (Guénette *et al.*, 2007; Cunha *et al.*, 2010a), menthol (Façanha & Gomes, 2005), and essential oils of *Eugenia caryophyllata* and *E. aromatica* (Inoue *et al.*, 2003; Bressler & Ron, 2004), *Lippia alba* (Cunha *et al.*, 2010b, 2011), *Cinnamomum cassia* (Power *et al.*, 2010), *Melaleuca alternifolia* (Hajek, 2011), and *Ocimum gratissimum* (Silva *et al.*, 2012).

Brazil is considered to have one of the world's greatest plant diversities, with over 40.000 different plant species. However, this plant diversity is not widely used and known (Oliveira *et al.*, 2012). Some of the plant species that still have not been studied belong to Lamiaceae, Lauraceae and Verbenaceae families, whose contribution for the treatment of central nervous system diseases was recognized in other studies (Brito & Brito, 1993; Gomes *et al.*, 2009). Therefore, Brazilian plants belonging to the above-

1
2
3
4 79 mentioned families, which are rich in essential oils, could be a potential source of new
5
6
7 80 anesthetics in aquaculture.

8
9 81 *Hesperozygis ringens* (Benth.) Epling, known as “espanta-pulga”, is one
10
11 82 endangered representative of the Lamiaceae family, as a result of its endemic
12
13 83 distribution in the southeast and southern regions of Rio Grande do Sul (the
14
15 84 southernmost state in Brazil). Only acaricidal activity has been reported to date for its
16
17 85 essential oil (Fracaro & Echeverrigaray, 2006; Ribeiro *et al.*, 2010). The genus *Ocotea*
18
19 86 includes more than 350 species of the Lauraceae family (Baitello, 2001), some of which
20
21 87 showed analgesic and sedative activity in animal models (Beirith *et al.*, 1999; Zschocke
22
23 88 *et al.*, 2000a; Zhang, 2004). As regards the reported activities, such uses could also be
24
25 89 found in folk medicine (Marques, 2001; Giogertti *et al.*, 2007). *Ocotea acutifolia* (Nees)
26
27 90 Mez, known as “cana-branca”, is a riparian species distributed in Uruguay and
28
29 91 southern Brazil (Sobral *et al.*, 2006). No reports were found about the essential oil of
30
31 92 this species. *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) is a shrub native from northeastern
32
33 93 Brazil, commonly called as “alecrim-pimenta”. In folk medicine, this species is used as
34
35 94 a spasmolytic, antimicrobial, and local anesthetic as well as a sedative (Brito & Brito,
36
37 95 1993).

38
39
40
41 96 The aim of this study was to evaluate the anesthetic activity in juvenile silver
42
43 97 catfish and the chemical composition of essential oils obtained from three Brazilian
44
45 98 native plants (*H. ringens*, *O. acutifolia* and *L. sidoides*) as well as to investigate the
46
47 99 effect of the anesthesia produced with such essential oils on glucose levels.
48
49

50
51 100

52
53 101

54 55 56 57 58 59 60

102

103 Animals

104 Silver catfish were purchased from a local fish culture and transported to the
105 laboratory, where they were maintained in continuously aerated 250 L tanks, with
106 controlled water parameters. Dissolved oxygen (experiment 1: 8.97 ± 0.39 mg L⁻¹;
107 experiment 2: 5.82 ± 0.08 mg L⁻¹) and temperature (experiment 1: 19.55 ± 0.69 °C;
108 experiment 2: 20.71 ± 0.09 °C) were measured with an YSI oxygen meter (Model
109 Y5512); pH (experiment 1: 7.8 ± 0.03 ; experiment 2: 7.55 ± 0.09) was determined with a
110 DMPH-2 pH meter. Total ammonia levels (experiment 1: 0.90 ± 0.04 mg L⁻¹; experiment
111 2: 1.12 ± 0.04 mg L⁻¹) were measured by the salicylate method (Verdouw *et al.*, 1978). A
112 semi-static system was used and 50% of the water volume was changed daily. Fish were
113 fed once a day with commercial feed (28% crude protein). Juveniles were fasted for a
114 period of 24 h prior to the experiments. The methodologies of the experiments were
115 approved by the Ethical and Animal Welfare Committee of the Federal University of
116 Santa Maria (Process n° 46/2010).

118 Plant Materials

119 Leaves of *H. ringens* and *O. acutifolia* were respectively collected in São
120 Francisco de Assis (Rio Grande do Sul, Brazil) in January and May 2011. The species
121 were identified by Dr. Solon Jonas Longhi and voucher specimens (SMDB n° 13.427
122 and n° 13.450, respectively) were deposited in the herbarium of the Department of
123 Biology, UFSM. Two samples of aerial parts of *L. sidoides* were collected in May 2008,
124 dried for three days in a ventilated drying oven at 45°C, and stored in closed, dark
125 packages until extraction started. Sample 1 was grown in Araxá (Minas Gerais, Brazil)
126 and Sample 2 in Jardinópolis (São Paulo, Brazil). Voucher specimens identified by

1
2
3
4 127 Fátima Salimena were deposited in the Department of Biotechnology (UNAERP), under
5
6 128 numbers 1327 (Sample 1) and 1328 (Sample 2).
7

8
9 129

10 11 130 **Essential oil extraction and analysis**

12
13 131 The essential oils (EOs) of *H. ringens*, *O. acutifolia* and *L. sidoides* were
14
15 132 extracted by hydrodistillation using a Clevenger type apparatus for 2, 3 and 3 h,
16
17 133 respectively (European Pharmacopoeia, 2007). The EOs were stored at -4°C in amber
18
19 134 glass bottles until analysis by gas chromatography coupled with mass spectrometry
20
21 135 (GC-MS) and biological tests. EO yields were calculated w/w (%). GC-MS TIC
22
23 136 analysis was conducted as described by Silva *et al.* (2012).
24
25
26
27

28
29
30
31
32

33 138 **Biological activity**

34 139 *Experiment 1: Anesthesia induction and recovery*

35 140 Juvenile fish (12.2±0.5 g; 11.0±0.1 cm) were transferred to aquaria containing 1
36
37 141 L of water continuously aerated and the EO concentrations firstly diluted in ethanol
38
39 142 95% (1:10). Concentrations of 55, 111, 277 and 554 $\mu\text{L L}^{-1}$ of the EO obtained from *H.*
40
41 143 *ringens*, and 50, 100, 150, 300, 600 and 900 $\mu\text{L L}^{-1}$ of the EO of *O. acutifolia* were used
42
43 144 in this experiment. For *L. sidoides*, two EO samples from different chemotypes were
44
45 145 tested at concentrations of 30, 70, 150, 300 and 600 $\mu\text{L L}^{-1}$. Ethanol control was also
46
47 146 performed at the same concentration used for dilution of the highest EO concentrations.
48
49 147 To evaluate the time required for anesthesia induction, 5 (EO of *H. ringens*) or 6 (EO of
50
51 148 *O. acutifolia* and *L. sidoides*) juveniles were used for each concentration tested, and
52
53 149 each juvenile was used only once, according to Schoettger & Julin (1967). This method
54
55 150 involves six stages, in which the following parameters were observed: light and deep
56
57
58
59
60

1
2
3
4 151 sedation (stages 1 and 2, respectively), partial and total loss of equilibrium (stage 3a and
5
6 152 b, respectively), deep anesthesia (stage 4) and medullar collapse (stage 5). The
7
8 153 maximum observation time was 30 min. After induction, juveniles were transferred to
9
10 154 anesthetic-free aquaria to measure recovery time. Animals were considered to be
11
12 155 recovered when they showed normal swimming behavior in response to external
13
14 156 stimuli. After recovery, the fish were grouped according to the anesthetic protocol and
15
16 157 transferred into continuously aerated 40 L aquaria, where they were observed for 48
17
18 158 hours for any signs of abnormal behavior, diseases or mortality.
19
20
21
22 159

23
24 160 *Experiment 2: Evaluation of blood glucose levels*

25
26 161 This experiment was conducted to verify stress parameter of fish exposed to EO
27
28 162 *H. ringens* (137 and 277 $\mu\text{L L}^{-1}$) and *O. acutifolia* (150 and 300 $\mu\text{L L}^{-1}$). Control groups
29
30 163 of water and ethanol were also included for each sample, as well as an unhandled basal
31
32 164 group. Silver catfish (N=6; $61.7\pm 2.7\text{g}$; $19.3\pm 0.3\text{ cm}$) were transferred to 40 L aquaria
33
34 165 three days before the experiment.
35
36

37 166 Fish were captured with a dip net and transferred in pairs to continuously aerated
38
39 167 2 L aquaria. The time between capture and release did not exceed 30 seconds. Juveniles
40
41 168 remained in the aquarium until they reached stage 4 of anesthesia induction with EO
42
43 169 while the controls of EOs of *H. ringens* and *O. acutifolia* remained for 7 and 18 min,
44
45 170 respectively. These times were chosen for the controls because they correspond to the
46
47 171 highest induction time until stage 4, for each EO used in this experiment (see results).
48
49 172 The fish in the basal control group were removed from the 40 L aquaria and
50
51 173 immediately submitted to blood collection.
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4 174 After the induction procedure, blood was collected from the caudal vein with 1
5
6 175 mL syringes and submitted to glucose determination with a digital Accu-Check®
7
8 176 Advantage II apparatus. Following blood collection, all fish were handled for biometric
9
10 177 measurements and transferred to anesthetic-free 40 L aquaria, where they were observed
11
12 178 for 48 h for any signs of abnormal behavior, diseases or mortality.
13
14
15
16
17

18 **Statistical analysis**

19
20 181 Data are presented as mean \pm SEM. The relationship between the time required
21
22 182 for anesthesia induction and the concentration of the anesthetic used was determined by
23
24 183 means of software Slide Write Plus version 4.0. To verify the homogeneity of variances
25
26 184 and normality, all data were submitted to Levene and Kolmogorov-Smirnov tests,
27
28 185 respectively. One-way ANOVA and Tukey tests were used for data of anesthesia
29
30 186 induction and recovery and also for blood glucose levels. Stage 3a of induction with EO
31
32 187 of *O. acutifolia* was analyzed by the Kruskal-Wallis test followed by the Dunn test.
33
34 188 Samples of EO of *L. sidoides* were analyzed by two-way ANOVA and the Tukey test or
35
36 189 the Scheirer-Ray-Hare extension of the Kruskal-Wallis test, when appropriate.
37
38 190 Analyses were performed with software SigmaPlot version 11.0, and the minimum
39
40 191 significance level was set at $P < 0.05$.
41
42
43
44
45

46 **Results**

47 48 49 50 51 **Chemical composition**

52
53 196 A total of 67 compounds were identified for the EOs of the three species studied,
54
55 197 accounting for 97.3-99.5% of the total compositions of the analyzed samples (Table 1).
56
57
58
59
60

1
2
3
4 198 *H. ringens* showed a high yield of EO (3.5%), whereas the yield of EO of *O. acutifolia*
5
6 199 was 0.80%. EO of *L. sidoides* obtained from sample 1 (2.22%) showed a greater yield
7
8 200 than the one from sample 2 (0.90%).
9

10
11 201 The major chemical component of leaf oil of *H. ringens* was pulegone (96.63%).
12
13 202 Other mono and sesquiterpenoid derivatives were also found in this EO, but at low
14
15 203 concentrations (<1.20%). A total of 24 substances were identified in the EO of *O.*
16
17 204 *acutifolia*. Among the major constituents, the most significant ones are caryophyllene
18
19 205 oxide (56.90%), calarene epoxide (11.74%) and τ -elemene (8.17%). The major
20
21 206 constituents of oil of *L. sidoides* (sample 1) were thymol (68.40%), *p*-cymene (8.72%)
22
23 207 and β -caryophyllene (5.90%), while the second sample had carvacrol (67.89%), *p*-
24
25 208 cymene (21.76%) and β -caryophyllene (3.90%) as major compounds.
26
27
28
29

30 31 **Biological activity**

32
33 211 All EOs tested in this study showed sedative and anesthetic effects in silver
34
35 212 catfish through bath administration. Ethanol at the highest concentration used to dilute
36
37 213 the samples did not produce any anesthetic effect when applied alone.
38

39
40 214 Fish exposed to EO of *H. ringens* reached deep anesthesia in concentrations
41
42 215 ranging from 111 (about 24 min) to 554 $\mu\text{L L}^{-1}$ (about 2 min), while 55 $\mu\text{L L}^{-1}$ induced
43
44 216 up to partial loss of equilibrium (Fig. 1A). A clear reduction in the induction time
45
46 217 occurred with the increase of EO concentration. The opposite pattern was verified at the
47
48 218 time of recovery, where an increase in the concentration of the EO of *H. ringens* was
49
50 219 followed by a correspondent elevation in the recovery time (Table 2). All juveniles
51
52 220 recovered between 5-15 min without signs of toxicity or mortality until 48 h after
53
54 221 exposure.
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4 222 Anesthesia was reached with 300-900 $\mu\text{L L}^{-1}$ EO of *O. acutifolia* (between 13-18
5
6 223 min; Fig. 1B). A positive relationship between the concentration and the time required
7
8 224 for the induction of anesthesia was observed at all stages, except for stage 4 (Table 2).
9
10 225 Lower concentrations (50-150 $\mu\text{L L}^{-1}$) did not induce anesthesia during the 30 min
11
12 226 evaluation period. Only 50% of the animals exposed to 150 $\mu\text{L L}^{-1}$ (970 ± 75.7 s) and
13
14 227 17% of the fish exposed to 300 $\mu\text{L L}^{-1}$ (1560 s) recovered during the time of
15
16 228 observation, while all juveniles returned to normal behavior in 660.7 ± 21 s after
17
18 229 exposure to 50 $\mu\text{L L}^{-1}$. For the additional concentrations tested, recovery time was
19
20 230 higher than 30 min. Mortality was not observed until 48 h after exposure.
21
22
23

24 231 There was no difference in anesthetic effect between the two samples of EO of
25
26 232 *L. sidoides* as regards induction time until stages 3b and 4. Fish exposed to sample 2
27
28 233 took longer time to reach stage 2 and 3a with 70 $\mu\text{L L}^{-1}$, and stage 3a with 150 $\mu\text{L L}^{-1}$
29
30 234 when compared to sample 1. The opposite pattern occurred with 600 $\mu\text{L L}^{-1}$, where
31
32 235 stage 2 was reached sooner for sample 2 than for sample 1 (Fig. 2).
33
34

35 236 The relationship between the induction time of anesthesia and the concentration
36
37 237 of the EO of *L. sidoides* was verified for sample 1 at stages 3a, 3b and 4 (Table 2).
38
39 238 Juveniles exposed to 150-600 $\mu\text{L L}^{-1}$ of both samples reached deep anesthesia at a
40
41 239 statistically similar time (about 11-20 min) (Fig. 2D). Additionally, deep anesthesia was
42
43 240 also verified in 33% of the fish exposed to 70 $\mu\text{L L}^{-1}$ of sample 1. Concentrations of 30
44
45 241 $\mu\text{L L}^{-1}$ of samples 1 and 2, and 70 $\mu\text{L L}^{-1}$ of sample 2, promoted only partial loss of
46
47 242 equilibrium in juveniles during the 30 min of exposition.
48
49

50 243 Fish exposed to both EOs of *L. sidoides* did not recover normal behavior until 30
51
52 244 min after transference to anesthetic-free aquaria. Exceptions to this pattern occurred in
53
54 245 all animals exposed to 30 $\mu\text{L/L}$ of both samples and 33% of the fish exposed to 70 μL
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4 246 L⁻¹ of sample 2 (1543.0±108.0 s). However, the recovery of the animals differed
5
6 247 according to EO sample tested at 30 µL L⁻¹. All animals presented normal behavior in
7
8 248 713.5±38.7 s with sample 2, whereas 50% of the fish recovered in 1048.0±36.6 s with
9
10 249 sample 1.

11
12
13 250 In the experiment to evaluate blood glucose level, deep anesthesia was obtained
14
15 251 in 399.8±24.8 s and 307.2±22.4 s with, respectively, 137 and 277 µL L⁻¹ EO of *H.*
16
17 252 *ringens*. Concentrations of 150 and 300 µL L⁻¹ EO of *O. acutifolia* were required to
18
19 253 reach the same depression level in 735.3±67 s and 825.0±220.1 s, respectively.

20
21
22 254 There was no statistical difference among the glucose levels of the basal group,
23
24 255 water and ethanol controls (22-30 mg dL⁻¹). Similar values were also detected in fish
25
26 256 anesthetized with 277 µL L⁻¹ EO of *H. ringens*. Significantly higher glucose levels were
27
28 257 observed in silver catfish exposed to 150 µL L⁻¹ EO of *O. acutifolia* compared to the
29
30 258 basal and the two control groups (Fig. 3).

259 260 Discussion

261
262 Higher pulegone content and lower extractive yield were detected in this study
263 for the EO of *H. ringens*, when compared to a previous report (Ribeiro *et al.*, 2010).
264 These differences could be due to genetic factors, and the vegetative period of the
265 plants, as well as external factors such as height, water availability, temperature, light
266 intensity and soil fertility (Lima *et al.*, 2003; Chalchat & Özcan, 2008).

267 Although there are no reports, to date, on the EO of *O. acutifolia*, the good yield
268 achieved by this species is not surprising, since it belongs to the Lauraceae family.
269 Compared with other *Ocotea* species, the composition of the EO of *O. acutifolia* differs

1
2
3
4 270 greatly. For example, none of the major constituents described for the leaf EO of *O.*
5
6 271 *brenesii* (Chaverri & Cicció, 2005) were detected in the present study. In the leaf EO of
7
8 272 10 species of *Ocotea* investigated in Costa Rica, six compounds were reported (α -
9
10 273 pinene, β -pinene, β -myrcene, β -caryophyllene, β -elemene and germacrene D) (Takatu *et*
11
12 274 *al.*, 2007) which were common to leaf EO of *O. acutifolia*. However, for the leaf EO of
13
14
15 275 *O. quixos* (Sacchetti *et al.*, 2006) five of six common constituents reported for EO of *O.*
16
17 276 *acutifolia* were found, while β -pinene was absent.

18
19
20 277 Two chemical chemotypes were described for the EOs of *L. sidoides* (Lemos *et*
21
22 278 *al.*, 1990), and they were both found in the present study. Botelho *et al.* (2007) found
23
24 279 thymol as the major compound, amounting to 56.67% of the EO, while the
25
26 280 concentration of this compound was 68.40% in sample 1. Nevertheless, Lima *et al.*
27
28 281 (2011) obtained 31.68% of carvacrol in the EO of this species, a much lower percentage
29
30 282 than the one found in the EO of sample 2 (67.89%).

31
32
33 283 The anesthetic activity for the EOs of *O. acutifolia* and *L. sidoides* verified in
34
35 284 this study was not completely unexpected. Previous reports showed analgesic and
36
37 285 sedative properties of species of the genus *Ocotea* (Beirith *et al.*, 1999; Zschocke *et al.*,
38
39 286 2000b; Zhang, 2004). Regarding to *L. sidoides*, ethnopharmacological use as sedative
40
41 287 and local anesthetic was described previously (Brito & Brito, 1993). To date, there are
42
43 288 no reports about sedative and/or anesthetic activities for the *Hesperozygis* species.
44
45 289 However, anesthetic effect of other plants of the Lamiaceae, Lauraceae and
46
47 290 Verbenaceae families were recently reported in some fish species (Cunha *et al.*, 2010b,
48
49 291 2011; Power *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2012).

50
51
52 292 According to Gilderhus & Marking (1987), the ideal anesthetic should induce
53
54 293 fast anesthesia (3 min or less) with minimum hyperactivity or stress, and rapid recovery

1
2
3
4 294 (within 10 min or less) after fish transference to anesthetic-free aquaria. These criteria
5
6 295 were met for anesthesia of silver catfish with EO of *H. ringens*, whose induction and
7
8 296 recovery occurred, respectively, between 2-6 min and 5-16 min at concentrations
9
10 297 ranging from 277 to 554 $\mu\text{L L}^{-1}$. Similar induction time until anesthesia could be
11
12 298 obtained for this fish species with 200-500 mg L^{-1} EO of *Lippia alba* and 40-50 mg L^{-1}
13
14 299 of eugenol (Cunha *et al.*, 2010a, 2010b). Thus, the EO of *H. ringens* could be an
15
16 300 alternative to the use of the anesthetics previously reported, since it showed activity
17
18 301 without side effects and high extractive yield.

21
22 302 Fish exposed to the EOs of *O. acutifolia* (300-900 $\mu\text{L L}^{-1}$) and *L. sidoides* (150-
23
24 303 600 $\mu\text{L L}^{-1}$) reached anesthesia between 10-20 min and recovered after 30 min for
25
26 304 almost all concentrations tested. These long term induction and recovery times may
27
28 305 result from the hydrophobic characteristics of the compounds of these essential oils.
29
30 306 Thymol/carvacrol and caryophyllene oxide (the major compounds of EO of *L. sidoides*
31
32 307 and *O. acutifolia*, respectively) have a higher partition coefficient (log P) than pulegone,
33
34 308 found in EO of *H. ringens* (Kang *et al.*, 2007); hence, the former compounds can be
35
36 309 considered to be more hydrophobic. Studies performed by Kiessling *et al.* (2009)
37
38 310 indicated that isoeugenol, a lipophylic compound, had slower clearance than the
39
40 311 hydrophilic drug MS-222 in Atlantic salmon (*Salmo salar*). A slow clearance may be
41
42 312 associated to drug accumulation in the adipose tissue, which in turn would increase
43
44 313 recovery time after long exposure time (Kiessling *et al.*, 2009; Zahl *et al.*, 2012).

48 314 The depressor effects of EOs of *H. ringens* and *L. sidoides* may be partially due
49
50 315 to their major compounds. Pulegone, thymol and carvacrol are positive allosteric
51
52 316 modulators of the GABA receptor (Tong & Coats, 2010), which corresponds to one of
53
54 317 the main targets of the action of sedative and anesthetics used in therapeutic (Johnston
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4 318 *et al.*, 2006). Sousa *et al.* (2011) verified that pulegone decreased locomotor activity,
5
6 319 increased sleeping time and latency of pentylenetetrazole-induced convulsions, as well
7
8
9 320 as showed a central antinociceptive action in mice.

10
11 321 Additionally, it should be noted that pulegone has a similar structure to menthol
12
13 322 (Ringer *et al.*, 2003), a recognized fish anesthetic (Façanha & Gomes, 2005).
14
15 323 Biosynthesis studies on the epidermal oil glands of peppermint (*Mentha x piperita*)
16
17 324 described pulegone as a precursor of menthol (Ringer *et al.*, 2003). However, the same
18
19 325 reaction-type was not observed in rats liver microsomes (Madyastha & Raj, 1990),
20
21 326 which indicates that the two compounds did not interconvert in vivo.

22
23
24 327 Analgesic and sedative activity of extracts of the *Ocotea* species was associated
25
26 328 with the presence of alkaloids (Zhang, 2004), triterpenes (Beirith *et al.*, 1999) and
27
28 329 sibyllenones (Zschocke *et al.*, 2000b), which are not found in the EO of *O. acutifolia*.
29
30 330 For caryophyllene oxide, the main compound of this EO, antinociceptive and analgesic
31
32 331 activity in rodents was described (Chavan *et al.*, 2010). Recently, Benovit (2012)
33
34 332 verified its sedative effect in silver catfish at concentration ranges of 10-40 mg L⁻¹. High
35
36 333 loss of mucus was observed in the animals after immersion in 40 mg L⁻¹ of this
37
38 334 compound. Nevertheless, this concentration is lower than the amount present in 100 µL
39
40 335 L⁻¹ EO of *O. acutifolia* (corresponding to 54 mg, approximately). As the side effect was
41
42 336 only verified in fish exposed to 900 µL L⁻¹, *Ocotea* oil seems to contain other
43
44 337 substances able to protect animals from the deleterious action of caryophyllene oxide.
45
46 338 Secretion of mucus is a common side effect of some synthetic anesthetics currently used
47
48 339 in aquaculture, such as 2-phenoxyethanol, quinaldine sulfate and benzocaine (Inoue *et*
49
50 340 *al.*, 2003; Velisek *et al.* 2007).
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4 341 Side effects were observed during and after induction of anesthesia with both
5
6 342 EOs of *L. sidoides*. The fish exposed to all concentrations showed sudden jumping
7
8 343 behavior towards the surface due to involuntary muscle contractions during induction.
9
10 344 These events were independent of the presence of stimuli in caudal peduncles or inside
11
12 345 the aquarium, and they were followed by a motionless period of the fish at the bottom.
13
14 346 For animals exposed to sample 2, these events were observed more frequently. High
15
16 347 loss of mucus during induction and total mortality after exposure occurred in all fish
17
18 348 exposed to 300 and 600 $\mu\text{L L}^{-1}$ of sample 1 and 600 $\mu\text{L L}^{-1}$ of sample 2.

19
20
21 349 The above-mentioned mortality and adverse effects for EOs of *L. sidoides* can
22
23 350 result from acetylcholinesterase (AChE) inhibition. Similar behavior effects as those
24
25 351 verified for this EO were described for *Cyprinus carpio* L. exposed to 2.4-D (2.4-
26
27 352 dichlorophenoxyacetic acid) herbicide, a known AChE inhibitor (Sarıkaya & Yılmaz,
28
29 353 2003). AChE inhibition was previously reported *in vitro* for methanolic and ethanolic
30
31 354 extracts of *L. sidoides*, as well as for thymol and carvacrol (Trevisan & Macedo, 2003;
32
33 355 Jukic *et al.*, 2007). Jukic *et al.* (2007) demonstrated that AChE inhibitory activity of
34
35 356 carvacrol is 10 times stronger than the one for its isomer thymol, which could possibly
36
37 357 explain the higher incidence of side effects in fish exposed to carvacrol-type EO
38
39 358 (sample 2).

40
41
42 359 As regards stress parameter, fish of control groups did not change their glucose
43
44 360 levels immediately after tank transference when compared to those in the basal group,
45
46 361 which excludes this procedure as an agent able to influence the results. Thus, the
47
48 362 hyperglycemic event detected after anesthesia with the EO of *O. acutifolia* corresponds
49
50 363 to a stressor effect of this sample, which did not occur with the EO of *H. ringens*.
51
52 364 Previous reports indicated that anesthesia with eugenol also promoted hyperglycemic
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4 365 effects in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and matrinxã (*Brycon amazonicus*)
5
6 366 (Deriggi *et al.*, 2006; Barbosa *et al.*, 2007).
7

8
9 367 In conclusion, thymol and carvacrol chemotypes of oils of *L. sidoides* showed
10
11 368 anesthetic effect (150-600 $\mu\text{L L}^{-1}$) in silver catfish, but their use is not advised because
12
13 369 of the mortality and side effects observed. Nevertheless, pulegone-rich EO of *H. ringens*
14
15 370 and caryophyllene oxide-rich EO of *O. acutifolia* can be used as anesthetics in this fish
16
17 371 species at concentration ranges of 111-554 and 300-600 $\mu\text{L L}^{-1}$, respectively. Regarding
18
19 372 to the stress parameter evaluated, EO of *O. acutifolia* was shown to be a slight stressor
20
21 373 agent, while EO of *H. ringens* showed no effect itself.
22
23

24 374

25 375 **Acknowledgements**

26 376

27
28
29
30 377 This study was supported by research funds from the Fundação de Amparo à
31
32 378 Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS/PRONEX, Document No.
33
34 379 10/0016-8) and Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico (CNPq,
35
36 380 Document No. 470964/2009-0). B. Baldisserotto, C. A. Mallmann, A. M. S. P. and S. J.
37
38 381 Longhi are grateful to CNPq for research fellowships; L.L. Silva, D.T. Silva, M. A.
39
40 382 Cunha are grateful to Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
41
42 383 (CAPES) for their postgraduate fellowships. Q.I. Garlet is grateful to FIT/UFSM for her
43
44 384 undergraduate scholarship.
45
46
47

48 385

49 386 **Literature Cited**

50 387
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3
4 388 Adams, R. P. 2001. Identification of essential oil components by gas
5
6 389 chromatography/quadrupole mass spectroscopy. Illinois, Allured Publishing
7
8 390 Corporation.
- 10 391 Baitello, J. B. 2001. New Lauraceae species for the Brazilian flora. *Acta Botanica*
11
12 392 *Brasilica*, 15: 445-450.
- 15 393 Barbosa, L. G., G. Moraes & L. A. K. A. Inoue. 2007. Metabolic responses of matrinxã
16
17 394 to eugenol in anesthetic baths. *Acta Scientiarum Biological Sciences*, 29: 255-260.
- 20 395 Barton, B. A. 2002. Stress in Fishes: A diversity of responses with particular reference
21
22 396 to changes in circulating corticosteroids. *Integrative and Comparative Biology*, 42:
23
24 397 517-525.
- 26 398 Beirith, A., A. R. S. Santos, J. B. Calixto, S. C. Hess, I. Messana, F. Ferrari & R. A.
27
28 399 Yunes. 1999. Study of the antinociceptive action of the ethanolic extract and the
29
30 400 triterpene 24-hydroxytormentic acid isolated from the stem bark of *Ocotea*
31
32 401 *suaveolens*. *Planta Medica*, 65: 50-55.
- 35 402 Benovit, S. C. 2012. Composição e atividade sedativa e anestésica do óleo essencial de
36
37 403 *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook.) Troncoso (Verbenaceae) em jundiás
38
39 404 (*Rhamdia quelen*). Unpublished Dissertation, Universidade Federal de Santa
40
41 405 Maria, Santa Maria.
- 44 406 Botelho, M. A., N. A. P. Nogueira, G. M. Bastos, S. G. C. Fonseca, T. L. G. Lemos, F.
45
46 407 J. A. Matos, D. Montenegro, J. Heukelbach, V. S. Rao & G. A. C. Brito. 2007.
47
48 408 Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and
49
50 409 thymol against oral pathogens. *Brazilian Journal of Medical and Biological*
51
52 410 *Research*, 40: 349-356.

- 1
2
3
4 411 Bressler, K. & B. Ron. 2004. Effect of anesthetics on stress and the innate immune
5
6 412 system of gilthead seabream (*Sparus aurata*). The Israeli Journal of Aquaculture –
7
8 413 Bamidgeh, 56: 5-13.
9
10 414 Brito, A. R. M. & A. A. S. Brito. 1993. Forty years of Brazilian medicinal plant
11
12 415 research. Journal of Ethnopharmacology, 39: 53-67.
13
14 416 Chalchat, J. C. & M. M. Özcan. 2008. Comparative essential oil composition of flowers,
15
16 417 leaves and steam of basil (*Ocimum basilicum* L.) used as herb. Food Chemistry,
17
18 418 110: 501-503.
19
20 419 Chavan, M. J., P. S. Wakte & D. B. Shinde. 2010. Analgesic and anti-inflammatory
21
22 420 activity of Caryophyllene oxide from *Annona squamosa* L. bark. Phytomedicine,
23
24 421 17: 149-151.
25
26 422 Chaverri, C. & J. F. Cicció. 2005. Essential oils of trees of the genus *Ocotea*
27
28 423 (Lauraceae) in Costa Rica. I. *Ocotea brenesii*. Revista de Biología Tropical, 53:
29
30 424 431-436.
31
32 425 Cunha, M. A., F. M. C. Barros, L. O. Garcia, A. P. L. Veeck, B. M. Heinzmann, V. L.
33
34 426 Loro, T. Emanuelli & B. Baldisserotto. 2010b. Essential oil of *Lippia alba*: a new
35
36 427 anesthetic for silver catfish, *Rhamdia quelen*. Aquaculture, 306: 403- 406.
37
38 428 Cunha, M. A., C. C. Zeppenfeld, L. O. Garcia, V. L. Loro, M. B. Fonseca, T.
39
40 429 Emanuelli, A. P. L. Veeck, C. E. Copatti & B. Baldisserotto. 2010a. Anesthesia of
41
42 430 silver catfish with eugenol: time of induction, cortisol response and sensory
43
44 431 analysis of fillet. Ciência Rural, 40: 2107-2114.
45
46 432 Cunha, M. A., B. F. Silva, F. A. C. Delunardo, S. C. Benovit, L. C. Gomes, B. M.
47
48 433 Heinzmann & B. Baldisserotto. 2011. Anesthetic induction and recovery of
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3
4 434 *Hippocampus reidi* exposed to the essential oil of *Lippia alba*. Neotropical
5
6 435 Ichthyology, 9: 683-688.
7
8
9 436 Deriggi, F. G., L. A. K. A. Inoue & G. Moraes. 2006. Stress responses to handling in
10
11 437 Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* Linnaeus): assessment of eugenol as an
12
13 438 alternative anesthetic. Acta Scientiarum Biological Sciences, 28: 269-274.
14
15 439 European Pharmacopoeia. 2007. 6th ed. Strassbourg, European Directorate for the
16
17 440 Quality of Medicines.
18
19 441 Façanha, M. F. & L. C. Gomes. 2005. Efficacy of menthol as an anesthetic for tambaqui
20
21 442 (*Colossoma macropomum*, Characiformes: Characidae). Acta Amazonica, 35: 71-
22
23 443 75.
24
25
26 444 Fracaro, F. & S. Echeverrigary. 2006. Genetic variability in *Hesperozygis ringens*
27
28 445 Benth. (Lamiaceae), an endangered aromatic and medicinal plant of Southern
29
30 446 Brazil. Biochemical Genetics, 44: 479-490.
31
32
33 447 Gerwick, L., N. E. Demers & C. J. Bayne. 1999. Modulation of stress hormones in
34
35 448 rainbow trout by means of anesthesia, sensory deprivation and receptor blockade.
36
37 449 Comparative Physiology and Biochemistry A, 124: 329-334.
38
39 450 Gomes, N. G. M., M. G. Campos, J. M. C. Órfão & C. A. F. Ribeiro. 2009. Plants with
40
41 451 neurobiological activity as potential targets for drug discovery. Progress in Neuro-
42
43 452 Psychopharmacology and Biological Psychiatry, 33: 1372-1389.
44
45
46 453 Gilderhus, P. A. & L. L. Marking. 1987. Comparative efficacy of 16 anesthetic
47
48 454 chemicals on rainbow trout. North American Journal of Fisheries Management, 7:
49
50 455 288-292.
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3
4 456 Giorgetti, M., G. Negri & E. Rodrigues. 2007. Brazilian plants with possible action on
5
6 457 the central nervous system: A study of historical sources from the 16th to 19th
7
8 458 century. *Journal of Ethnopharmacology*, 109: 338-347.
9
10 459 Greenwell, M. G., J. Sherrill & L. A. Clayton. 2003. Osmoregulation in fish
11
12 460 mechanisms and clinical implications. *Veterinary Clinics of North America:*
13
14 461 *Exotic Animal Practice*, 6: 169-189.
15
16
17 462 Guénette, S. A., F. C. Uhland, P. Hélie, F. Beaudry & P. Vachon. 2007.
18
19 463 Pharmacokinetics of eugenol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).
20
21 464 *Aquaculture*, 266: 262-265.
22
23
24 465 Hajek, G. J. 2011. The anaesthetic-like effect of tea tree oil in common carp *Cyprinus*
25
26 466 *carpio* L. *Aquaculture Research*, 42: 296-300.
27
28 467 Inoue, L. A. K. A., C. S. Neto & G. Moraes. 2003. Clove oil as anesthetic for juveniles
29
30 468 of matrinxã *Brycon cephalus* (Gunther, 1969). *Ciência Rural*, 33: 943-947.
31
32
33 469 Johnston, G. A., J. R. Hanrahan, M. Chebib, R. K. Duke & K. N. Mewett. 2006.
34
35 470 Modulation of ionotropic GABA receptors by natural products of plant origin.
36
37 471 *Advances in Pharmacology*, 54: 285-316.
38
39 472 Jukic, M., O. Politeo, M. Maksimovic, M. Milos & M. Milos. 2007. *In Vitro*
40
41 473 acetylcholinesterase inhibitory properties of thymol, carvacrol and their
42
43 474 derivatives thymoquinone and thymohydroquinone. *Phytotherapy Research*, 21:
44
45 475 259-261.
46
47
48 476 Kang, L., C. W. Yap, P. F. C. Lim, Y. Z. Chen, P. C. Ho, Y. W. Chan, G. P. Wong & S.
49
50 477 Y. Chan. 2007. Formulation development of transdermal dosage forms:
51
52 478 Quantitative structure-activity relationship model for predicting activities of
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3
4 479 terpenes that enhance drug penetration through human skin. *Journal of Controlled*
5
6 480 *Release*, 120: 211-219.
7
8
9 481 Kiessling, A., D. Johansson, I. H. Zahl & O. B. Samuelsen. 2009. Pharmacokinetics,
10
11 482 plasma cortisol and effectiveness of benzocaine, MS-222 and isoeugenol
12
13 483 measured in individual dorsal aorta-cannulated Atlantic salmon (*Salmo salar*)
14
15 484 following bath administration. *Aquaculture*, 286: 301-308.
16
17 485 Lemos, T. L. G., F. J. A. Matos, J. W. Alencar & A. A. Craveiro. 1990. Antimicrobial
18
19 486 activity of essential oils of Brazilian plants. *Phytotherapy Research*, 4: 82-84.
20
21 487 Lima, H. R. P., M. A. C. Kaplan & A. V. M. Cruz. 2003. Influence of abiotic factors on
22
23 488 terpenoids production and variability in the plant. *Floresta e Ambiente*, 10: 71-77.
24
25 489 Lima, R. K., M. G. Cardoso, J. C. Moraes, S. M. Carvalho, V. G. Rodrigues & L. G. L.
26
27 490 Guimarães. 2011. Chemical composition and fumigant effect of essential oil of
28
29 491 *Lippia sidoides* Cham, and monoterpenes against *Tenebrio molitor* (L.)
30
31 492 (Coleoptera: Tenebrionidae). *Ciência e Agrotecnologia*, 35: 664-671.
32
33 493 Madyastha, K. M. & C. P. Raj. 1990. Biotransformations of R (+)-pulegone and
34
35 494 nenthofuran *in vitro*: chemical basis for toxicity. *Biochemical and Biophysical*
36
37 495 *Research Communications*, 173: 1086-1092.
38
39 496 Marques, C. A. 2001. Economic importance of family Lauraceae Lindl. *Floresta e*
40
41 497 *Ambiente*, 8: 195-206.
42
43 498 Mormède, P., S. Andanson, B. Aupérin, B. Beerda, D. Guémené, J. Malmkvist, X.
44
45 499 Manteca, G. Manteuffel, P. Prunet, C. G. van Reenen, S. Richard & I. Veissier.
46
47 500 2007. Exploration of the hypothalamic–pituitary–adrenal function as a tool to
48
49 501 evaluate animal welfare. *Physiology and Behavior*, 92: 317-339.
50
51 502 NIST/ EPA/ NIH mass spectral library and search/ analysis programs. 2002. J. Wiley
52
53 503 and Sons, Hoboken, NJ.
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3
4 504 Oliveira, V. B., L. T. Yamada, C. W. Fagg & M. G. L. Brandão. 2012. Native foods
5
6 505 from Brazilian biodiversity as source of bioactive compounds. Food Research
7
8 506 International, 48: 170-179.
- 9
10
11 507 Pankhurst, N. W. 2011. The endocrinology of stress in fish: An environmental
12
13 508 perspective. General and Comparative Endocrinology, 170: 265-275.
- 14
15 509 Power, D. M., J. Fuentes & A. P. Harrison. 2010. A noninvasive monitoring device for
16
17 510 anesthetics in fish. Open Access Animal Physiology, 2: 17-23.
- 18
19
20 511 Ribeiro, V. L. S., J. C. Santos, S. A. L. Bordignon, M. A. Apel, A. T. Henriques & G.
21
22 512 Von Poser. 2010. Acaricidal properties of the essential oil *Hesperozygis ringens*
23
24 513 (Lamiaceae) on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Bioresource
25
26 514 Technology, 101: 2506-2509.
- 27
28
29 515 Ringer, K. L., M. E. McConkey, E. M. Davis, G. W. Rushing & R. Croteau. 2003.
30
31 516 Monoterpene double-bond reductases of the (-)-menthol biosynthetic pathway:
32
33 517 isolation and characterization of cDNAs encoding (-)-isopiperitenone reductase
34
35 518 and (+)-pulegone reductase of peppermint. Archives of Biochemistry and
36
37 519 Biophysics, 418: 80-92.
- 38
39
40 520 Sacchetti, G., A. Guerrini, P. Noriega, A. Bianchi & R. Bruni. 2006. Essential oil of
41
42 521 wild *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. (Lauraceae) leaves from Amazonia Ecuador.
43
44 522 Flavour and Fragrance Journal, 21: 674-676.
- 45
46
47 523 Sarikaya, R. & M. Yilmaz. 2003. Investigation of acute toxicity and the effect of 2,4-D
48
49 524 (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) herbicide on the behavior of the common carp
50
51 525 (*Cyprinus carpio* L., 1758; Pisces, Cyprinidae). Chemosphere, 52: 195-201.
- 52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3
4 526 Schoettger, R. A. & M. Julin. 1967. Efficacy of MS-222 as an anesthetic on four
5
6 527 salmonids. Investigations in Fish Control, United States Department of the
7
8 528 Interior, 13: 1-15.
9
10 529 Silva, L. L., T. V. Parodi, P. Rekcziegel, V. O. Garcia, M. E. Bürger, B. Baldisserotto,
11
12 530 C. A. Mallmann, A. M. S. Pereira & B. M. Heinzmann. 2012. Essential oil of
13
14 531 *Ocimum gratissimum* L.: anesthetic effects, mechanism of action and tolerance in
15
16 532 silver catfish, *Rhamdia quelen*. Aquaculture, 350-353: 91-97.
17
18 533 Sobral, M., J. A. Jarenkow, P. Brack, J. Lorocca & R. S. Rodrigues. 2006. Flora
19
20 534 Arbórea e Arborescente do Rio Grande do Sul, Brasil. São Carlos, RiMa.
21
22 535 Sousa, D. P., F. F. F. Nóbrega, M. R. V. Lima & R. N. Almeida. 2011. Pharmacological
23
24 536 activity of (R)-(+)-Pulegone, a chemical constituent of essential oils. Zeitschrift
25
26 537 für Naturforschung C, 66: 353-359.
27
28 538 Takatu, S., W. A. Haber & W. N. Setzer. 2007. Leaf essential oil composition of 10
29
30 539 species of *Ocotea* (Lauraceae) from Monteverde, Costa Rica. Biochemical
31
32 540 Systematics and Ecology, 35: 525-532.
33
34 541 Tong, F. & J. R. Coats. 2010. Effects of monoterpenoid insecticides on [3H]-TBOB
35
36 542 binding in house fly GABA receptor and $^{36}\text{Cl}^-$ uptake in American cockroach
37
38 543 ventral nerve cord. Pesticide Biochemistry and Physiology, 98: 317-324.
39
40 544 Trevisan, M. T. S. & F. V. V. Macedo. 2003. Screening for acetylcholinesterase
41
42 545 inhibitors from plants to treat Alzheimer's disease. Química Nova, 26: 301-304.
43
44 546 Velisek, J., T. Wlasow, P. Gomulka, Z. Svobodova & L. Novotny. 2007. Effects of 2-
45
46 547 phenoxyethanol anaesthesia on sheatfish (*Silurus glanis* L.). Veterinarni Medicina,
47
48 548 52: 103-110.
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3
4 549 Verdouw, H., C. J. A. Van Echteld & E. M. J. Dekkers. 1978. Ammonia determination
5
6 550 based on indophenol formation with sodium salicylate. *Water Research*, 12: 399-
7
8 551 402.
9
10
11 552 Zahl, I. H., A. Kiessling, O. B. Samuelsen & R. E. Olsen. 2010. Anesthesia induces
12
13 553 stress in Atlantic salmon (*Salmo salar*), Atlantic cod (*Gadus morhua*) and Atlantic
14
15 554 halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 36: 719-
16
17 555 730.
18
19
20 556 Zahl, I. H., O. Samuelsen & A. Kiessling. 2012. Anesthesia of farmed fish: implications
21
22 557 for welfare. *Fish Physiology and Biochemistry*, 38: 201-218.
23
24 558 Zhang, Z. J., 2004. Therapeutic effects of herbal extracts and constituents in animal
25
26 559 models of psychiatric disorders. *Life Sciences*, 75: 1659-1600.
27
28
29 560 Zschocke, S., S. E. Drewes, K. Paulus, R. Bauer & J. van Staden. 2000a. Analytical and
30
31 561 pharmacological investigation of *Ocotea bullata* (black stinkwood) bark and
32
33 562 leaves. *Journal of Ethnopharmacology*, 71: 219-230.
34
35
36 563 Zschocke, S., J. van Staden, K. Paulus, R. Bauer, M. M. Horn, O. Q. Munro, N. J.
37
38 564 Brown & S. E. Drewes. 2000b. Stereostructure and anti-inflammatory activity of
39
40 565 three diastereomers of ocobullenone from *Ocotea bullata*. *Phytochemistry*, 54:
41
42 566 591-595.
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Figure(s) legend(s)

567

568

569 **Fig. 1.** Induction time and recovery of essential oils in silver catfish juveniles:

570 A=*Hesperozygis ringens*; B=*Ocotea acutifolia*. Stages of induction were observed

571 according to Schoettger & Julin (1967). Maximum observation time for induction and

572 recovery was 30 min.

573 Data are presented as mean±SEM (N=5-6). Different letters indicate significant

574 differences among concentrations for the same induction stage (P<0.05). Recovery time

575 was omitted of Fig. 1B because it was higher than 30 min for most fish tested (see

576 results).

577

578 **Fig. 2.** Anesthetic effect of essential oils obtained from *Lippia sidoides* in silver catfish

579 juveniles: A=Stage 2; B=Stage 3a; C=Stage 3b; D=Stage 4, according to Schoettger &

580 Julin (1967). Maximum observation time for induction was 30 min.

581 Data are presented as mean±SEM (N=6). Different letters indicate significant

582 differences among concentrations within each sample and * describes significant

583 differences among samples (P<0.05).

584

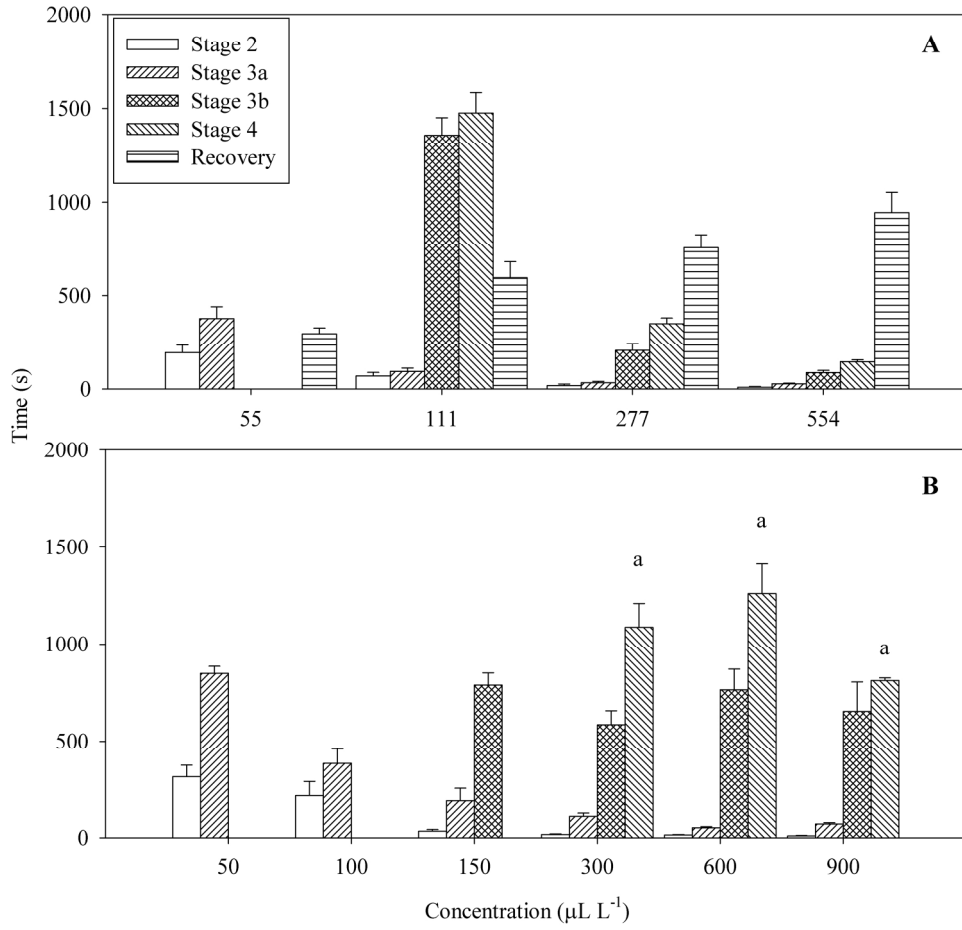
585 **Fig. 3.** Blood glucose levels after anesthesia of silver catfish with essential oils:

586 A=essential oil of *Hesperozygis ringens*; B=essential oil of *Ocotea acutifolia*; W=water

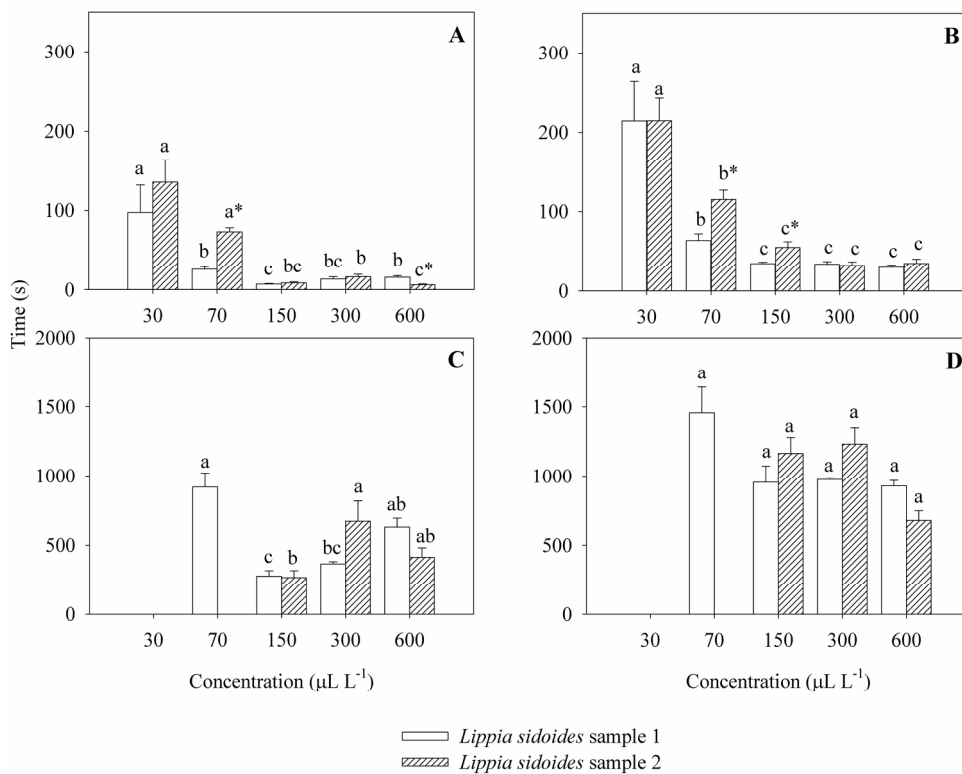
587 control; EC=ethanol control.

588 Data are presented as mean±SEM (N=6). Different letters indicate significant

589 differences among groups (P<0.05).



209x231mm (300 x 300 DPI)

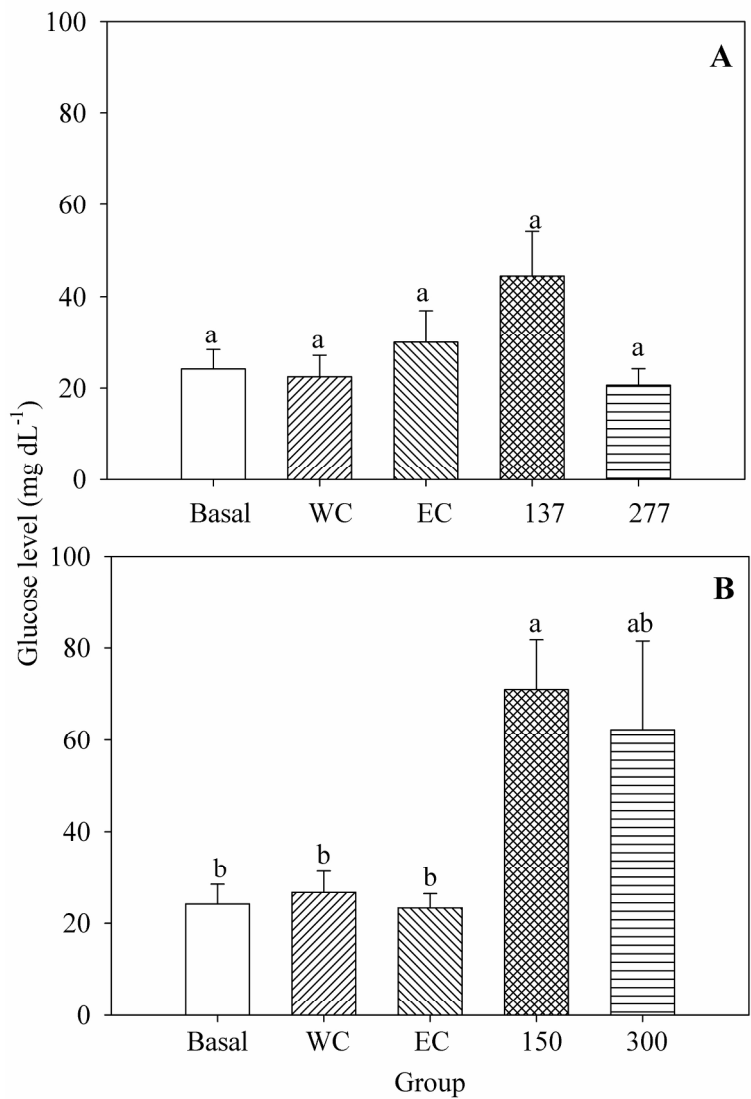


199x189mm (300 x 300 DPI)



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



181x276mm (300 x 300 DPI)

Table 1. Chemical compositions and physical characteristics of the essential oils obtained from *Hesperozygis ringens*, *Ocotea acutifolia* and *Lippia sidoides*.

RI (experimental)	RI (literature) _a	Compound	Percentage of chemical composition			
			<i>H.ringens</i>	<i>O.acutifolia</i>	<i>L.sidoides</i>	
					Sample 1	Sample 2
925	924	α -Thujene	-	0.07	0.23	0.07
930	933	α -Pinene	0.50	0.32	0.52	0.19
944	946	Camphene	-	-	tr	tr
966	-	Unknown	-	-	-	tr
970	968	Sabinene	0.18	0.11	0.09	tr
972	970	β -Pinene	0.36	0.19	0.24	tr
980	980	1-Octen-3-ol	-	-	0.13	0.05
990	991	β -Myrcene	0.33	0.05	0.41	0.13
1006	1008	3-Carene	-	-	0.06	tr
1013	1014	α -Terpinene	-	-	0.12	0.05
1023	1024	p-Cymene	-	-	8.72	21.76
1025	1022	Limonene	1.16	0.04	0.51	0.14
1028	1025	Eucalyptol	-	-	1.46	0.28
1029	-	Unknown	0.28	-	-	-
1038	1037	β -Z-Ocimene	0.20	0.58	0.10	-
1048	1048	β -E-Ocimene	-	4.02	-	-
1054	1056	τ -Terpinene	-	-	-	tr
1084	1088	2,4-Dimethylstyrene	-	-	-	tr
1099	1100	Linalool	0.92	0.55	tr	-
1103	-	Unknown	-	-	tr	-
1147	1147	Ipsdienol	-	-	0.37	0.90
1176	1179	Terpinen-4-ol	-	-	0.58	0.27
1189	1189	α -Terpineol	0.32	-	0.40	-
1210	-	Unknown	0.21	-	-	-
1234	1236	Methyl thymol ether	-	-	0.91	0.30
1242	1245	Methyl carvacrol ether	-	-	-	0.10
1243	1239	Pulegone	96.63	-	-	-
1299	1296	Thymol	-	-	68.40	0.32
1303	1304	Carvacrol	-	-	0.48	67.89
1336	1038	δ -Elemene	-	0.11	-	-
1349	1348	α -Cubebene	-	-	0.07	-
1357	1356	Eugenol	-	-	0.07	0.24
1373	1375	α -Ylangene	-	-	-	0.10
1375	1375	α -Copaene	-	-	0.45	-
1384	1384	β -Boubonene	-	-	0.08	tr
1391	1391	β -Elemene	-	0.16	-	-
1403	1400	Methyl eugenol ether	-	-	-	0.05
1406	1393	2,3-Epoxygeranylacetate	0.88	-	-	-
1418	1419	β -Caryophyllene	0.38	0.67	5.90	3.90
1425	-	Unknown	-	-	-	0.05
1427	1427	β -Gurgujene	-	-	0.24	-
1432	1436	α -Bergamotene	-	-	-	tr
1437	1440	α -Guaiene	-	0.60	-	-
1438	1437	Aromadendrene	-	-	0.80	0.12
1442	-	Unknown	-	-	0.22	0.05
1453	1454	α -Humulene	-	0.19	0.34	0.12

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

	1460	1462	(-)- Alloaromadendrene	-	-	0.31	0.06
	1473	1470	α -Amorphene	-	-	-	0.12
	1476	1478	τ -Muurolene	-	-	0.71	-
	1480	1480	Germacrene-D	-	0.52	0.58	0.23
	1483	-	Unknown	-	-	0.25	0.33
	1491	-	Unknown	-	-	-	0.15
	1494	1495	Valencene	-	-	0.78	-
	1497	1492	τ -Elemene	-	8.17	-	-
	1498	1506	β -Bisabolene	0.29	-	-	0.05
	1499	1499	α -Muurolene	-	-	0.20	tr
	1509	-	Unknown	-	-	-	0.08
	1513	1514	γ -Cadinene	-	-	0.53	-
	1519	1512	α -Amorphene	-	-	-	0.20
	1523	1523	δ -Cadinene	-	-	1.45	-
	1539	-	Unknown	-	0.55	-	-
	1551	1549	Caryophyllene oxide	-	56.90	-	-
	1579	1577	Spathulenol	-	-	0.76	0.13
	1584	1583	Caryophyllene oxide	-	-	2.55	1.68
	1585	1583	Globulol	-	1.73	-	-
	1607	1608	Humulene epoxide II	-	-	-	tr
	1631	-	Unknown	-	-	-	tr
	1634	1641	Caryophylla-4(14), 8(15)-dien-5- α / β -ol	-	-	-	0.06
	1639	1642	τ -Muurolol	-	-	-	tr
	1653	1657	α -Cadinol	-	-	-	0.05
	1656	1657	Cedr-8-en-13-ol	-	2.69	-	-
	1656	-	Unknown	-	-	-	0.05
	1668	1668	Bulnesol	-	2.06	-	-
	1669	-	Unknown	-	-	-	0.08
	1673	1673	Cadalene	-	-	-	tr
	1681	1681	Z-Farnesol	-	1.29	-	-
	1718	*	Calarene epoxide	-	11.74	-	-
	1722	-	Unknown	-	0.58	-	-
	1778	-	Unknown	-	0.49	-	-
	1784	*	Z-Santalol	-	1.91	-	-
	1794	1795	α -Eudesmol acetate	-	0.99	-	-
	1813	-	Unknown	-	0.97	-	-
	1879	-	Unknown	-	0.12	-	-
	1925	-	Unknown	-	-	-	tr
	2041	2043	Kaurene	-	1.70	-	-
	Total identified			98.3	97.3	99.5	99.2
	Physical characteristics						
			Color	Pale yellow	Light yellow	Golden yellow	Golden yellow
			Density (g mL ⁻¹)	0.90	0.95	0.92	0.91

*Retention index did not report; RI: Retention index; tr: Trace (<0.05%); ^a Adams

(2001), NIST (2002).

Table 2. Relationship between the time required to reach the stages of induction and recovery from anesthesia and the concentration of the essential oils (EOs) of *Hesperozygis ringens*, *Ocotea acutifolia* and *Lippia sidoides* in silver catfish.

EO	Induction				Recovery
	Stage 2	Stage 3a	Stage 3b	Stage 4	
<i>H. ringens</i>	$y^{0.5}=2.0661.8/x$ ($r^2 = 0.998$)	$\ln y=2.9+163.6/x$ ($r^2=0.997$)	$y=2576.6-12.6x+0.01469x^2$ ($r^2=1$)	$y=2642.6-12.0x+0.01360x^2$ ($r^2=1$)	$y=-183.4+10.6x-0.03673x^2+0.00004x^3$ ($r^2=1$)
<i>O. acutifolia</i>	$\ln y=1.1+34.4/x^{0.5}$ ($r^2=0.908$)	$\ln y=3.2+25.6/x^{0.5}$ ($r^2=0.970$)	$y=1401.5-5.8x+0.013x^2-0.0000079x^3$ ($r^2=1$)		
<i>L. sidoides</i> (sample 1)		$y=29.5+166482.3/x^2$ ($r^2=0.999$)	$y=2090.7-21.5x+0.07346x^2-0.000069x^3$ ($r^2=1$)	$y^2=908163.4+3.05 \cdot 10^{36} \exp^{-x}$ ($r^2=0.996$)	

Where x =concentration of essential oil ($\mu\text{L L}^{-1}$); y =time to reach the stage of induction or recovery from anesthesia (Schoettger & Julin, 1967) in seconds (s).