

Área: Sustentabilidade | Tema: Produção Sustentável

**ÓLEO ESSENCIAL DE *Nectandra grandiflora* Nees & Mart. ex Nees NO CONTROLE DE FUNGO
APODRECEDOR DA MADEIRA**

***Nectandra grandiflora* Nees & Mart. ex Nees ESSENTIAL OIL IN THE CONTROL OF A WOOD ROT
FUNGI**

Alana Silveira Pavlack, Nadia Helena Bianchini, Bruno Silva De Oliveira, Carlos Garrido Pinheiro, Marlove

Fatima Briao Muniz e Berta Maria Heinzmann

RESUMO

O presente estudo visa avaliar o potencial antifúngico do óleo essencial (OE) obtido de folhas de *Nectandra grandiflora* Nees & Mart. ex Nees frente ao fungo apodrecedor da madeira *Gloeophyllum trabeum*. O OE foi obtido por hidrodestilação e sua caracterização química foi realizada por cromatografia gasosa. A atividade antifúngica foi avaliada segundo a técnica do crescimento radial. O meio BDA (batata-dextrose-água) foi suplementado com OE, previamente diluído em etanol, nas concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 µL mL⁻¹. Um controle negativo (etanol a 1,0 µL mL⁻¹) e controle positivo (Propiconazole® a 1,0 µL mL⁻¹) também foram considerados. O OE apresentou um rendimento de extração de 0,5330 ± 0,056% e densidade de 0,8941 ± 0,016 g mL⁻¹. Os constituintes majoritários do OE foram os sesquiterpenoides deidrofuquinona (20,52%), biciclogermacreno (11,80%), epóxido de deidrofuquinona (8,06%), valenceno (6,44%) e o diterpenoide kaureno (4,93%). A concentração de 2,0 µL mL⁻¹ do OE inibiu 78,2226 ± 0,5828% do crescimento micelial, apresentando o melhor resultado. Sendo assim, o potencial do uso do OE de *N. grandiflora* para o controle do fungo *G. trabeum* pode ser evidenciado.

Palavras-Chave: : Atividade antifúngica; Podridão-parda; Preservante da madeira; Extrativo; Lauraceae.

ABSTRACT

The present study aims to evaluate the antifungal potential of essential oil (EO) obtained from leaves of *Nectandra grandiflora* Nees & Mart. ex Nees against the rot fungi *Gloeophyllum trabeum*. EO was obtained by hydrodistillation and its chemical characterization was carried out by gas chromatography. The antifungal activity was performed by the radial growth technique. The PDA medium (potato-dextrose-agar) was supplemented with EO previously diluted in ethanol at 0.5, 1.0 and 2.0 µL·mL⁻¹. A negative control (ethanol at 1.0 µL mL⁻¹) and positive control (propiconazole at 1.0 µL mL⁻¹) were also considered. EO showed an extraction yield of 0.5330 ± 0.056% and density of 0.8941 ± 0.016 g mL⁻¹. The OE major components were the sesquiterpenoids (+)-dehydrofukinone (20.52%), bicyclogermacrene (11.80%), dehydrofukinone epoxide (8.06%), valencene (6.44%) and the diterpenoid kaurene (4.93%). *N. grandiflora* EO at 2.0 µL mL⁻¹ inhibited 78.2226 ± 0.5828% of mycelial growth, showing the best result. Therefore, the potential use of *N. grandiflora* EO for the *G. trabeum* control could be evidenced.

Keywords: Antifungal activity; Brown rot; Wood Preservative; Extractive; Lauraceae.

Sustentabilidade – produção sustentável

ÓLEO ESSENCIAL DE *Nectandra grandiflora* Nees & Mart. ex Nees NO CONTROLE DE FUNGO APODRECEDOR DA MADEIRA

RESUMO

O presente estudo visa avaliar o potencial antifúngico do óleo essencial (OE) obtido de folhas de *Nectandra grandiflora* Nees & Mart. ex Nees frente ao fungo apodrecedor da madeira *Gloeophyllum trabeum*. O OE foi obtido por hidrodestilação e sua caracterização química foi realizada por cromatografia gasosa. A atividade antifúngica foi avaliada segundo a técnica do crescimento radial. O meio BDA (batata-dextrose-ágar) foi suplementado com OE, previamente diluído em etanol, nas concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 $\mu\text{L mL}^{-1}$. Um controle negativo (etanol a 1,0 $\mu\text{L mL}^{-1}$) e controle positivo (Propiconazole® a 1,0 $\mu\text{L mL}^{-1}$) também foram considerados. O OE apresentou um rendimento de extração de $0,5330 \pm 0,056\%$ e densidade de $0,8941 \pm 0,016 \text{ g mL}^{-1}$. Os constituintes majoritários do OE foram os sesquiterpenoides deidrofuquinona (20,52%), biciclogermacreno (11,80%), epóxido de deidrofuquinona (8,06%), valenceno (6,44%) e o diterpenoide kaureno (4,93%). A concentração de 2,0 $\mu\text{L mL}^{-1}$ do OE inibiu $78,2226 \pm 0,5828\%$ do crescimento micelial, apresentando o melhor resultado. Sendo assim, o potencial do uso do OE de *N. grandiflora* para o controle do fungo *G. trabeum* pode ser evidenciado.

Palavras-chave: Atividade antifúngica; Podridão-parda; Preservante da madeira; Extrativo; Lauraceae.

Nectandra grandiflora Nees & Mart. ex Nees ESSENTIAL OIL IN THE CONTROL OF A WOOD ROT FUNGI

ABSTRACT

The present study aims to evaluate the antifungal potential of essential oil (EO) obtained from leaves of *Nectandra grandiflora* Nees & Mart. ex Nees against the rot fungi *Gloeophyllum trabeum*. EO was obtained by hydrodistillation and its chemical characterization was carried out by gas chromatography. The antifungal activity was performed by the radial growth technique. The PDA medium (potato-dextrose-agar) was supplemented with EO previously diluted in ethanol at 0.5, 1.0 and 2.0 $\mu\text{L mL}^{-1}$. A negative control (ethanol at 1.0 $\mu\text{L mL}^{-1}$) and positive control (propiconazole at 1.0 $\mu\text{L mL}^{-1}$) were also considered. EO showed an extraction yield of $0.5330 \pm 0.056\%$ and density of $0.8941 \pm 0.016 \text{ g mL}^{-1}$. The OE major components were the sesquiterpenoids (+)-dehydrofukinone (20.52%), bicyclogermacrene (11.80%), dehydrofukinone epoxide (8.06%), valencene (6.44%) and the diterpenoid kaurene (4.93%). *N. grandiflora* EO at 2.0 $\mu\text{L mL}^{-1}$ inhibited $78.2226 \pm 0.5828\%$ of mycelial growth, showing the best result. Therefore, the potential use of *N. grandiflora* EO for the *G. trabeum* control could be evidenced.

Keywords: Antifungal activity; Brown rot; Wood Preservative; Extractive; Lauraceae.

INTRODUÇÃO

A busca por constituintes derivados de plantas objetivando a substituição de produtos sintéticos tem estimulado as pesquisas na área de Produtos Florestais Não-Madeireiros, devido aos impactos que produtos químicos sintéticos, tais como os preservantes da madeira, causam à saúde humana, animal e ao meio ambiente (ZULAUF, 2000). A madeira é considerada um material versátil, sendo utilizada há muito tempo pelo homem para diversos fins (GESUALDO, 2013). Sua importância se dá após seu processamento, industrialização, e beneficiamento, resultando na geração de diferentes produtos.

Um dos fatores que diminui o uso da madeira é o inadequado tratamento preventivo contra a infestação por microrganismos deterioradores, destacando-se os fungos apodrecedores. A madeira atacada por fungos sofre alterações na sua composição, redução da resistência mecânica, modificação da coloração natural, perda de massa, aumento da inflamabilidade, maior propensão ao ataque de insetos, entre outros, comprometendo sua qualidade e tornando inviável seu emprego para fins industriais. Entre os principais causadores de danos à produção de madeira serrada encontram-se os organismos xilófagos (SANTOS, 1992; COSTA, 1999).

Os fungos deterioradores da classe dos basidiomicetos agem alterando os constituintes estruturais da madeira e causando a podridão-parda e branca (BLANCHETTE et al., 2000). Os fungos de podridão-branca agem na superfície da parede celular, degradando a celulose, a hemicelulose e a lignina (SILVA, 2014), fornecendo à madeira uma aparência esbranquiçada, facilmente rompível no sentido das fibras (BAHIA, 2015). Já os fungos de podridão-parda agem na superfície da parede celular, degradando principalmente a celulose e a hemicelulose, alterando a coloração da madeira para pardo-escuro, facilmente rompível em cubos no sentido transversal das fibras (AGUIAR, 2011).

Diversos preservantes da madeira são utilizados atualmente para o controle de fungos apodrecedores. Entretanto, apesar de serem eficazes para combater o ataque de agentes xilófagos, estes produtos sintéticos possuem em sua formulação metais pesados, o que levou à sua proibição em alguns países nos últimos anos (REINPRECHT, 2010) devido aos danos causados à saúde humana, além de problemas ecológicos ao longo da vida-útil da madeira tratada, principalmente durante a eliminação de seus resíduos (YOON; CHA; KIM, 2013; PANEK et al., 2014).

Os produtos químicos utilizados atualmente no tratamento preservante de madeira podem ser classificados em oleossolúveis e hidrossolúveis (MORESCHI, 2013). Dentre estes, recebem destaque o creosoto, o pentaclorofenol, o CCA (arseniato de cobre cromatado) e o ACA (arseniato de cobre amoniacal). Um dos mais efetivos fungicidas que tem sido largamente usado no controle químico dos fungos deterioradores da madeira é o pentaclorofenato de sódio. Porém, existe a pressão dos órgãos ambientais e do mercado, que questionam seu uso intensivo devido aos efeitos adversos aos trabalhadores e ao meio ambiente (MAGALHÃES, 2005).

Em meio a alternativas que substituam os produtos químicos, se destacam os óleos essenciais (OEs), que são misturas de compostos aromáticos e voláteis, extraídos de raízes, caules, folhas, flores ou de todas as partes de plantas aromáticas (TRANCOSO, 2013). Já foram descritos na literatura estudos relatando o potencial dos OEs em função de suas diversas bioatividades, atuando como antifúngicos, fungistáticos, antibacterianos e antioxidantes (KNAAK, 2010).

Dentre as espécies produtoras de óleo essencial (OE), destaca-se *Nectandra grandiflora* Nees & Mart. ex Nees. (Lauraceae), conhecida popularmente como canela-amarela, caneleira ou nectandra-sebo (CARVALHO, 2010). Na medicina popular esta espécie é utilizada como antirreumática, diurética e digestiva (RAGGI, 2008). Adicionalmente, Ribeiro et al. (2005) relataram que suas cascas apresentaram atividade antitumoral contra o sarcoma 180 e carcinoma Ehrlich.

Considerando a elevada toxicidade dos preservantes da madeira de uso convencional, ressalta-se a importância da busca por substâncias naturais para substituir estes produtos sintéticos. Com base no exposto, conduziu-se este estudo com o objetivo de avaliar o potencial antifúngico do OE obtido de folhas de *N. grandiflora* frente ao fungo causador de podridão-parda *Gloeophyllum trabeum*.

MATERIAIS E MÉTODOS

- Obtenção do OE e análise de sua composição química

O material vegetal foi coletado nos meses de janeiro e novembro de 2016, na área rural de Fontana Freda, Jaguari- RS. No Laboratório de Extrativos Vegetais (LABEVE) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), folhas frescas de *N. grandiflora* foram fracionadas submetidas à hidrodestilação por 3 horas, com o auxílio de um aparelho Clevenger modificado (BRASIL, 2010), em triplicata. Em seguida, calculou-se o rendimento de extração e a densidade do extrativo. O OE foi armazenado à -4 °C até a realização da análise química e dos ensaios biológicos.

A análise da composição química foi realizada por cromatografia gasosa, em um cromatógrafo AGILENT 7890A acoplado à espectrômetro de massas 5975C em coluna capilar de sílica fundida HP5-MS (Hewlett Packard 5% de fenil, 95% de metilsiloxano, 30 m x 0,25 mm, espessura de filme: 0,25 mm), com hélio como gás carreador, (1 mL min⁻¹). A divisão de fluxo foi de 1: 100 e a temperatura do injetor e do detector foi de 250 °C. A identificação dos constituintes deu-se pela comparação dos índices de retenção, determinados por uma curva de calibração de uma série de n-alcanos injetados sob as mesmas condições das amostras, e dos padrões de fragmentação de massas com a literatura (ADAMS, 2009; NIST, 2010;).

A quantificação dos constituintes do OE foi realizada através de cromatografia gasosa com detecção por ionização em chama (CG/DIC), em equipamento AGILENT 7890A. Os parâmetros para as análises foram semelhantes aos mencionados anteriormente, excetuando-se a injeção com divisão de fluxo de 1:50 e a temperatura do injetor e detector de 300 °C. Com a normalização das áreas dos picos, determinou-se a percentagem dos componentes químicos.

- Verificação da atividade antifúngica

Os testes da atividade antifúngica foram realizados no Laboratório de Fitopatologia, do Departamento de Defesa Fitossanitária da UFSM. As cepas do fungo de podridão-parda *G. trabeum* foram cedidas pelo Laboratório de Produtos Florestais, do Serviço Florestal Brasileiro. Os inóculos foram cultivados em meio BDA (batata-dextrose-ágar) por 15 dias em câmara BOD, com temperatura de 25 ± 3 °C e fotoperíodo ajustado para 12 h /12 h (claro/escuro).

Em uma câmara de fluxo laminar, alíquotas do OE de *N. grandiflora* foram incorporadas ao meio de cultura autoclavado, nas concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 µL mL⁻¹, previamente diluídas em etanol. Para o controle negativo, foram utilizadas placas contendo apenas BDA e etanol (1,0 µL mL⁻¹), enquanto que o controle positivo foi composto por BDA suplementado com Propiconazole® (1,0 µL mL⁻¹). Já para a testemunha, utilizou-se placas contendo apenas o meio de cultura. Após a incorporação do OE ao meio, verteu-se o mesmo em placas de Petri (9,0 cm de diâmetro). Em seguida, discos de 12 mm contendo micélio foram adicionados ao centro das placas, que foram vedadas e incubadas em câmara BOD com temperatura controlada conforme anteriormente descrito. O experimento foi realizado com três repetições, de duas unidades experimentais cada.

Após 24 horas, iniciou-se a avaliação do experimento, através de medições diametralmente opostas, realizadas a cada dois dias, até que as colônias fúngicas dos tratamentos controle cobrissem toda a placa. O índice de crescimento micelial (ICM), foi calculado pela fórmula adaptada por Oliveira (1992), onde $ICM = [(C_1/N_1) + (C_2/N_2) + \dots +$

(C_n/N_n)], sendo C_1 , C_2 , C_n = crescimento micelial do fungo na primeira, segunda e última avaliação; N_1 , N_2 , N_n = número de dias após a inoculação. A porcentagem de inibição do crescimento micelial foi calculada pela fórmula: $\text{Inibição (\%)} = [(C_T - C_t * 100) / C_T]$, onde C_T e C_t correspondem ao crescimento micelial na testemunha e no tratamento, respectivamente (BADAWY; ABDELGALEIL, 2014).

- Análise estatística

Os dados foram submetidos à homogeneidade de variâncias e a testes de normalidade. Uma vez que os dados não se ajustaram aos pressupostos, o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis foi escolhido. Todos os dados são relatados como média $\pm$ desvio padrão. A análise foi realizada utilizando os softwares Assistat 7.7 Beta e GraphPad Prism, considerando-se $P < 0,05$.

RESULTADOS

- Rendimento, densidade e composição química do OE

O OE apresentou um rendimento de extração de $0,5330 \pm 0,056\%$ e densidade de $0,8941 \pm 0,016 \text{ g mL}^{-1}$. A análise da composição química possibilitou a identificação de 28 componentes, perfazendo 86,60% do total. Os constituintes majoritários foram os sesquiterpenoides dehidrofuquinona (20,52%), biciclogermacreno (11,80%), epóxido de dehidrofuquinona (8,06%), valenceno (6,44%) e o diterpenoide kaureno (4,93%).

- Atividade antifúngica

Em relação à porcentagem de inibição do crescimento micelial, os tratamentos com o OE não diferiram do controle positivo (Figura 1). Nos tratamentos utilizando $0,5 \mu\text{L mL}^{-1}$, a inibição foi de $52,9171 \pm 0,8134\%$, enquanto que $1,0 \mu\text{L mL}^{-1}$ inibiu $74,6880 \pm 1,5829 \%$. Já a maior concentração inibiu $78,2226 \pm 0,5828\%$ do crescimento micelial. Portanto, a atividade do extrativo permaneceu entre o controle positivo e negativo, não diferindo de ambos os controles.

Considerando os resultados do Índice de Crescimento Micelial (ICM), os tratamentos com OE também não diferiram de ambos os controles (Figura 2). O ICM para 0,5; 1,0 e $2,0 \mu\text{L mL}^{-1}$ foram de $21,86 \pm 0,37$; $11,75 \pm 0,73$ e $10,11 \pm 0,27$, respectivamente.

Figura 1 – Inibição do Crescimento Micelial *in vitro* do óleo essencial de folhas de *Nectandra grandiflora* frente ao fungo *Gloeophyllum trabeum*.

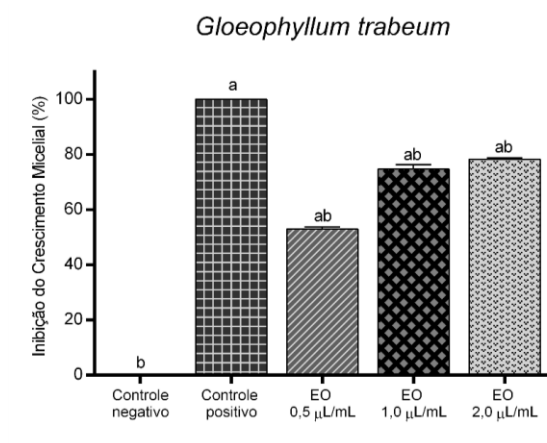
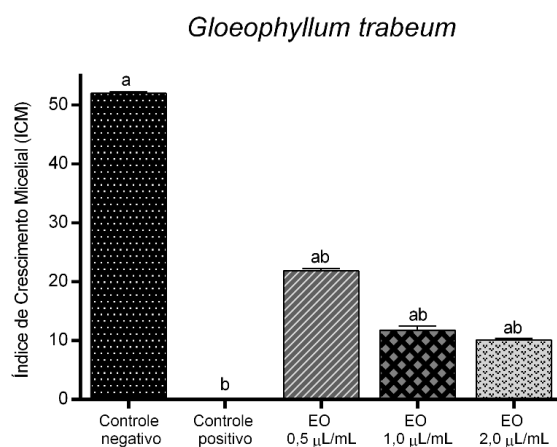


Figura 2 - Índice de Crescimento Micelial (ICM) *in vitro* de *Gloeophyllum trabeum* sob o efeito do óleo essencial das folhas de *Nectandra grandiflora*.



Os componentes dos OEs podem agir como fungitóxicos por diferentes mecanismos de ação. Segundo Jing et al. (2014), os terpenoides presentes nos OEs podem levar à degradação da parede celular, pelo rompimento da membrana citoplasmática ou pela interferência com as proteínas de membrana. Estes eventos podem causar o extravasamento citoplasmático, lise celular e, eventualmente, morte celular.

CONCLUSÃO

A análise da composição química do OE das folhas de *N. grandiflora* possibilitou a identificação de 28 componentes. Em relação a Inibição do Crescimento Micelial *in vitro* do fungo *G. trabeum*, a maior concentração do OE avaliada proporcionou o maior índice de inibição, não diferindo significativamente das menores concentrações.

Destaca-se ainda que, para os resultados do Índice de Crescimento Micelial, os tratamentos com OE não diferiram dos controles positivo e negativo, tendo sido observado um efeito dependente da concentração. Dessa maneira, recomenda-se a realização de pesquisas com concentrações maiores do que as descritas nesse trabalho, com o intuito de evidenciar uma diferença significativa entre os tratamentos. Também é indicada a avaliação do efeito do OE de *N. grandiflora* sobre outras espécies fúngicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, A. FERRAZ, A. **Mechanisms involved in the biodegradation of lignocellulosic materials and related technological applications**. Química Nova vol.34 no.10. São Paulo, 2011.
- BAHIA, M. S. **Biodeterioração e a durabilidade da madeira: estudo de aspectos construtivos em campo mourão-pr**. 109 f. Trabalho de Conclusão de Curso de graduação - Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR. 2005.
- BLACHETTE, R. A. A review of microbial deterioration found in archeological wood from different environments. **International Biodeterioration and Biodegradation**, Birmingham, v. 46, n. 3, p. 184-204, Apr. 2000.

BRASIL. **Farmacopéia Brasileira**. 5 ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária: ANVISA, 2010.

CARVALHO, P.E.R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Coleção espécies Arbóreas, vol. 4. Brasília, DF: Embrapa informações Tecnológica; Colombo, PR: Embrapa Florestas, 2010.

COSTA, A. F. **Utilização de interações entre produtos químicos preservantes no desenvolvimento de formulações para a prevenção de fungos manchadores e emboloradores na madeira**. 1999. 103 f. Tese (Doutorado em Ciências Florestais) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1999.

GESUALDO, F. A. R. Estruturas de Madeira. Universidade Federal de Uberlândia- Faculdade de Engenharia Civil, 2003.

JING, L.; LEI, Z.; LI, L.; XIE, R.; XI, W.; GUAN, Y.; SUMNER, L. W.; ZHOU, Z. Antifungal activity of *Citrus* essential oils. **J. Agric. Food Chem.**, v. 62, p. 3011–3033, 2014.

KNAAK, N.; FIUZA, L. M. Potential of essential plant oils to control insects and microorganisms. **Neotropical Biology and Conservation**. v. 5, n. 2, 2010.

MAGALHÃES, W. L. E. Seminário de atualidades de proteção florestal: Controle de manchadores e apodrecedores da madeira de pinus. Blumenau- SC, 2005.

MORESCHI J. C. Biodegradação e preservação da madeira. 4. ed. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, Departamento de Engenharia e Tecnologia Florestal. v. 2, 2013.

PANEK, M.; REINPRECHT, L.; HULLA, M. Ten essential oils for beech wood protection – efficacy against wood-destroying fungi and moulds, and effect on wood discoloration. **Bioresources**, v. 9, n. 3, p. 5588-5603, 2014.

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

REINPRECHT, L. Fungicides for wood protection – World viewpoint and evaluation/testing in Slovakia. **Fungicides, O. Carisse (ed)**, InTech, Rijeta, Croatia, p. 95-122. 2010

RIBEIRO, A. B.; BOLZANI, V. S.; YOSHIDAB, M.; SANTOS, L. S.; EBERLIND, M. N.; SILVA, D. H. S. A new neolignan and antioxidant phenols from *Nectandra grandiflora*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Campinas, v. 16, n. 3, p. 526- 530, 2005.

RYVARDEN, L. **Genera of polypores nomenclature and taxonomy**. Oslo: Gronlands Grafiske, 1991.

SANTOS, Z. M. **Avaliação da durabilidade natural da madeira de *Eucalyptus grandis* W. Hill: Maiden em ensaios de laboratório**. 1992. 75 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

SILVA, B. N. S. Seleção de fungos apodrecedores de madeira e caracterização de basidiomicetos associados à podridão de tecidos de árvores vivas. 90 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/ Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras. Lavras-MG, 2014.

YOON, M. Y.; CHA, B. KIM, J. C. Recent trends in studies on botanical fungicides in agriculture. **The Plant Pathology Journal**, v. 29, n. 1, p. 1-9. 2013.

ZULAUF, W.E. O meio ambiente e o futuro. vol.14. no 39. São Paulo, 2000. Inclui índice: ISSN 1806-9592