

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

Nadia Helena Bianchini

**ÓLEO ESSENCIAL DE *Nectandra grandiflora* Nees & Mart. ex Nees:
EFEITO ANTIFÚNGICO E BIOESTIMULANTE EM CULTIVOS *in vitro***

Santa Maria, RS
2017

Nadia Helena Bianchini

ÓLEO ESSENCIAL DE *Nectandra grandiflora* Nees & Mart. ex Nees: EFEITO ANTIFÚNGICO E BIOESTIMULANTE EM CULTIVOS *in vitro*

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

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

Santa Maria, RS
2017

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

Bianchini, Nadia Helena

ÓLEO ESSENCIAL DE *Nectandra grandiflora* Nees & Mart.
ex Nees: EFEITO ANTIFÚNGICO E BIOESTIMULANTE EM CULTIVOS
in vitro / Nadia Helena Bianchini.- 2017.
97 f.; 30 cm

Orientadora: Berta Maria Heinzmann
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós
Graduação em Engenharia Florestal, RS, 2017

1. Canela-amarela 2. Micropropagação 3. *Eugenia involucrata* De Candolle 4. Atividade antifúngica 5. Preservante da madeira. Ergosterol I. Heinzmann, Berta Maria II. Título.

Nadia Helena Bianchini


ÓLEO ESSENCIAL DE *Nectandra grandiflora* Nees & Mart. ex Nees: EFEITO ANTIFÚNGICO E BIOESTIMULANTE EM CULTIVOS *in vitro*

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

Aprovado em 20 de dezembro de 2017:


Berta Maria Heinzmann, Dra. (UFSM)
(Presidente/Orientadora)


Élio José Santini, Dr. (UFSM)


Igor Poletto, Dr. (UNIPAMPA)

Santa Maria, RS
2017

AGRADECIMENTOS

À minha família, agradeço por todo amor, carinho, apoio e dedicação. Minha eterna gratidão aos meus pais, Luís e Maria Iracema, a minha amada vó dona Maria, as minhas irmãs, Mônica e Elisa e ao meu namorado Daniel, por todas palavras de conforto e compreensão nos momentos de ausência.

A todos os professores que de alguma forma contribuíram para a minha formação. Em especial à professora Berta, pelas orientações, ensinamentos e confiança durante a elaboração desta dissertação, bem como no decorrer de toda minha vida acadêmica. Às professoras Lia e Marlove e a toda equipe do Laboratório de Fitopatologia e do Laboratório de Genética e Melhoramento de Plantas. Agradeço também à banca, por ter aceito o convite para avaliar esta dissertação.

Aos meus amigos, agradeço por todo apoio e incentivo. A todos os colegas do Laboratório de Extrativos Vegetais, pela parceria e troca de conhecimentos. Aos bolsistas de iniciação científica Alana e Bruno, por todo auxílio. Ao amigo e colega de laboratório Carlos, por toda parceria e auxílio durante a elaboração dos experimentos. Às minhas amigas Maiara e Débora, pela amizade sincera e por sempre me incentivarem em todas as minhas decisões.

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, que possibilitaram a realização desta dissertação de mestrado. À Capes, pelo apoio financeiro para a elaboração deste trabalho. Aos demais professores, amigos, funcionários e colegas, que participaram de alguma forma da minha formação.

Muito obrigada!

RESUMO

ÓLEO ESSENCIAL DE *Nectandra grandiflora* Nees & Mart. ex Nees: EFEITO ANTIFÚNGICO E BIOESTIMULANTE EM CULTIVOS *in vitro*

AUTORA: Nadia Helena Bianchini
ORIENTADORA: Berta Maria Heinzmann

A presente dissertação visa contribuir com o conhecimento acerca das atividades biológicas do óleo essencial (OE) de *Nectandra grandiflora* Nees & Mart. ex Nees e seu constituinte majoritário, a (+)-deidrofuquinona (DHF). Para isto, verificou-se o potencial deste extrativo para atuar como bioestimulante em explantes de uma espécie lenhosa nativa cultivada *in vitro*. Adicionalmente, determinou-se o potencial antifúngico tanto do OE de *N. grandiflora* quanto do seu constituinte majoritário frente a fungos apodrecedores da madeira, além de verificar sua ação sobre o conteúdo de ergosterol na membrana plasmática dos fitopatógenos. O OE foi obtido a partir das folhas de *N. grandiflora* por meio de hidrodestilação, com o auxílio do aparelho tipo Clevenger modificado. Em seguida, determinou-se o rendimento de extração e realizou-se a análise da composição química por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM). O constituinte majoritário do OE foi isolado por meio de 4 colunas cromatográficas, realizadas em sequência. Para os testes com os explantes, segmentos nodais de *Eugenia involucrata* De Candolle foram inoculados em meio nutritivo ½ MS, suplementado com o OE de *N. grandiflora*, previamente diluído em etanol, nas concentrações de 0,00, 0,05, 0,075, 0,10, 0,125, 0,150, 0,175 e 0,200 $\mu\text{L mL}^{-1}$. Os resultados evidenciaram que, na concentração de 0,075 $\mu\text{L mL}^{-1}$, os explantes emitiram um maior número de folhas quando comparados aos controles. Para a determinação do potencial antifúngico do OE de *N. grandiflora* e de seu constituinte majoritário, os extrativos, previamente diluídos em etanol, foram adicionados ao meio nutritivo BDA. O potencial antifúngico foi verificado frente aos fungos causadores de podridão-branca *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat. e *Trametes versicolor* (L.: Fr) Pilát, bem como frente aos fungos causadores de podridão-parda *Lentinus lepideus* (Fr.) Fr. e *Gloeophyllum trabeum* (Pers.: Fr) Murrill. O OE foi avaliado nas concentrações de 0,0, 0,5, 1,0 e 2,0 $\mu\text{L mL}^{-1}$, enquanto que a DHF foi avaliada na concentração correspondente à encontrada em 0,5 $\mu\text{L mL}^{-1}$ de OE (0,0971 $\mu\text{L mL}^{-1}$). Quanto aos resultados de porcentagem de inibição do crescimento micelial, destaca-se que o OE de *N. grandiflora* inibiu totalmente o crescimento do fungo de podridão-branca *T. versicolor* a 1,0 $\mu\text{L mL}^{-1}$, apresentando o mesmo comportamento que o controle positivo. As demais espécies fúngicas não tiveram seu crescimento afetado pelos extrativos nas concentrações avaliadas. Adicionalmente, os resultados encontrados nos tratamentos com OE não diferiram daqueles realizados com a substância isolada, evidenciando que a DHF é uma das substâncias responsáveis pela atividade antifúngica detectada. No que tange à influência dos extrativos sobre o conteúdo de ergosterol na membrana plasmática dos fitopatógenos, os resultados indicaram que ambos os extrativos avaliados causaram uma redução deste esterol para os fungos *T. versicolor* e *G. applanatum*, indicando ter como alvo de ação a membrana plasmática dos fungos causadores de podridão-branca. Com base no exposto, destaca-se o potencial do OE de *N. grandiflora* para atuar como um possível bioestimulante no desenvolvimento de segmentos nodais cultivados *in vitro* de *E. involucrata*, bem como para inibir o crescimento do fungo apodrecedor da madeira *T. versicolor*.

Palavras-chave: Canela-amarela. Micropropagação. *Eugenia involucrata* De Candolle. Atividade antifúngica. Preservante da madeira. Ergosterol.

ABSTRACT

***Nectandra grandiflora* Nees & Mart. ex Nees ESSENTIAL OIL: ANTIFUNGAL AND BIO-STIMULATING EFFECT IN *in vitro* CULTURES**

AUTHOR: NADIA HELENA BIANCHINI
ADVISOR: BERTA MARIA HEINZMANN

The present dissertation aims to contribute to correct knowledge of biological activities of *Nectandra grandiflora* Nees & Mart. ex Nees essential oil (EO) and its major compound, (+)-dehydrofukinone (DHF). So, the potential this extract was verified to act as biostimulant in native woody species explants cultivated *in vitro*. Additionally, the antifungal potential of both *N. grandiflora* OE and its major constituent against wood rot fungi was determined, as well as its action on ergosterol content in the plasma membrane of phytopathogens. The EO was obtained from *N. grandiflora* leaves by hydrodistillation with modified Clevenger apparatus. Then, extraction yield was determined, and chemical composition was analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). The major constituent of OE was isolated by 4 chromatographic columns, carried out in sequence. For tests with the explants, *Eugenia involucrata* De Candolle nodal segments were inoculated in ½ MS medium, supplemented with *N. grandiflora* EO, previously diluted in ethanol, at .0.00, 0.05, 0.075, 0.1, 0.125, 0.15, 0.175 e 0.2 µL mL⁻¹. The results showed that, when exposed to EO at 0.075 µL mL⁻¹, the explants emitted a greater number of leaves when compared to the controls. For determination of *N. grandiflora* OE and its major constituent antifungal potential, the extractives previously diluted in ethanol were added to PDA medium. The antifungal potential was verified against white-rot fungi *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat. and *Trametes versicolor* (L.: Fr) Pilát, as well as brown-rot fungi *Lentinus lepideus* (Fr.) Fr. and *Gloeophyllum trabeum* (Pers.: Fr) Murrill. The EO was evaluated at 0.0, 0.5, 1.0 and 2.0 µL mL⁻¹, whereas DHF was evaluated at the corresponding concentration to that found in 0.5 µL mL⁻¹ EO (0.0971 µL mL⁻¹). Regarding the results of mycelium growth inhibition, *N. grandiflora* EO completely inhibited growth of white-rot fungi *T. versicolor*, at 1.0 µL mL⁻¹ EO, presenting the same behavior as positive control. The other fungal species did not have their growth affected by the extractives at the tested concentrations. Additionally, the results for the EO treatments did not differ from those obtained with the isolated substance, evidencing that the DHF is one of the substances responsible for the antifungal activity detected. Regarding the influence of the extractives on ergosterol content in plasma membrane of phytopathogens, the results indicated that both extractives evaluated caused a reduction of this sterol in *T. versicolor* and *G. applanatum*, indicating that their action target was the plasma membrane of white-rot fungi. Thus, the potential of *N. grandiflora* EO to act as possible biostimulant in the development of *in vitro* nodal segments of *E. involucrata* is highlighted, as well as to inhibit the growth of white-rot fungus *T. versicolor*.

Keywords: Lauraceae. Micropropagation. *Eugenia involucrata* De Candolle. Antifungal activity. Wood Preservative. Ergosterol.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

APRESENTAÇÃO

- Figura 1 - Detalhe das folhas e frutos de *Nectandra grandiflora*, localizada em Jaguari – RS.....15
- Figura 2 - Exemplar de *Eugenia involucrata*17
- Figura 3 - Fórmula estrutural do ergosterol.....22
- Figura 4 - Representação esquemática da localização do ergosterol na membrana celular fúngica.....23
- Figura 5 - Caracterização da área de coleta do material vegetal.25
- Figura 6 - Perfis de absorvância no ultravioleta de derivados esteroidais da membrana de *Aspergillus flavus* em presença e ausência do óleo essencial de *Cinnamomum jensenianum* Hand.-Mazz.....32

MANUSCRITO 1

- Figure 1 - *Eugenia involucrata* explants cultivated *in vitro* under different concentrations of *Nectandra grandiflora* essential oil (EO) diluted in nutritive medium.....45

MANUSCRITO 2

- Figure 1 – Collection place of plant material.....54
- Figure 2 – *In vitro* mycelial growth inhibition (MGI%) of *Nectandra grandiflora* essential oil (EO) and its major component (+)-dehydrofukinone (DHF) on *Ganoderma applanatum*, *Trametes versicolor*, *Lentinus lepideus* and *Gloeophyllum trabeum*.....61
- Figure 3 – *In vitro* Speed Index of Mycelial Growth (SIMG) of *Ganoderma applanatum*, *Trametes versicolor*, *Lentinus lepideus* and *Gloeophyllum trabeum* under the effects of *Nectandra grandiflora* essential oil (EO) and (+)-dehydrofukinone (DHF).....62
- Figure 4 – *In vitro* Mycelial Growth inhibition (%) of *Nectandra grandiflora* essential oil at 0.5 $\mu\text{L mL}^{-1}$ and (+)-dehydrofukinone at proportional concentration on *Ganoderma applanatum*, *Trametes versicolor*, *Lentinus lepideus* and *Gloeophyllum trabeum*.....64
- Figure 5 – Mycelial wet weight (g) and absorbance values of sterols extracted from *Ganoderma applanatum* (A, B), *Gloeophyllum trabeum* (C, D), *Trametes versicolor* (E, F) and *Lentinus lepideus* (G, H) mycelia growing in medium containing *Nectandra grandiflora* essential oil or (+)-dehydrofukinone.....67

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO 1

- Table 1 - Chemical composition of essential oil extracted from *Nectandra grandiflora* fresh leaves.....40
- Table 2 - Pilot test: Survival (Surv.), bacterial contamination (Bac. Cont.), Establishment (Estab.) and number of leaves formed (N. Leaves) of *Eugenia involucrata* at 30 days of *in vitro* culture, after inoculation in ½ MS medium, containing different concentrations of *Nectandra grandiflora* leaves essential oil.....42
- Table 3 - Establishment (Estab.) and number of leaves formed (N. Leaves) of *Eugenia involucrata* at 30 days of *in vitro* culture, after inoculation in ½ MS medium, containing different concentrations of *Nectandra grandiflora* leaves essential oil.....44

MANUSCRITO 2

- Table 1 - Chemical composition of the essential oil extracted from *Nectandra grandiflora* fresh leaves.....59
- Table 2 - *In vitro* mycelial growth inhibition (%) and IC₅₀ of *Nectandra grandiflora* essential oil on *Ganoderma applanatum*, *Trametes versicolor*, *Lentinus lepideus* and *Gloeophyllum trabeum*.....63

DISCUSSÃO

- Tabela 1- Condensação das unidades de isopreno na formação de terpenoides.....76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BDA	Meio de cultura composto por batata, dextrose e ágar.
BOD	Incubadora com fotoperíodo e temperatura controladas
CC	Coluna cromatográfica
CCD	Cromatografia em camada delgada
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
CG-DIC	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria em chamas
DHF	(+)-deidrofuquinona
OE	Óleo essencial
ICM	Índice de crescimento micelial
MS	Meio de cultura Murashige e Skoog

SUMÁRIO

1 APRESENTAÇÃO	10
1.1 INTRODUÇÃO	10
1.2 REFERENCIAL TEÓRICO	12
1.2.1 Óleos essenciais	12
1.2.2 A espécie <i>Nectandra grandiflora</i> Nees & Mart. ex Nees	14
1.2.3 A espécie <i>Eugenia involucrata</i> De Candolle	16
1.2.4 Micropropagação	17
1.2.5 Fungos apodrecedores da madeira	19
1.2.6 Ergosterol	22
1.3 PROPOSIÇÃO	24
1.4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
1.4.1 Extração e análise química do óleo essencial	24
1.4.1.1 <i>Coleta do material vegetal</i>	24
1.4.1.2 <i>Extração do óleo essencial</i>	25
1.4.1.3 <i>Análise da composição química</i>	26
1.4.2 Fracionamento do óleo essencial	26
1.4.3 Micropropagação	27
1.4.3.1 <i>Coleta dos explantes</i>	27
1.4.3.2 <i>Meio de cultura</i>	28
1.4.3.3 <i>Controle dos agentes contaminantes, da oxidação fenólica e estimulação do desenvolvimento e estabelecimento dos explantes</i>	28
1.4.3.4 <i>Avaliação</i>	29
1.4.3.5 <i>Análise estatística</i>	29
1.4.4 Atividade antifúngica e mecanismo de ação	30
1.4.4.1 <i>Cultivo dos fungos apodrecedores</i>	30
1.4.4.2 <i>Efeito do OE sobre o conteúdo de ergosterol da membrana fúngica</i>	31
2 MANUSCRITO 1 – Essential oil of <i>Nectandra grandiflora</i> Nees & Mart. ex Nees increases the number of leaves in explants in the of <i>Eugenia involucrata</i> De Candolle	34
3 MANUSCRITO 2 – <i>Nectandra grandiflora</i> Nees & Mart. ex Nees essential oil: growth inhibition and action on ergosterol content of wood rot fungi	51
4 DISCUSSÃO	74
5 CONCLUSÃO	83
REFERÊNCIAS	84

1 APRESENTAÇÃO

1.1 INTRODUÇÃO

A busca por novos produtos biodegradáveis em detrimento ao uso dos produtos comerciais de alta persistência no ambiente é constante, visto que os produtos sintéticos de uso convencional apresentam elevada toxicidade e efeito residual (SINGH; SINGH, 2012). No setor florestal, observa-se um engajamento no aperfeiçoamento de técnicas para o controle de microrganismos que causam prejuízos em diversas áreas. Dentre elas, inclui-se a Tecnologia da Madeira, que busca encontrar estratégias para o controle de fungos apodrecedores da madeira, e o Melhoramento Genético, que visa aprimorar as técnicas de cultivo e controlar os agentes microbianos que contaminam os explantes cultivados *in vitro*.

Em relação aos fungos apodrecedores da madeira, diversos preservantes comerciais que são eficazes para o controle destes fitopatógenos contêm metais pesados em sua formulação, como Cr, As, Cu e B, motivo que levou à proibição do seu uso em alguns países nos últimos anos (DÉON, 1989; YOON; CHA; KIM, 2013; REINPRECHT, 2010). Estes produtos causam vários danos à saúde humana, como riscos de câncer, malformações em fetos, danos no fígado e nos rins, mudanças neuropáticas, asma e várias reações alérgicas. Adicionalmente, causam problemas ecológicos ao longo da vida-útil da madeira tratada, principalmente durante o descarte da mesma (PÁNEK; REINPRECHT; HULLA, 2014). Desta maneira, a elevada toxicidade dos preservantes da madeira de uso convencional, fomenta a busca por substâncias de origem natural, capazes de controlar o crescimento dos agentes fitopatógenos que causam danos à madeira serrada.

No que concerne à micropropagação, espécies lenhosas nativas apresentam dificuldades durante o estabelecimento *in vitro* de suas culturas, principalmente em decorrência da oxidação e da contaminação dos explantes (SATO et al., 2001). Em virtude disso, faz-se necessário o uso de substâncias com ação germicida, antibiótica e antioxidante (MORAIS et al., 2012) durante o cultivo, além do uso de reguladores de crescimento e/ ou bioestimulantes (CASTRO; VIEIRA, 2001). No que tange aos agentes contaminantes de explantes cultivados *in vitro*, os microrganismos endofíticos representam um sério problema para a cultura de tecidos vegetais. Isto porque geralmente reduzem o crescimento, a multiplicação e a taxa de enraizamento das

culturas e, em alguns casos, podem levar à morte dos vegetais (LEIFERT et al.1991). Entretanto, mesmo que essas contaminações não sejam desejáveis, quando o microrganismo é identificado como não patogênico, o cultivo associado pode ser uma alternativa (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Com base no exposto, o uso de produtos naturais, como os extrativos vegetais, vem ganhando destaque mundial por serem uma alternativa ambientalmente segura para substituir produtos comerciais de uso convencional (MENEZES, 2005; ISMAN; MACHIAL, 2006; BENTO et al., 2014). Os extrativos vegetais desempenham diversas funções biológicas nas plantas, já que atuam na defesa dos tecidos vegetais contra herbívoros e microrganismos, na proteção contra os efeitos deletérios da radiação ultravioleta, na atração de polinizadores e dispersores de sementes, na regulação do crescimento, na eliminação de espécies reativas de oxigênio (radicais livres) e nas interações planta-planta (SCALBERT; 1991; HARBORNE; WILLIAMS, 2000; GLINWOOD; NINKOVIC; PETTERSSON, 2011).

Dentre os extrativos vegetais, destacam-se os óleos essenciais (OEs), que são conhecidos também como óleos voláteis e ocorrem em diversos gêneros de plantas superiores e inferiores (VITTI e BRITO, 2003). Estes produtos florestais não madeireiros possuem elevado valor no mercado e são conhecidos por suas propriedades antibióticas, anti-inflamatórias, antifúngicas, antibacterianas, inseticidas, analgésicas, sedativas e antioxidantes (PINHEIRO, 2003; FENG e ZHENG, 2007; KNAAK e FIUZA, 2010). Adicionalmente, são utilizados na indústria farmacêutica e de perfumaria, na fabricação de produtos de higiene e de limpeza (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009), além de poder ser incorporados na formulação de produtos sintéticos, com o intuito de reduzir ou até mesmo substituir o uso de elementos tóxicos (DANIELLI et al., 2017).

Neste contexto, dentre as plantas produtoras de OEs, está a espécie arbórea *Nectandra grandiflora* Nees & Mart. ex Nees, conhecida popularmente como canela-amarela. Esta árvore pertence à família Lauraceae, que apresenta grande importância em virtude de suas plantas possuírem extensas aplicações (MARQUES, 2001; MELO et al., 2006). Diversas atividades biológicas já foram descritas para o OE de *N. grandiflora* (CUNICO et al., 2010; GARLET et al., 2016; SILVA et al., 2016), evidenciando o potencial desta espécie para o controle de agentes contaminantes. Com base no exposto, o objetivo dessa dissertação foi verificar o potencial do OE de *N. grandiflora* para controlar os contaminantes, a oxidação fenólica e/ou estimular o

desenvolvimento dos explantes de *Eugenia involucrata* De Candolle cultivados *in vitro*, bem como verificar sua atividade antifúngica frente a fungos apodrecedores da madeira. Adicionalmente, buscou-se avaliar um possível mecanismo de ação pelo qual esse extrativo age nos fitopatógenos, avaliando seu efeito sobre a concentração de ergosterol da membrana celular fúngica.

Esta dissertação está organizada na forma de dois manuscritos, formatados conforme as normas da Universidade Federal de Santa Maria. Após a introdução é apresentado o Referencial Teórico, que contempla brevemente os temas mais relevantes relacionados a este estudo. Na sequência, são descritos os objetivos deste trabalho, no item Proposição. Para facilitar o entendimento de como os testes foram realizados, a metodologia de ambos os manuscritos está descrita detalhadamente no item Materiais e Métodos. Em seguida, os resultados desta dissertação encontram-se organizados na forma de dois manuscritos científicos. O Manuscrito 1 apresenta resultados que evidenciam o potencial do OE das folhas de *N. grandiflora* para estimular o desenvolvimento e o estabelecimento dos explantes de *E. involucrata* cultivados *in vitro*. Já o Manuscrito 2, descreve a atividade antifúngica tanto do OE de folhas de *N. grandiflora* quanto do seu constituinte majoritário frente a fungos apodrecedores da madeira, além de avaliar seu efeito sobre a concentração de ergosterol na membrana celular fúngica. No tópico Discussão, realizou-se uma interpretação dos resultados descritos em ambos manuscritos, onde buscou-se concatená-los entre si e com os dados disponíveis na literatura. Por fim, encerra-se esta dissertação com a Conclusão, seguida pelas Referências Bibliográficas utilizadas para a elaboração deste trabalho.

1.2 REFERENCIAL TEÓRICO

1.2.1 Óleos essenciais

Por definição, os OEs são misturas de substâncias orgânicas voláteis, constituídas, na maioria das vezes, de componentes oxigenados e hidrocarbonetos, sendo que sua composição química varia entre as espécies de plantas (PRABUSEENIVASAN et al., 2006; SIQUEIRA et al., 2007; NERIO et al., 2010). Estas misturas complexas são frequentemente provenientes das vias isoprenoides e consistem principalmente de monoterpenoides e sesquiterpenoides (JAVAD et al.,

2017). Em algumas famílias vegetais os OEs são produzidos e secretados por tricomas glandulares, que são estruturas secretoras especializadas difundidas na superfície dos órgãos das plantas, principalmente nas flores e folhas (IRITI et al., 2006). Desta maneira, estes extrativos podem repelir os predadores antes do ataque, devido a toxicidade de alguns dos seus componentes (TAIZ; ZEIGER, 2009). No entanto, outras famílias botânicas se caracterizam por apresentar estruturas secretoras e de estocagem localizadas no interior dos tecidos vegetais, como células oleíferas, bolsas lisígenas e esquizógenas (HEINZMANN et al., 2017).

Quanto à aplicação, os OEs são utilizados na medicina, na aromaterapia, na fabricação de cosméticos, nas indústrias de alimentos, de pesticidas, farmacêutica e de perfumaria, bem como na fabricação de produtos de higiene e de limpeza, devido as suas propriedades aromáticas e flavorizantes e, também, por suas atividades inseticidas, terapêuticas, antimicrobianas e antioxidantes. Ressalta-se ainda que a fonte para a obtenção de OE, as plantas, podem ser produzidas em grande quantidade como produtos agrícolas/ florestais, sendo, portanto, um recurso renovável. Adicionalmente, esta classe de extrativos é menos tóxica ao meio ambiente e menos perigosa aos seres humanos e animais em comparação aos produtos sintéticos (PARK et al., 2006; FENG; ZHENG, 2007; SATISH et al., 2007; BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009; KNAAK; FIUZA, 2010; PRINS; VIEIRA; FREITAS, 2010; SAKAI, 2012; PINHEIRO, 2014).

A literatura traz relatos sobre as mais diversas atividades biológicas associadas aos componentes dos OEs e algumas delas evidenciam seu potencial para reduzir o uso dos biocidas sintéticos. Os OEs podem atuar contra pragas agrícolas e são considerados alternativa viável no seu controle, podendo ter uso potencial como inseticidas, fumigantes e fungicidas (ISMAN, 2000). Além da atividade inseticida já mencionada (BRITO; OLIVEIRA; BARTOLI, 2006; FAZOLIN et al., 2007), os OEs apresentam atividades alelopáticas (ARALDI, 2011), antibacterianas e antioxidantes (HUSSAIN et al., 2010). Adicionalmente, foram descritos efeitos anti-inflamatórios (RAMOS et al., 2013), anticolinesterásicos (KIENDREBEOGO et al., 2011), sedativos, ansiolíticos (HAJHASHEMI et al., 2010), anestésicos (SILVA et al., 2012) e antifúngicos (SCHINDLER, 2013; SILVA et al., 2016; TRES, 2017).

Entretanto, concomitantemente ao conhecimento da ação biológica do OE, é fundamental que se conheça também a composição química do mesmo antes de sua utilização. Isto porque, na dependência da mistura específica dos constituintes

químicos, a atividade desejada pode ocorrer ou não. Atrelado a isto, ressalta-se que a composição química dos OEs é determinada pela genética da planta produtora e pode variar de acordo com sua fenologia, além de ser suscetível às variações de fatores ambientais externos, como luminosidade, temperatura, disponibilidade hídrica, clima, altitude e tipo de solo do local onde coletou-se a planta. Adicionalmente, podem haver alterações qualitativas e quantitativas na composição química de acordo com o método de extração, o órgão vegetal da planta e métodos de secagem utilizados previamente (SANGWAN et al., 2001; DINIZ; ASTARITA; SANTARÉM, 2006; BELTRAME et al., 2010; JAVAD et al., 2017).

1.2.2 A espécie *Nectandra grandiflora* Nees & Mart. ex Nees

De porte pequeno, a espécie arbórea *N. grandiflora* não é considerada de grande expressão madeireira (PIZATTO, 1999). Seu lenho apresenta cheiro fortemente adocicado e desagradável, porém não apresenta o odor de excremento presente em outras espécies de Lauraceae (ZANON; GOLDENBERG; MORAES, 2009). As folhas, as flores e a casca também possuem odor característico. A floração da espécie ocorre entre os meses de agosto a outubro e a frutificação (Figura 1) de janeiro a março (MARCHIORI, 1997).

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 (PIZATTO, 1999; LORENZI, 2002). É considerada uma planta endêmica do Brasil, e é encontrada predominantemente nos biomas Mata Atlântica e Cerrado, entre os estados de Minas Gerais e Rio Grande do Sul (QUINET et al., 2010). Na medicina popular, *N. grandiflora* é utilizada por apresentar os efeitos antirreumático, diurético e digestivo (CORRÊA, 1984).

Figura 1 - Detalhe das folhas e frutos de *Nectandra grandiflora*, localizada em Jaguari - RS.



Fonte: o autor.

Um ensaio antitumoral *in vitro* foi realizado por Moreno et al. (1993) com o extrato etanólico de cascas de *N. grandiflora*, foi verificada uma inibição de 59,2% do crescimento de células do sarcoma 180 e de 61,5% do carcinoma de Ehrlich. Entretanto, o extrato etanólico obtido de folhas apresentou propriedade antioxidante pelo método do β -caroteno (RIBEIRO; SILVA; BOLZANI, 2002) e pelo método de redução do radical DPPH (RIBEIRO et al., 2005). O potencial antimicrobiano da espécie também já foi verificado frente às bactérias *Staphylococcus aureus*, com halo de inibição variando de 9 a 10 mm para as concentrações de 2,5 a 10 μ L de OE (CUNICO et al., 2010). Também inibiu o crescimento das espécies *Plesiomonas shigelloides*, *Acinetobacter calcoaceticus* e *Aeromonas hydrophila* (GARLET et al., 2015).

1.2.3 A espécie *Eugenia involucrata* De Candolle

Conhecida popularmente como cerejeira-do-mato, Cerejeira-do-rio-grande, Cerejeira-da-terra, Pitanga-preta, Araçazeiro ou Cerejeira, a espécie arbórea *E. involucrata* pertence à família Myrtaceae (Figura 2). A altura desta espécie arbórea pode variar entre 10 a 15 m, podendo alcançar até 20 m. A espécie possui copa arredondada e tronco ereto, relativamente cilíndrico, com diâmetro que varia entre 30 a 40 cm. Em relação ao crescimento, este é classificado como simpodial (REITZ; KLEIN; REIS, 1988; BACKES; IRANG, 2002; CARVALHO, 2008).

Esta espécie arbórea ocorre naturalmente no Brasil, desde Minas Gerais até o Rio Grande do Sul, bem como em outros países da América do Sul, em locais com altitudes que variam de 30 m a 1700 m acima do nível do mar (CARVALHO, 2008). No Rio Grande do Sul, esta espécie pode ser encontrada na Floresta Estadual Semi-decidual do Planalto e do Alto Uruguai, na Depressão Central e na Floresta Ombrófila Densa do litoral do Estado (BACKES; IRANG, 2002; SOBRAL, 2003). Há também registros da espécie na encosta meridional da Serra Geral, Serra do Sudeste, Floresta Pluvial da Mata Atlântica e na bacia do Rio Ibicuí (SOBRAL et al., 2006).

Em relação às sementes desta espécie, estas são classificadas como recalcitrantes, de longevidade relativamente pequena, variando de poucos dias a poucos meses. Estas sementes também podem ser consideradas microbióticas ou de vida curta (FONSECA; FREIRE, 2003). Alguns estudos corroboram com esta afirmativa, informando que após duas semanas, o potencial germinativo dessas sementes já sofre reduções significativas (LORENZI, 1992; CARVALHO, 2008). Adicionalmente, as sementes que caem das árvores não germinam no solo ao redor da planta mãe (REITZ; KLEIN; REIS, 1988), o que ressalta a importância do aprimoramento de técnicas para propagá-la vegetativamente.

Figura 2 - Exemplar de *Eugenia involucrata*.



Fonte: João Augusto Bagatini (Flora digital).

Dentre as aplicações já descritas para esta espécie, destaca-se o seu uso na silvicultura devido à alta qualidade e durabilidade da sua madeira (RODRIGUES; CARVALHO, 2001). Por este motivo, pode ser utilizada na construção-civil, para a produção de ferramentas agrícolas, bem como na produção de lenha e carvão (SANHOTETE, 1989; MARCUZZO, 1998; BACKES; IRGANG, 2002; LORENZI, 2008; CARVALHO, 2008). Adicionalmente, já foram descritas na literatura propriedades medicinais relacionadas a esta espécie, além de ser conhecida por seus produtos florestais não madeireiros, devido seu uso na área frutícola (RODRIGUES; CARVALHO, 2001).

1.2.4 Micropropagação

A cultura de tecidos vegetais é uma ferramenta que permite a produção rápida de muitas plantas geneticamente idênticas, utilizando quantidades relativamente pequenas de espaço, suprimentos e tempo (ODUTAYO et al., 2004). A

micropropagação foi estabelecida como a alternativa mais adequada para regeneração rápida, independente da estação do ano, em diversas espécies lenhosas (NEGI; SAXENA, 2011; PATEL et al. 2015). Neste contexto, Goyal et al. (2015) relatam que os melhores explantes para micropropagação são os segmentos nodais.

Como vantagens da micropropagação, podemos citar a necessidade de um espaço reduzido, maiores taxas de multiplicação em relação aos sistemas convencionais de propagação, uniformidade das plantas, produção de mudas livres de patógenos, controle das condições ambientais locais e sazonais para a produção de mudas (GEORGE, 2008; GARCIA-GONZALES et al., 2010; SENGAR; SENGAR; GARG et al., 2011; SNYMAN et al., 2011). Já as desvantagens são o custo elevado (ETIENNE; BERTHOULY, 2002), a baixa taxa de sobrevivência das plantas quando levadas a campo (GEORGE, 2008) e a contaminação, com perdas estimadas de 10% (COSTA; SCHERWINSKI-PEREIRA; OTONI, 2010).

A propagação *in vitro* é uma técnica que consiste em vários estágios, iniciando pela seleção dos explantes, estabelecimento de cultura asséptica, multiplicação, enraizamento até a aclimação de plantas, sendo que a esterilização dos explantes é a etapa mais importante para o estabelecimento de culturas assépticas (MIHALJEVIĆ et al., 2013). Diversas dificuldades podem ser encontradas durante a micropropagação de espécies lenhosas (BASSAN et al., 2006), principalmente em decorrência da oxidação e da contaminação (SATO et al., 2001). Desta maneira, é comum a ocorrência de compostos fenólicos, que podem estar relacionados a processos de regulação de crescimento (ANDRADE; LUZ; LACERDA, 2000).

Outro entrave encontrado durante o cultivo *in vitro* de plantas lenhosas é o acúmulo de polifenóis e produtos de oxidação, como melanina, suberina, lignina, cutina e calose em torno da superfície incisada, que modificam tanto a composição do meio nutritivo quanto a absorção de metabólitos (ANDRADE; LUZ; LACERDA, 2000). Neste sentido, para estimular o desenvolvimento dos explantes, diversas classes de reguladores vegetais e/ou fitormônios têm sido empregadas nas técnicas de cultura de tecidos, havendo a necessidade de suplementar o meio nutritivo com fitormônios, como auxinas, citocininas, giberelinas e/ou outras substâncias (SOUZA et al., 2010).

Fitormônios são moléculas que têm efeitos específicos sobre o crescimento da planta e são ativas em baixas concentrações. Como exemplo, destaca-se a giberelina, que é sintetizada principalmente no ápice caulinar e nas folhas jovens em desenvolvimento, podendo ocorrer também em exsudatos e extratos de raízes. Este

regulador de plantas superiores é classificado quimicamente como diterpenoide e é muito importante por regular o alongamento do caule, floração e frutificação. Adicionalmente, as giberelinas estão associadas a processos de transição de indivíduos jovens para adultos, participam da divisão celular e do crescimento da parte aérea. Desempenham também um papel importante na germinação de sementes, por meio da ativação do crescimento vegetativo embrionário e mobilização de reservas energéticas do endosperma (TAIZ; ZEIGER 2004; NAMBARA; MARION-POLL 2005; TEALE et al., 2006; SPATZ; GRAY 2008).

No que tange à contaminação *in vitro* por fungos, bactérias e leveduras, este é um dos problemas mais sérios nos laboratórios de tecidos de plantas comerciais e de pesquisa (MIHALJEVIĆ et al., 2013). Os contaminantes bacterianos que infectam os explantes cultivados *in vitro* podem ser oriundos de explantes infectados, ambientes de laboratório com instalações limitadas ou técnicas inadequadas de cultura de tecidos (LATA et al., 2006; MIZRA et al., 2010; SHEN et al., 2010; THOMAS; GOPLAKRISHNAN; KRISHNAREDDY, 2011). Dentre os contaminantes, estão os endófitos, que são microrganismos internamente associados às plantas com efeitos mutualistas ou não no hospedeiro (HALLMANN et al., 1997; MANO; MORISAKI, 2008). Eles são isolados após a esterilização superficial do tecido vegetal, processo que é semelhante ao procedimento de descontaminação seguido durante o início das culturas *in vitro* (THOMAS, KUMARI., 2010).

Segundo Toledo (2011), a cultura de tecidos vegetais deve ser realizada com rigorosa assepsia, visto que, independentemente da metodologia utilizada, a contaminação microbiana dos explantes é o mais severo transtorno que pode ocorrer (KNEIFEL; LEONHARDT, 1992). Isto porque, quando os microrganismos entram em contato com o meio de cultura, os mesmos encontram condições necessárias para se desenvolver, inviabilizando-a. O alto grau de contaminação e a localização sistêmica de microrganismos são responsáveis, em alguns casos, pelo insucesso da implantação de culturas *in vitro* (TOLEDO, 2011).

1.2.5 Fungos apodrecedores da madeira

Os fungos desempenham um papel essencial na ciclagem dos nutrientes nos ecossistemas. Entretanto, sob certas condições, muitas espécies de fungos podem deteriorar a madeira em seu estado natural em um tempo relativamente curto,

causando perdas econômicas significativas. Neste contexto, a manutenção da qualidade da madeira tem sido uma preocupação constante na indústria madeireira, havendo uma demanda crescente por produtos extraídos ou produzidos com danos mínimos para a saúde humana e para o meio ambiente. Atualmente, os conservantes químicos de uso convencional são eficientes para controlar os fungos degradadores da madeira. No entanto, seu uso contínuo tem causado diversos impactos ao meio ambiente e a saúde dos seres humanos e animais (BENTO et al., 2014; PÁNEK; REINPRECHT; HULLA, 2014; STANGERLIN et al., 2013; SINGH; SINGH, 2012).

Desta maneira, a busca por compostos bioativos derivados de plantas que apresenta atividade frente a fungos apodrecedores da madeira, tem sido o foco de pesquisa, visando encontrar produtos eficazes e ecologicamente seguros (SENSUNG; HUANG-YUAN; SHANG-TZEN, 2005). Neste sentido, os métodos biológicos para preservação da madeira tem sido um tema amplamente pesquisado, que incluem o uso de produtos naturais de baixo impacto ambiental.

Estes produtos podem ser obtidos a partir de plantas ou por meio de extrativos, que podem ser extraídos de espécies madeireiras de maior durabilidade, como taninos, flavonoides ou terpenoides. Também podem ser obtidos de outros órgãos vegetais, a exemplo dos extratos de pimenta, com o composto ativo capsaicina, ou de própolis, com o efeito antibiótico (HUANG et al., 2004; AMUSANT et al., 2005; SINGH; CHITTENDEN; VESENTINI, 2006; BUDIJA et al., 2008).

Um método natural promissor para preservação da madeira é o uso de OE e seus compostos ativos obtidos a partir de plantas, conhecidos por apresentar as atividades antifúngicas, inseticidas e antibacterianas. Os OEs possuem diversas vantagens em relação aos produtos sintéticos de uso convencional e, dentre elas, podemos citar a possibilidade de combinação das atividades antifúngicas, antibacterianas e inseticidas em um único produto. Adicionalmente, são menos tóxicos em relação aos produtos sintéticos, e, portanto, possivelmente causarão poucos ou nenhum problema tanto durante a vida útil da madeira tratada quanto ao descarte dos produtos após sua vida-útil. Como desvantagens, podemos citar a alta volatilidade e instabilidade da concentração dos seus compostos efetivos (BATISH et al., 2008; PÁNEK; REINPRECHT; HULLA, 2014).

Em relação aos fungos apodrecedores da madeira, destacam-se aqueles pertencentes à classe dos Basidiomicetos. Estes são conhecidos por causar a podridão-parda e podridão-branca, além de possuir características enzimáticas

próprias quanto à deterioração dos constituintes químicos da madeira (STANGERLIN et al., 2013).

Os fitopatógenos causadores de podridão-parda, como as espécies *Lentinus lepideus* (Fr.) Fr. e *Gloeophyllum trabeum* (Pers.: Fr) Murrill deterioram os polissacarídeos da parede celular, mantendo a lignina residual intacta, além de manter a estrutura original da madeira enquanto o material se encontra no estado úmido (OLIVEIRA, 1986). Entretanto, quando ele seca, a estrutura mantida pela lamela média (lignina) sofre colapso com facilidade, separando-se em blocos pelo desenvolvimento de fissuras paralelas e perpendiculares à direção da grã da madeira (MORESCHI, 2011). Nas espécies de coníferas, durante os estágios iniciais de ataque, as hifas concentram-se nos raios. Entretanto, nas espécies folhosas, a distribuição inicial das hifas é mais uniforme, sendo que em algumas espécies a colonização pelos vasos é maior em reação ao ataque nos raios (OLIVEIRA et al., 1986).

Já os fungos causadores de podridão-branca, como as espécies *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat. e *Trametes versicolor* (L.: Fr) Pilát, ocasionam redução progressiva no peso e no volume da madeira, afetando as propriedades do material (ROWELL et al., 2005). Esta classe de fitopatógenos ataca, indistintamente, tanto os polissacarídeos quanto a lignina, proporcionando à madeira um aspecto mais claro (ZABEL; MORRELL, 1992). Santini (1988) observou que a podridão-branca causa a perda do aspecto lustroso e da cor natural da madeira, tornando-a esbranquiçada. Este fato é associado à destruição dos pigmentos, ocasionada pelo ataque dos fungos.

Em relação à degradação fúngica da madeira, esta inicia pela penetração da hifa pelo lúmen da célula vegetal, por meio de uma intensa secreção de metabólitos extracelulares, principalmente enzimas, desenvolvida pelo fungo. Enquanto isso, as enzimas trabalham sinergicamente, clivando pontes de hidrogênio e ligações covalentes dos polímeros vegetais de sustentação. Esta clivagem resulta em monômeros de glicose que podem ser digeridos pelas hifas, gerando energia para que elas consigam penetrar na membrana plasmática da célula vegetal e adentrar no metabolismo intracelular (OLIVEIRA et al., 2005; CARVALHO et al., 2009).

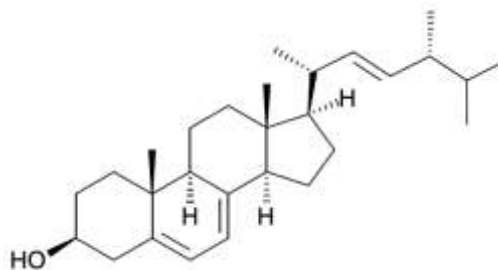
Neste sentido, a membrana plasmática desempenha um papel vital na manutenção de um ambiente homeostático, troca de materiais e transferência de energia e informação na célula para manter as células saudáveis e vivas. Por este

motivo, destruir a membrana plasmática do fungo é um dos principais alvos antifúngicos dos OEs, sendo que na membrana celular fúngica, o ergosterol é o principal componente esteroidal, sendo responsável por manter tanto a função quanto a integridade das células. Neste contexto, a interrupção das vias biossintéticas de esteróis por substâncias naturais ou sintéticas provou suprimir o crescimento de fungos como *Candida* spp., *Aspergillus* spp. e espécies de dermatófitos, bem como em fungos basidiomicetos causadores de podridão na madeira (NIEMENMAA; GALKIN; HATAKKA, 2008; PINTO et al., 2009; HU et al., 2017).

1.2.6 Ergosterol

O ergosterol (C₂₈H₄₄O, Figura 3) ocorre especificamente em fungos, sendo o principal componente esteroidal na membrana celular. Desempenha um papel fundamental na manutenção da rigidez da membrana e no crescimento celular, colaborando para manter a função e integridade das células fúngicas (Figura 4). Adicionalmente, o ergosterol é responsável por controlar a fluidez, simetria, bem como por contribuir para o bom funcionamento das enzimas ligadas à membrana (RODRIGUEZ et al., 1985; BARRETT-BEE; DIXON, 1994; LUPETTI et al., 2002; HU et al., 2017).

Figura 3 – Fórmula estrutural do ergosterol.

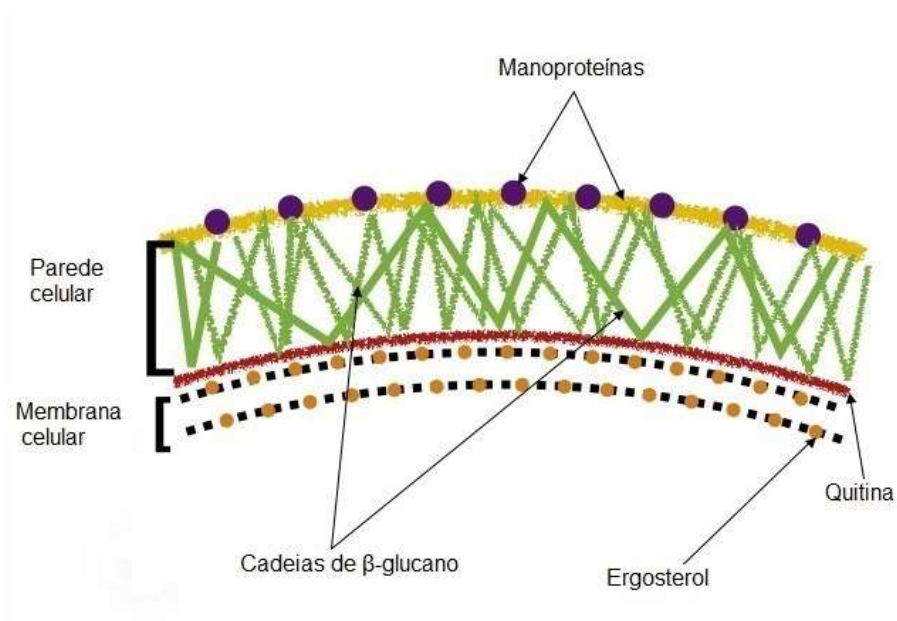


Fonte: O autor.

Uma vez que o ergosterol é o principal esterol presente na membrana de fungos, sua determinação tem sido utilizada como indicador de biomassa fúngica. Adicionalmente, o conteúdo de ergosterol micelial pode variar de acordo com a espécie e com fatores como temperatura, oxigênio, taxa de crescimento,

disponibilidade de carbono e nutrientes, dentre outros. O ergosterol estabelece também a permeabilidade da membrana celular fúngica, além de ser um alvo útil para as substâncias antifúngicas (NIEMENMAA et al., 2008; PIRGOZLIEV et al., 2008; SCHEIDER et al., 2009).

Figura 4 – Representação esquemática da localização do ergosterol na membrana celular fúngica.



Fonte: Mushroom Table (adaptado).

Um estudo realizado por Kelly et al. (1995), afirma que o mecanismo de ação primária pelo qual os fármacos antifúngicos azólicos inibem o crescimento de *Saccharomyces cerevisiae*, é a interrupção das vias biossintéticas normais dos esteroides, resultando em uma diminuição da biossíntese de ergosterol. Adicionalmente, vários estudos têm demonstrado que os OEs podem causar uma redução considerável na quantidade de ergosterol em espécies fúngicas como *Fusarium verticillioides*, *Candida* spp., *Aspergillus* spp. e diferentes espécies de dermatófitos (PINTO et al., 2009; TIAN et al., 2012; HU et al., 2017; AVANÇO et al., 2017).

1.3 PROPOSIÇÃO

Esta dissertação teve como objetivo geral avaliar o potencial do OE de *N. grandiflora* para a geração de produtos úteis em cultivos *in vitro* de espécies florestais e para a preservação da madeira.

Para tanto, teve-se como objetivos específicos:

- Verificar o potencial do OE de *N. grandiflora* para o controle de contaminantes e da oxidação fenólica em cultivos *in vitro* da espécie *E. involucrata*;
- Verificar o potencial do OE de *N. grandiflora* como bioestimulante no desenvolvimento e no estabelecimento dos explantes da espécie *E. involucrata*;
- Investigar a atividade antifúngica do OE e de seu composto majoritário deidrofuquinona frente aos fungos de podridão-branca *G. applanatum* e *T. versicolor*, bem como contra os fungos de podridão-parda *L. lepideus* e *G. trabeum*;
- Verificar se o OE e seu constituinte majoritário interferem no conteúdo de ergosterol na membrana fúngica dos fungos supracitados.

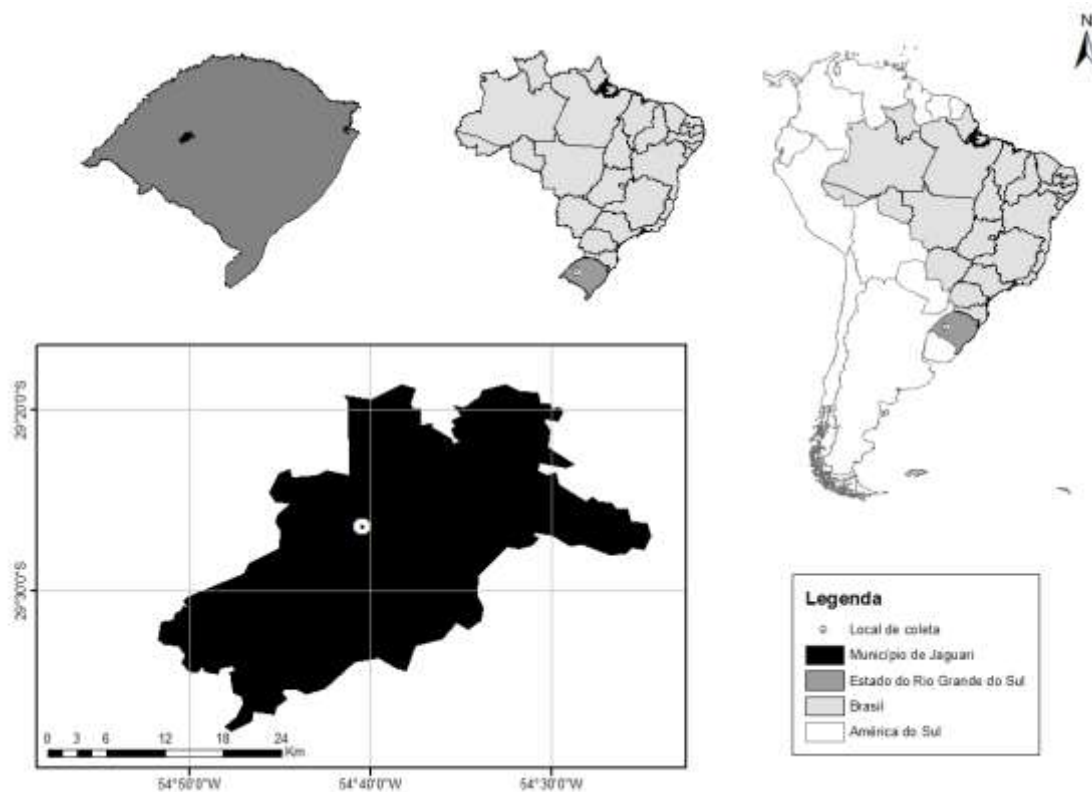
1.4 MATERIAL E MÉTODOS

1.4.1 Extração e análise química do óleo essencial

1.4.1.1 Coleta do material vegetal

O material vegetal de *N. grandiflora* foi coletado nos meses de janeiro e novembro de 2016. A coleta foi realizada em um fragmento da Floresta Estacional Decidual (IBGE, 1992), localizado na área Rural de Fontana Freda, no município de Jaguari – RS.

Figura 5 - Caracterização da área de coleta do material vegetal.



Fonte: O autor.

1.4.1.2 Extração do óleo essencial

Para a obtenção do OE, folhas frescas fracionadas foram submetidas à hidrodestilação, utilizando-se o aparelho Clevenger modificado (SARTOR, 2009) acoplado a um balão de fundo redondo, com capacidade para 5 L, durante 3 h (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). As extrações foram realizadas em triplicata, com aproximadamente 500 g de folhas frescas em cada repetição, no Laboratório de Extrativos Vegetais (LABEVE), da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

Posteriormente, calculou-se o rendimento do OE em relação ao peso seco de material vegetal extraído (% m m⁻¹) e sua densidade (g mL⁻¹). O OE foi armazenado em frascos de vidro âmbar, vedados e conservados à - 4 °C até a realização da análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), do seu fracionamento para a obtenção do componente majoritário isolado e da realização dos ensaios biológicos.

1.4.1.3 Análise da composição química

A composição química do OE foi determinada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM). Foi utilizado um sistema hifenado AGILENT 7890A, equipado com um detector seletivo de massas série 5975C (CG-EM). Uma alíquota de 2 μ L de OE foi diluída em 1 mL de hexano (grau HPLC). Para as análises, utilizou-se uma 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). Em relação aos parâmetros, a energia de ionização foi de 70 eV, a divisão de fluxo 1:100 e o programa de temperatura foi o seguinte: 40 °C durante 4 min; 40-320 °C a 4 °C min⁻¹. O gás carreador foi o hélio, com taxa de fluxo de 1 mL min⁻¹. A temperatura configurada para injetor e detector foi de 250 °C. A identificação dos constituintes ocorreu por comparação dos seus índices de retenção, determinados por uma curva de calibração de n-alcenos injetados sob as mesmas condições cromatográficas das amostras, e dos padrões de fragmentação de massas com os mencionados na literatura (NIST, 2010; ADAMS, 2009).

Os componentes químicos dos OEs foram quantificados por cromatografia gasosa com detecção por ionização em chama (CG/DIC) num equipamento Agilent 7890A. Os parâmetros das análises corresponderam aos descritos anteriormente, com exceção dos seguintes: injeção com divisão de fluxo de 1:50; Temperatura do injetor e detector: 300 °C. A determinação da percentagem dos componentes químicos ocorreu com base na normalização de área dos picos.

1.4.2 Fracionamento do óleo essencial

O fracionamento do OE de folhas de *N. grandiflora* foi realizado por quatro colunas cromatográficas (CC), realizadas em sequência. Na primeira, 9 g do OE foi adicionado em CC (7,5 x 65 cm) contendo 600,78 g de gel de sílica 60 (Macherey-Nagel, 70-230 mesh) e eluída com hexano-acetona (90:10 v/v), a um fluxo médio de 50 gotas min⁻¹ (1,25 mL min⁻¹). Foram coletadas frações de 100 mL, que foram reunidas em seis grupos principais, com base no perfil em cromatografia em camada delgada (CCD) e concentradas sob pressão reduzida, a 40 °C. A CCD foi realizada em cromatoplasmas de gel de sílica 60 F₂₅₄ e as manchas foram detectadas por meio da vanilina sulfúrica - UV 365 nm.

A fração 4 (1,02 g) foi submetida a uma segunda CC (2,41 x 55,7 cm) contendo 95 g de gel de sílica 60 impregnada com AgNO_3 (WILLIAMS; MANDER 2001) a 10 %, eluída com hexano-acetona (97:3 v/v), a um fluxo médio de 20 gotas min^{-1} (0,55 mL min^{-1}). Foram coletadas frações de 10 mL, que foram reunidas em 9 grupos principais, com base no perfil de CCD. Uma terceira CC (4,4 x 39,3 cm) foi realizada com a fração 4 da primeira coluna (1,89 g), contendo 140 g de gel de sílica impregnada com AgNO_3 a 10%, eluída com hexano-acetona (95:5 v/v), a um fluxo médio de 35 gotas min^{-1} (0,87 mL min^{-1}). Foram coletadas frações de 17 mL, que foram reunidas em 9 grupos principais, com base no perfil de CCD.

As frações 3 (0,0804) e 4 (0,2187) da segunda coluna e a fração 2 (0,5346 g) da terceira coluna foram agrupadas (0,8337 g) e submetidas a quarta e última CC (2,4 x 50,2 cm). Esta continha 77 g de gel de sílica 60 e foi eluída com hexano-éter etílico (93:3 v/v), cuja polaridade foi elevada gradativamente a partir da fração 57, até atingir a proporção 93:7 v/v. Foram coletadas frações de 5 mL, a um fluxo médio de 20 gotas min^{-1} (0,5 mL min^{-1}), resultando em 11 frações principais, sendo que a fração 8 (0,6204 g) correspondeu à DHF, conforme descrito por Silva (2017).

1.4.3 Micropropagação

1.4.3.1 Coleta dos explantes

Espécimes de *E. involucrata* cultivados em casa de vegetação, com aproximadamente 9 anos de idade e 1,5 m de altura foram utilizados como doadores de explantes. As plantas receberam irrigações diárias e foram fertilizadas semanalmente com 400 mL de solução de nitrogênio, fósforo e potássio (N-P-K: 5-20-20), a 1,5 g L^{-1} e, quinzenalmente, com 400 mL de solução a 1 g mL^{-1} de nitrogênio (ureia). Semanalmente e no dia anterior à coleta dos explantes, as plantas foram pulverizadas com solução à base de Orthocide500PM® (N-(triclorometiltio)ciclohex-4-eno-1,2-dicarboximida) a 1,5 g L^{-1} e Sulfato de Estreptomicina a 0,1 g L^{-1} , até seu encharcamento total. Este processo foi realizado para auxiliar na desinfestação dos explantes, conforme metodologia descrita por Stefanel (2016).

Como explantes, foram utilizados segmentos nodais de aproximadamente 3 cm de comprimento, que não apresentavam ramo extremamente lenhoso. Destes, o segmento apical caulinar foi excluído, para reduzir a variação entre os explantes.

Descartou-se também aproximadamente 2/3 da área foliar de cada folha presente nos segmentos nodais. Durante a coleta, as brotações foram imersas em uma solução de água destilada contendo 1,5 g L⁻¹ de Orthocide500PM® e 1 g L⁻¹ de ácido ascórbico, para realizar uma pré-desinfestação das brotações e diminuir a ocorrência de oxidação fenólica nos explantes, respectivamente, conforme descrito por Golle (2013).

Em seguida, as brotações foram lavadas com detergente comercial e água corrente, seguida por dois enxagues com água destilada. Para aprimorar a assepsia dos segmentos nodais, estes foram imersos em solução de hipoclorito de cálcio [Ca(ClO₂)] a 3% seguida pela imersão em solução de hipoclorito de sódio (NaClO) a 3%, ambos por 15 minutos, conforme descrito por Stefanel (2016).

1.4.3.2 Meio de cultura

O meio nutritivo utilizado nos experimentos foi o MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), com a concentração de sais reduzida à metade (½ MS), acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose, 0,05 g L⁻¹ de mio-inositol, 7 g L⁻¹ de ágar e 1 g L⁻¹ de polivinilpirrolidona (PVP). O pH da solução foi ajustado para 5,7 antes que ocorresse a solidificação com ágar. Em seguida, o meio nutritivo foi autoclavado a 121°C e 1 atm, durante 15 min, conforme estudos de otimização realizados por Stefanel (2016).

1.4.3.3 Controle dos agentes contaminantes, da oxidação fenólica e estimulação do desenvolvimento e estabelecimento dos explantes

Com o intuito de avaliar o potencial do OE de *N. grandiflora* para estimular o desenvolvimento e estabelecimento dos explantes e controlar os agentes contaminantes e a oxidação fenólica, adicionou-se alíquotas do extrativo ao meio de cultura nas concentrações 0,1, 0,5, 1,0 e 3 µL mL⁻¹. O OE foi previamente diluído em etanol na proporção 1:1, para melhorar a diluição do mesmo ao meio. O controle positivo foi composto apenas pelo meio de cultura, enquanto que o controle negativo, por meio de cultura e etanol, na maior concentração utilizada como diluente.

Entretanto, as concentrações supracitadas impediram que o explante se estabelecesse com excelência ao meio de cultura (ver resultados do manuscrito 1). Então, novos testes foram realizados com as concentrações 0,05, 0,075, 0,1, 0,125, 0,15, 0,175 e 0,2 µL mL⁻¹ de OE diluído no meio de cultura.

A unidade experimental foi composta por um frasco com capacidade de 150 mL, contendo 20 mL de meio nutritivo e três explantes. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em arranjo unifatorial, com cinco repetições contendo três explantes cada, totalizando 30 frascos e 90 explantes no primeiro experimento. No segundo experimento, utilizou-se 45 frascos e 135 explantes foram introduzidos.

Em câmara de fluxo laminar, os explantes submetidos à assepsia inicial foram mantidos em frascos com água destilada e autoclavada até serem inoculados no meio de cultura. Para a introdução *in vitro*, resquícios foliares foram removidos e selecionou-se segmentos com 0,3 cm acima da região nodal e 0,8 cm abaixo desta. O corte da parte basal foi realizado em bisel, visando aumentar a superfície de contato com o meio nutritivo e facilitar sua introdução. Cada explante continha duas gemas axilares dormentes. Os frascos foram vedados com papel alumínio e as culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura controlada de 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 16 h e intensidade luminosa de $20 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, obtida por meio de lâmpadas fluorescentes brancas frias tipo luz do dia.

1.4.3.4 Avaliação

Após 30 dias de cultivo *in vitro*, foram avaliadas as variáveis sobrevivência (indicada pela coloração verde do explante), estabelecimento (determinado pelo desenvolvimento de primórdios foliares no explante), contaminação bacteriana (presença de colônias bacterianas junto aos explantes e/ou no meio nutritivo), contaminação fúngica (presença de micélio de fungos junto aos explantes e/ou no meio nutritivo), oxidação fenólica (escurecimento dos explantes, mesmo quando o aspecto oxidativo não inibiu seu desenvolvimento) e número de folhas formadas em cada explante. Todas as variáveis foram expressas em porcentagem, exceto o número de folhas formadas.

1.4.3.5 Análise estatística

Após testar a normalidade dos erros por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov, as médias foram transformadas, pela função $\sqrt{x + 0,5}$, sendo x o valor observado. As

variáveis foram submetidas à análise de variância e, quando o valor de F foi significativo, foi utilizado para a comparação das médias, o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. Para isso, foi utilizado o programa estatístico Sisvar (Sistema para Análise de Variância) para Windows® versão 5.1 (FERREIRA, 2011).

1.4.4 Atividade antifúngica e mecanismo de ação

1.4.4.1 Cultivo dos fungos apodrecedores

Foram selecionadas duas espécies de fungos causadores de podridão-branca e duas de podridão-parda para a elaboração deste trabalho, conforme a disponibilidade do fornecedor. As cepas de *G. applanatum*, *T. versicolor*, *G. trabeum* e *L. lepideus* foram cedidas pelo Laboratório de Produtos Florestais, do Serviço Florestal Brasileiro. Os testes de inibição do crescimento micelial dos fungos apodrecedores da madeira foram realizados no Laboratório de Fitopatologia, do Departamento de Defesa Fitossanitária (CCR/UFSM). Os inóculos dos fungos utilizados nos experimentos 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 câmara de fluxo laminar, alíquotas do OE de *N. grandiflora* foram incorporadas ao meio de cultura autoclavado, composto por BDA. As concentrações de OE avaliadas foram 0,5, 1,0 e 2,0 $\mu\text{L mL}^{-1}$, enquanto que o constituinte majoritário do OE (DHF) foi testado a uma concentração de 0,0971 $\mu\text{L mL}^{-1}$, equivalente à detectada em 0,5 $\mu\text{L mL}^{-1}$ OE. Os extrativos foram diluídos previamente em etanol, visando melhorar sua homogeneização ao meio de cultura. Posteriormente, o meio suplementado foi vertido em placas de Petri (9,0 cm de diâmetro) esterilizadas.

Para o controle negativo, utilizou-se apenas placas contendo BDA e etanol, enquanto que o controle positivo foi composto por BDA enriquecido com o fungicida comercial Propiconazole®, a uma concentração de 1,0 $\mu\text{L mL}^{-1}$. Já a testemunha foi composta por placas contendo apenas meio de cultura. Após a solidificação do meio, discos de 12 mm contendo micélio de cada um dos fungos isolados, foram transferidos para o centro das placas. Estas foram incubadas em câmara BOD com temperatura controlada de 25 ± 3 °C, com fotoperíodo programado em claro/escuro (12 h / 12 h).

Todos os experimentos foram realizados com três repetições, de duas unidades experimentais cada.

A avaliação do experimento iniciou após 24 h, por meio de medições do diâmetro das colônias (média de duas medidas diametralmente opostas) realizadas a cada dois dias, até as colônias fúngicas dos tratamentos controle atingirem todo o diâmetro da placa (aproximadamente sete dias). 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 através da fórmula: $Inibição (\%) = [(CT - Ct) * 100] / CT$, onde CT e Ct correspondem ao crescimento micelial na testemunha e no tratamento, respectivamente (BADAWY; ABDELGALEIL, 2014).

1.4.4.2 Efeito do OE sobre o conteúdo de ergosterol da membrana fúngica

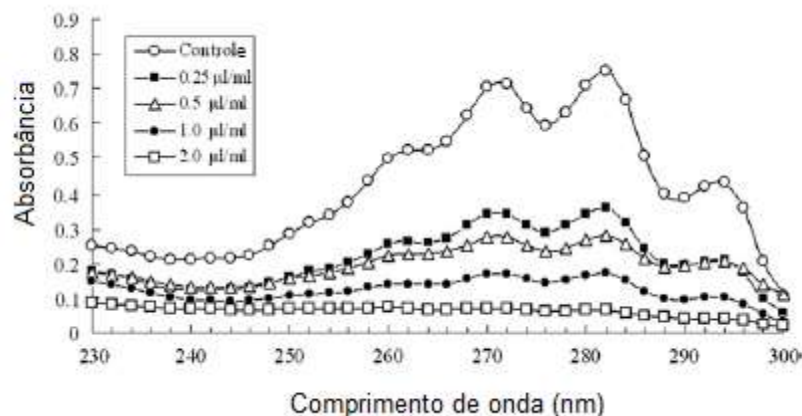
Para a avaliação do conteúdo de ergosterol, os testes foram realizados frente aos fungos de podridão-branca *G. applanatum* e *T. versicolor* e com os fungos de podridão-parda *L. lepideus* e *G. trabeum*. O cultivo das cepas fúngicas foi realizado conforme a metodologia descrita no tópico 1.4.4.1. Com o intuito de facilitar a remoção do micélio fúngico, discos de papel celofane esterilizados foram dispostos sobre o BDA, suplementado com $0,5 \mu\text{L mL}^{-1}$ de OE de *N. grandiflora* e $0,0971 \mu\text{L mL}^{-1}$ do constituinte majoritário, equivalente à detectada em $0,5 \mu\text{L mL}^{-1}$, testados separadamente. Os extrativos foram diluídos previamente em etanol. Sobre o papel celofane, discos contendo o micélio de cada um dos fungos foram transferidos para o centro das placas, que foram vedadas e incubadas por um período de 3 a 4 dias, nas mesmas condições mencionadas anteriormente. Todos os experimentos foram realizados em três repetições.

Após o período de incubação, o micélio de cada placa foi removido do meio de cultura e acondicionado em tubos de ensaio. Na sequência, determinou-se o peso úmido do micélio das diferentes cepas e adicionou-se 5 mL de uma solução de hidróxido de potássio alcoólico a 25%, preparada no dia do experimento. Para homogeneizar a solução contendo o micélio, os tubos foram agitados em um aparelho Vórtex por um período de 5 minutos, seguido por agitação em banho de ultrassom,

onde permaneceram por 5 minutos adicionais. Posteriormente, os tubos foram incubados em banho d'água a 85 °C por 4 horas.

Os esteróis foram extraídos de cada amostra por adição de uma mistura de 2 mL de água destilada e autoclavada e 5 mL de n-heptano ao tubo, seguido de agitação em sonificador por 1 minuto. Após o conteúdo de cada tubo foi transferido para funil de separação e mantido em temperatura ambiente por 1 hora, para que ocorresse a separação das duas fases (heptânica e aquosa). A camada de n-heptano foi coletada e analisada por espectrofotometria entre 230 e 300 nm. A presença de ergosterol e do esterol intermediário 24 (28) dehidroergosterol na fase heptânica resultaram em uma curva caracterizada pela presença de quatro máximos de absorção. A ausência de ergosterol nas amostras foi indicada por uma linha plana (Figura 6).

Figura 6 – Perfis de absorbância no ultravioleta de derivados esteroidais da membrana de *Aspergillus flavus* em presença e ausência do óleo essencial de *Cinnamomum jensenianum* Hand.-Mazz.



Fonte: Tian et al. 2012 (adaptado).

A quantidade de ergosterol presente nas amostras foi calculada considerando-se a porcentagem do peso úmido de cada micélio, por meio das fórmulas abaixo, de acordo com Tian et al. (2012):

$$\% \text{ ergosterol} + 24 (28)\text{dehidroergosterol} = \frac{\left(\frac{A_{282}}{290}\right)}{\text{peso do micélio}}$$

$$\% \text{ 24 (28)dehidroergosterol} = \frac{\left(\frac{A_{230}}{518}\right)}{\text{peso do micélio}}$$

Onde:

290: valor de E (%/cm) determinado para o ergosterol cristalino;

518: valor de E (%/cm) determinado para 24(28) dehidroergosterol

Peso do micélio: considerado peso úmido (g) do micélio de cada placa

A redução percentual na quantidade de ergosterol foi calculada pela fórmula, de acordo com Kedia et al. (2014):

$$\frac{(C - T)}{C} \times 100$$

Onde:

C: percentual de ergosterol no controle

T: percentual de ergosterol no tratamento avaliado.

2 MANUSCRITO 1 – Essential oil of *Nectandra grandiflora* Nees & Mart. ex Nees increases the number of leaves in explants in the of *Eugenia involucrata* De Candolle

Nadia Helena Bianchini^a; Charlene Stefanel Moro^a; Alana Silveira Pavlack^b; Lia Rejane Silveira Reiniger^{a,c}; Berta Maria Heinzmann^{a,d*}

^a Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, BR. CEP 97105-900, Brasil

^b Curso de Graduação em Engenharia Florestal, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, BR. CEP 97105-900, Brasil

^c Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, BR. CEP 97105-900, Brasil

^d Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, BR. CEP 97105-900, Brasil

*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, Telefone: +55 55 3220 9674, Fax: +55 55 3220 8336.

Essential oil of *Nectandra grandiflora* Nees & Mart. ex Nees increases the number of leaves in explants in the micropropagation of *Eugenia involucrata* De Candolle

ABSTRACT

The present study aimed to evaluate the potential of *Nectandra grandiflora* Nees & Mart. ex Nees essential oil (EO) to act as a biostimulant in *Eugenia involucrata* De Candolle explants cultured *in vitro*, as well as control the emergence of microorganisms and phenolic oxidation that prevent the explants establishment of this native species. For this, aliquots of *N. grandiflora* EO, previously diluted in ethanol, were added to the ½ MS medium at 0.00, 0.05, 0.075, 0.100, 0.125, 0.150, 0.175 e 0.200 $\mu\text{L mL}^{-1}$. As donors of explants matrices of *E. involucrata*, individuals grown under greenhouse conditions, of approximately 9 years old, were used. Conversely, as explants, nodal segments without an extremely woody branch were chosen and from these, the apical segment was excluded to reduce the variation between them. After 30 days of *in vitro* cultivation, the variables survival, establishment, bacterial contamination, fungal contamination, phenolic oxidation and number of leaves formed in each explant were evaluated. The results shown that, despite not having inhibited the emergence of microorganisms and did not influence the phenolic oxidation, the EO at 0.075 $\mu\text{L mL}^{-1}$ allowed the establishment of 86.66% of the assessed explants, not differing statistically from the controls. Additionally, the explants emitted a greater leaves number when exposed to the extractive at this concentration ($P < 0.05$). These results indicate that *N. grandiflora* EO may have a potential to act as a biostimulant in explants of *E. involucrata*.

Keywords: Sesquiterpenoids. Growth regulators. Hormesis. Plant tissue culture.

1 INTRODUCTION

In recent years, the forest resources have been considered an important source of research aimed at the generation of products with high added value and, therefore, efforts are being concentrated to find strategies to foment the conservation of native flora. In this context, the micropropagation technique has grown in importance for the forest area in the last years due to its advantages in producing seedlings with high genetic, physiological and sanitary standards (BASSAN, 2006; XAVIER et al., 2009).

However, to obtain an efficient protocol of micropropagation, it is necessary to add to the culture medium growth regulators. Once establishment difficulties can be circumvented with the addition of cytokinins and gibberellins, which act to increase cell division, in cell elongation and in the plasticity of the cuticle (WACHOWICZ; CARVALHO, 2002; VALENT BIOSCIENCES, 2017), stimulating the explant development. On the other hand, the rooting of regenerated aerial parts is often difficult

(ASSIS; TEIXEIRA, 1998), the medium should be supplemented with auxins as rhizogenesis promoters (SOUZA et al., 2010).

The *in vitro* establishment of woody species is also accompanied by mishaps as phenolic oxidation (ANDRADE; LUZ; LACERDA, 2000; SATO et al., 2001), characterized by the brown coloring of cultures. Oxidation is caused by enzymes which oxidize phenols to form quinones and lead to growth inhibition and explants death in many species (MONACO et al., 1977). To minimize oxidation, antioxidant products are often added to the nutritive medium (AMARAL et al., 1997).

Additionally, the microbial contamination is also a frequent obstacle to *in vitro* culture of some species (ERIG; SCHUCH, 2003; BASSAN et al., 2006). While a share of contaminated cultures could arise from inadequate surface sterilization or laxity in aseptic practices, endophytes that are internal tissue colonizers could contaminate *in vitro* cultures when they cross through surface-sterilized tissues (HERMAN, 2004; ORLIKOWSKA et al., 2016). Although most of these microorganisms are not pathogenic, their growth is accelerated in the culture medium about to compete for nutrients with the explants, hindering their development (XAVIER et al., 2009).

Within this context, substances with germicidal, antibiotic or antioxidant action have been used during *in vitro* culture (MORAIS et al., 2012). In addition, the nutritive medium supplementation with biostimulants (CASTRO; VIEIRA, 2001) and/ or growth regulators (CALDAS et al., 1998) by adding auxins, cytokinins and/ or gibberellins (SOUZA et al., 2010), increasing the production costs of seedlings with high genetic homogeneity and sanitary quality (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

In order to overcome the problems in establishing *in vitro* cultures of native woody species, plant secondary metabolites as essential oils (EOs) appear as an alternative that can lead to a decrease in the production costs of seedlings. Essential oils perform different functions in plants as protection against pathogens (bacteria, fungi and viruses) and to overcome oxidative stress, signaling between plant organs of the same species (UNSICKER et al., 2009), among others. Additionally, they are less toxic to humans and less environmentally hazardous compared to synthetic products (PARK et al., 2006; SATISH et al., 2007).

In studies aimed the *in vitro* propagation of the native woody species *Eugenia involucrata* de Candolle (Myrtaceae), the mishaps in the explants establishment are mainly due to the occurrence of phenolic oxidation and endogenous contaminations (GOLLE et al., 2013; STEFANEL, 2016). This arboreal species grows in areas of Rio

Grande do Sul State, in other Brazilian states and other countries of South America. Due to the quality and durability, its wood is obtained by forestry (RODRIGUES; CARVALHO, 2001) and is used in building-civil, production of agricultural tools, firewood and charcoal production (SANCHOTENE, 1989; MARCUZZO, 1998; BACKES; IRGANG, 2002; LORENZI, 2008; CARVALHO, 2008). In addition, medicinal properties related to this species have already been described, besides being known for the taste of its fruits (RODRIGUES; CARVALHO, 2001).

Considering the biological activities already described for EO of *Nectandra grandiflora* leaves (CUNICO et al., 2010; SILVA et al., 2016), it appears as an alternative for *in vitro* contaminants and/ or phenolic oxidation control. Besides, it can stimulate the establishment of *E. involucrata* explants, since its major constituents are sesquiterpenoids (SILVA, 2016), which present structural similarity with the gibberellins, chemically classified as diterpenoids (TAIZ; ZEIGER 2004; SPATZ; GRAY 2008).

In view of the economic and ecological importance of *E. involucrata* and the problems detected in previous attempts for its *in vitro* micropropagation, the present study aimed to evaluate *N. grandiflora* EO potential to favor the establishment and development of *E. involucrata* explants and/ or to control *in vitro* contaminants and phenolic oxidation during micropropagation.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Plant material for essential oil extraction

Leaves of *N. grandiflora* were collected from native population in Southern Brazil, located in Jaguari, Rio Grande do Sul State, during the summer. The plant material was identified by the Forest Engineer Dr. Solon Jonas Longhi and voucher specimen is deposited at the Herbarium of the Forest Sciences Department, Federal University of Santa Maria, Brazil (SMDB 13.162).

2.2. Essential oil extraction and chemical analysis

The EO was obtained from fresh leaves by a three-hour hydrodistillation, using a Clevenger-type apparatus (EUROPEAN PHARMACOPEIA, 2007), in triplicate. The

yield determination was performed considering weight/volume (w/v). For chemical analysis, EO was diluted in hexane (2:1000; v/v) and injected in split mode (1:50) in gas chromatograph (GC).

The chemical composition was analyzed by 7890A GC (Agilent Tech.) equipped with a 5975C mass selective detector (GC–MS). A capillary column of fused silica Durabond-DB5 (30 m x 0.25 mm i.d. x 0.25 µm film thickness) was used to separate constituents. The injector and detector temperature were set at 220°C and 250 °C, respectively. Helium was used as carrier gas at a flow rate of 1 mL/min and the following program was chosen: oven temperature was kept at 40 °C for 4 min, and then gradually raised to 320 °C at 4 °C/min.

The compounds identification was based on the comparison of retention indices calculated by linear interpolation relative to retention times of a series of *n*-alkanes (C₇-C₃₁), and their mass spectra with authentic samples and with data taken from the literature (ADAMS, 2009), or with mass spectra recorded in the database NIST 62 and NIST 12 (National Institute of Technology and Standards). Relative amounts of the components were calculated based on GC peak areas, by means of gas chromatography coupled to a flame ionization detector (GC-FID). Analysis parameters were the same as mentioned above, with exception of split ratio (1:50) and both injector and detector temperatures (300 °C).

2.3 Explants

As donors of explants matrices of *E. involucrata*, individuals grown under greenhouse conditions, of approximately 9 years old were used. For the superficial disinfestation of the matrices, the methodology described by Stefanel (2016) was used. As explants, nodal segments without an extremely woody branch were chosen and from these, the apical segment was excluded to reduce the variation between them. During the collection, the shoots were immersed in a solution of distilled water containing 1.5 g L⁻¹ of Orthocide 500 PM® and 1 g L⁻¹ of ascorbic acid, to perform a pre-disinfestation of the shoots and to diminish the occurrence of phenolic oxidation in the explants, respectively (GOLLE, 2010).

The shoots were then washed with commercial detergent and running water, followed by two rinses with distilled water. To improve the asepsis of nodal segments, these were immersed in calcium hypochlorite solution [Ca(ClO₂)] 3% (v/v), followed by

immersion in sodium hypochlorite solution (NaClO) 3% (v/v), both for 15 minutes (STEFANEL, 2016). The nutritive medium used in the experiments was the MS medium (MURASHIGE, SKOOG, 1962) with the concentration of salts reduced to one half ($\frac{1}{2}$ MS). The nutritive medium was autoclaved at 121 °C at 1 atm for 15 min (STEFANEL, 2016).

2.4 *Inoculation of explants and contaminating micro-organisms*

To evaluate the potential of *N. grandiflora* EO to stimulate the establishment and development of explants and/ or to control phenolic oxidation and/ or contamination, a pilot test was performed to define the concentrations to be used. Extractive aliquots previously diluted in ethanol (1:1) (v/v), to improve the dilution of the EO in the culture medium, were added to the medium at final concentrations of 0.1, 0.5, 1.0 e 3 $\mu\text{L mL}^{-1}$. The positive control was composed only by the nutritive medium, while the negative control, by medium and ethanol, at the highest concentration used to dilute EO samples. However, the concentrations above prevented the optimal explant establishment in the nutritive medium (see results). Then, new experiments were performed with the concentrations of 0.05, 0.075, 0.1, 0.125, 0.15, 0.175 and 0.2 $\mu\text{L mL}^{-1}$ of EO diluted in ethanol and then in the nutritive medium, under the same conditions.

In laminar flow chamber, foliar remnants were removed from explants and segments 0.3 cm above the nodal region, and 0.8 cm below it was selected. Each explant contained two dormant axillary buds. The vials were sealed, and the cultures were kept in a growth room with controlled temperature of 25 ± 2 °C, photoperiod of 16 h and luminous intensity of $20 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, obtained by white cold fluorescent lamps daylight type. The experiment was conducted in a completely randomized design, in a unifactorial arrangement, with 5 replicates containing 3 explants each one.

2.5 *Evaluation*

After 30 days of *in vitro* culture, the variables survival (Indicated by the green coloration of the explant), establishment (determined by the development of leaf primordia in the explant), bacterial contamination (presence of bacterial colonies near the explants and / or in the nutrient medium), fungal contamination (presence of fungal

mycelia next to the explants and / or in the nutritive medium), phenolic oxidation (darkening of the explants, even when the oxidative aspect does not inhibit its development) and number of leaves formed in each explant were evaluated. All variables were expressed as percentage, except for the number of leaves formed.

2.6 Statistical analysis

After testing the normality of errors through Kolmogorov-Smirnov test, the means were transformed by the function $\sqrt{x + 0,5}$, where x was the observed value. The variables were submitted to analysis of variance and, when the F value was significant, Tukey's test for comparison of mean at $p < 0.05$ was used. For this, the statistical program Sisvar 5.1 was employed (FERREIRA, 2011).

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Yield and chemical composition of essential oil

The EO extraction of *N. grandiflora* leaves showed a yield of 0.4302 (± 0.026) %, and density of 0.9116 (± 0.008) g mL⁻¹. The EO chemical analysis allowed the identification of 71.83% of the total composition (Table 1).

Table 1 - Chemical composition of essential oil extracted from *Nectandra grandiflora* Nees fresh leaves.

Peak	RT	Compound	KI _c	KI _t	%
1	11.08	α -Pinene	931	933 ^N	1.31
2	12.90	β -Pinene	975	978 ^N	1.11
3	15.04	Limonene	1027	1025 ^N	0.05
4	15.38	β -Z-Ocimene	1036	1033 ^N	0.43
5	15.79	β -E-Ocimene	1046	1045 ^N	2.16
6	17.90	Linalool	1098	1099 ^N	0.53
7	21.16	Z-3-Hexenyl butyrate	1184	1184 ^N	0.38
8	28.23	β -Elemene	1388	1390 ^N	0.33
9	29.20	Aromadendrene	1418	1419 ^N	0.43
10	30.34	α -Caryophyllene	1454	1454 ^N	0.27
11	30.79	α -Muurolene	1469	1473 ^A	2.99
12	30.89	Allo-aromadendrene	1476	1477 ^A	0.42
13	31.02	Amorpha-4,7(11)-diene	1479	1481 ^N	1.11

(to be continue)

Peak	RT	Compound	KI _c	KI _t	%
14	31.34	Valencene	1486	1477 ^N	0.50
15	31.49	Eremophilene	1491	1486 ^N	4.32
16	31.58	Bicyclogermacrene	1494	1489 ^A	1.16
17	34.00	Spathulenol	1575	1500 ^N	2.30
18	35.56	Eremoligenol	1627	1576 ^A	1.10
19	36.25	Dehydrofukinone epoxide	1653	-	8.69
20	36.35	Selin-11-en-4- α -ol	1656	1659 ^A	4.71
21	40.27	(+)-Dehydrofukinone	1800	1807*	23.34
22	40.52	Eremophilan-11-en-10-ol	1810	-	4.08
23	43.54	Rimuene	1929	1925 ^N	4.53
24	46.25	Kaurene	2042	2043 ^N	5.58
Total percentage of identification					71.83

Compounds are listed in order of elution on DB5 column. RT: Retention time; KI_c: calculated Kovats index; KI_t: tabulated Kovats index; N: Nist, 2010; A: Adams, 2009.

*Compared with an authentic DHF sample from our laboratory, which was identified by ¹H and ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy (SILVA, 2016).

The *N. grandiflora* leaves EO was previously studied by Cunico et al. (2010), which identified 33 components. These authors also described that the EO of this species contains substances with antimicrobial potential against *Staphylococcus aureus*. Additionally, Silva et al. (2015) evaluated the effect of seasonality on the EO yield of *N. grandiflora* leaves during one year and obtained an average yield of 0.54 \pm 0.03%, similar to that found in this study.

Furthermore, Silva (2014) and Silva et al. (2015) reported that the individuals collected during the spring presented significantly higher EO yields than those collected during the other seasons of the year. This justifies the lower value found in this study (0.39%), since the collection was carried out during the summer. Regarding the chemical composition, Silva et al. (2016) identified 24 constituents of *N. grandiflora* EO, of which the major compounds were (+)-dehydrofukinone (26.85%), valencene (6.89%), kaurene (6.03%), aristolochene<4,5-di-epi> (5.41%), selin-11-en-4- α -ol (5.34%) and bicyclogermacrene (5.06%), similar to those found in this work.

Regarding the EO density found in this work, this data is in agreement with its chemical composition, which presents sesquiterpenoids as major components. Silva (2016) found a density of 0.926 g mL⁻¹ for the EO of leaves of the same species. Essential oils consisting mainly of terpenoids are less dense than water; while those whose density is greater than water, have phenylpropanoids as major components.

3.2 Effect of *N. grandiflora* EO on *in vitro* survival and establishment, contaminants and phenolic oxidation occurrence

The variables survival, establishment, bacterial contamination, fungal contamination, phenolic oxidation and number of leaves formed in each explant were evaluated after 30 days of *in vitro* culture. The results found in the pilot test for survival ($p= 0.0005$) and establishment ($p= 0.0016$) showed significant effect among treatments (Table 2). The explants did not survive when exposed to higher EO concentrations than $0.5 \mu\text{L mL}^{-1}$, indicating its toxic effect to the explants. Regarding fungal contamination (overall average = 21.10%) and oxidation (overall average = 0,71%), there was no significant effect among treatments, while for bacterial contamination ($p= 0.0000$) and number of leaves formed ($p= 0.0195$), the effect of treatments was significant.

Table 2 - Pilot test: Survival (Surv.), bacterial contamination (Bac. Cont.), Establishment (Estab.) and number of leaves formed (N. Leaves) of *Eugenia involucrata* at 30 days of *in vitro* culture, after inoculation in $\frac{1}{2}$ MS medium, containing different concentrations of *Nectandra grandiflora* leaves essential oil.

EO treatments ($\mu\text{L mL}^{-1}$)	Surv. (%)	Bac. Cont. (%)	Estab. (%)	N. Leaves
Positive control	86.74 a	100.00 b	53.34 a	18.00 a
Negative control	66.68 a	80.02 a	13.34 ab	4.00 ab
0.1	53.34 ab	86.68 a	53.34 a	15.00 ab
0.5	33.34 ab	80.02 a	0.00 b	0.00 b
1.0	0.00 b	66.68 a	0.00 b	0.00 b
3.0	0.00 b	46.66 a	0.00 b	0.00 b
MEAN	40.01	76.68	20.00	41.00
CV	17.47	10.47	16.25	29.34
SE	0.07	0.06	0.06	0.51

Means followed by different letters indicate significant difference in the same column, by Tukey test, $p<0.05$. CV: coefficient of variation and SE: standard error.
Source: Author. Santa Maria, RS, UFSM, 2017.

Dias et al. (2012) evaluated the effect of the commercial biostimulant Promalin® (1.8% benzyladenine (BAP), a cytokinin (CK) and 1.8% gibberellins (GA), $\text{GA}_4 + \text{GA}_7$), in the promotion of sprouting on blackberry (*Rubus* spp.) cv. Brazos. root cuttings, and

they reported a value decrease with the concentration increase of biostimulant. Furthermore, according to the authors, cytokines and gibberellins at low concentrations promote the growth and vegetative development of different species. Saharkhiz and Goudarzi (2014) reported a decrease the EO content of peppermint (*Mentha piperita* L.) caused by high concentration of salicylic acid, and Saharkhiz et al. (2011) reported similar finding with catnip (*Nepeta cataria* L.). Within this context, it is perceived that high concentrations of growth regulators are often toxic to explants. Therefore, lower concentrations of these plant regulators should be evaluated.

In the second experiment (Table 3), (with reduced EO concentrations: 0.05, 0.075, 0.1, 0.125, 0.15, 0.175 and 0.2 $\mu\text{L mL}^{-1}$), a significant effect of EO concentration on the establishment ($p= 0.0015$) and the number of formed leaves ($p= 0.0000$) were found. Conversely, for survival (overall mean of 51.85%), fungal contamination (overall mean of 17.77%), bacterial contamination (overall mean of 50.37%) and oxidation (37.04%), no significant effect was detected.

Considering survival (Table 3), the treatments did not differ statistically from the controls, indicating that EO concentrations lower than 0.2 $\mu\text{L mL}^{-1}$ did not display toxicity to explants. Indeed, none of the concentrations evaluated were able to control fungal and bacterial contaminants. However, concentration of 0.075 $\mu\text{L mL}^{-1}$ allowed the establishment of 86.66% of the assessed explants, not statistically differing from the controls and EO at 0.050 and 0.1 $\mu\text{L mL}^{-1}$.

In addition, when 0.075 $\mu\text{L mL}^{-1}$ of the extractive was added to the nutritive medium, the explants emitted an expressive quantity of leaves (Figure 1), differing statistically from both controls. In this way, although *N. grandiflora* EO, at 0.075 $\mu\text{L mL}^{-1}$ did not reduce the microbiological contamination, allowed the successful establishment of explants. Thereby, allowing establishment and leaf emergence of explants, and increase of the photosynthetic area are expected, becoming them more vigorous to withstand acclimatization.

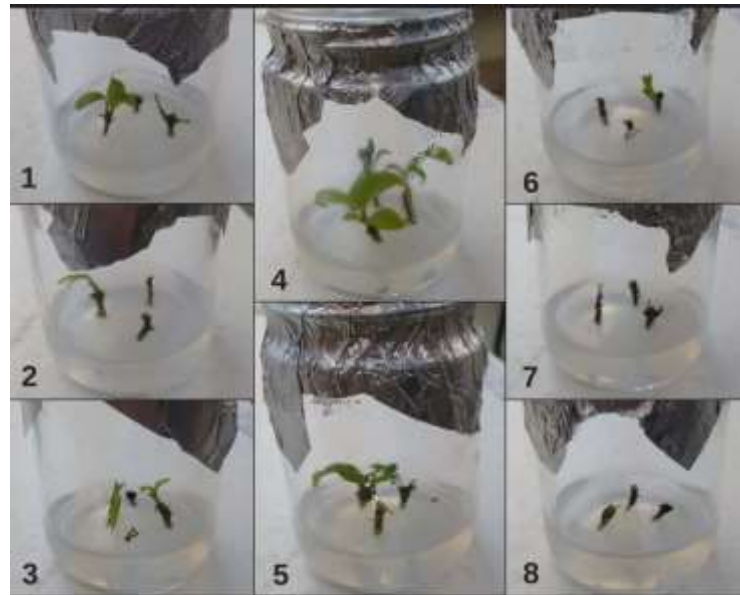
Table 3 - Establishment (Estab.) and number of leaves formed (N. Leaves) of *Eugenia involucrata*. at 30 days of *in vitro* culture, after inoculation in ½ MS medium, containing different concentrations of *Nectandra grandiflora* leaves essential oil.

EO treatments ($\mu\text{L mL}^{-1}$)	Estab. (%)	N. Leaves
Positive control	40.00 ab	12.00 b
Negative control	33.33 ab	11.00 b
0.050	40.00 ab	12.00 b
0.075	86.66 a	47.00 a
0.100	46.66 ab	22.00 ab
0.125	20.00 b	4.00 b
0.150	6.66 b	4.00 b
0.175	13.33 b	3.00 b
0.200	0.00 b	0.00 a
MEAN	31.85	12.77
CV	17.22	29.91
SE	0.07	0.14

Means followed by different letters indicate significant differences in the same column, by Tukey test, $p < 0.05$. CV: coefficient of variation and SE: standard error.
Source: Author. Santa Maria, RS, UFSM, 2017.

The toxic effect to the explants at higher EO concentrations can be derived from an allelopathic effect. This can be presumed once literature brings different reports about allelopathy of isolated sesquiterpenoids and EOs with sesquiterpenoids as major compounds (DE MELO et al., 2017; SILVA et al., 2012; ROBLES et al., 1999). On the other hand, the expressive number of leaves emitted by the explants when exposed to OE at low concentrations may possibly be explained by a hormesis effect. This phenomenon can be observed in all groups of organisms such as bacteria, fungi, angiosperms and animals (CALABRESE, 2005). Hormesis occurs when a toxic substance at high doses shows beneficial effects when applied at low doses, and in this case, stimulates the plant development (ARALDI, 2011). Additionally, Yamada et al. (1995) and Yokotani-Tomita et al. (1998) have found that some chemical substances obtained from *Arabidopsis thaliana* can act as plants growth promoters.

Figure 1 - *Eugenia involucrata* explants cultivated *in vitro* under different concentrations of *Nectandra grandiflora* essential oil (EO) diluted in nutritive medium.



1: Positive control; 2: negative control; 3: 0.050 $\mu\text{L mL}^{-1}$ EO; 4: 0.075 $\mu\text{L mL}^{-1}$ EO; 5: 0.100 $\mu\text{L mL}^{-1}$ EO; 6: 0.125 $\mu\text{L mL}^{-1}$ EO; 7: 0.150 $\mu\text{L mL}^{-1}$ EO; 8: 0.175 $\mu\text{L mL}^{-1}$ EO.

Source: Author. Santa Maria, RS, UFSM, 2017.

However, the structural similarity of the major components of *N. grandiflora* EO with gibberellins (PRISIC et al., 2004) may be another explanation for the stimulation of explants development. Gibberellins are diterpenoids which regulate stem elongation, seed germination and flowering. They are associated with juvenile to adult transition processes, promote fructification and play an important role on seed germination (TAIZ; ZEIGER, 2004; SPATZ; GRAY 2008).

Still regarding concentration, according to Sadeghian et al. (2013) salicylic acid applied at low concentration resulted in higher development biological and leaf emergence over other treatments. Similarly, Kord and Hathout (1992) described that foliar application of salicylic acid at low concentration stimulated different morphological and growth parameters of tomato plants but reverse effects were observed at high concentration. Thus, low concentrations of *N. grandiflora* EO may have assisted in the establishment of the *E. involucrata* explants. However, additional studies should be carried out to explain the exact mechanism by which the EO exerts its effect.

According to Grattapaglia and Machado (1998), although the contaminants are not desirable for *in vitro* cultures, when the microorganism does not prevent the

development of the explant, the associated cultivation can be an alternative. This statement is in line with the results found in our work, once the EO seems to promote a balance between the contaminating agents and the explant. In this way, low EO concentrations permitted the explant to establish itself effectively, even being in contact with fungal and bacterial microorganisms.

Additionally, Danielli et al. (2017) affirm that the use of *Nectandra* sp. EO combined with commercial fungicide presented an additive and synergistic effect, reducing the active concentration of the antifungal agent when used in combination. Thus, considering that EO showed no toxicity when tested at concentrations in between 0.075 and 1.0 $\mu\text{L mL}^{-1}$ (Table 3), further experiments should be performed using combinations of extractives obtained from different species, and/ or the EO with growth hormones and/ or combinations with synthetic products. In this way, a reduction of the commercial product active concentration can be used and consequently reducing costs.

The *N. grandiflora* EO stimulated the emission of leaves in *E. involucrata* explants cultured *in vitro*, without interfering with of microbial contamination and phenolic oxidation in *E. involucrata* explants. To our knowledge, this is the first work that evaluates the use of EO to stimulate explants establishment and/ or to control contamination on *in vitro* cultures of *E. involucrata*, which emphasizes the originality of this study. However, additional experiments should be carried out, such as micropropagation experiments of other woody species. In this way, an effective product, that would act as biostimulant or plant growth regulator can be developed. Besides reducing the costs of obtaining seedlings by micropropagation, the generated product may add value to *N. grandiflora* EO, can be traded generating foreign exchange and contribute to the conservation of this native species.

4 REFERENCES

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy**. Illinois: Allured Publishing Corporation, 2009. 804 p.

AMARAL, S. A. et al. Uso de tratamentos como antioxidantes de explantes (embrião, endosperma) de andiroba (*Carapa guianensis*). In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA FCAP; SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL, 7., 1997, Belém. **Anais...** Belém: FCAP, 1997. p.122-124

ANDRADE, M. W. et al. Micropropagação de aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr.Allemão). **Ciência Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, n.1, p.174-180, 2000.

ARALDI, D. B. **Interferência alelopática de extratos de *Hovenia dulcis* Thunb. na germinação e crescimento inicial de plântulas de *Parapiptadenia rígida* (Benth.) Brenan**. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal), 208p. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brasil, 2011.

ASSIS, T. F.; TEIXEIRA, S. L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (eds.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA/CNPH, 1998. p.261-296.

BACKES, A.; IRGANG, B. Árvores do Sul: guia de identificação e interesse ecológico. Porto Alegre: **Pallotti**, 2002.

BASSAN, J. S. **Comportamento *in vitro* de canafístula [(*Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert)]**. 2006. 101 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, 2006

CALABRESE, E. J. Paradigm lost, paradigm found: The reemergence of hormesis as a fundamental dose response model in the toxicological sciences. **Environ. Pollution**, Geneva, n. 138, p. 379-411, 2005.

CALDAS, L. S. et al. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EmbrapaSPI/Embrapa-CNPH, 1998. v.1, p.87-132.

CARVALHO, P. E. **Espécies arbóreas brasileiras**. Brasília: EMBRAPA Informações Tecnológicas; Colombo: EMBRAPA Florestas, 2008. v.3, 593 p.

CASTRO, P. R. E.; VIEIRA, E. L. **Aplicações de reguladores vegetais na agricultura tropical**. Guaíba: Agropecuária, 2001. 588 p

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.

DANIELLI, L. J. et al. Chemosensitization of filamentous fungi to antifungal agents using *Nectandra* Rol. ex Rottb. species essential oils. **Industrial Crops and Products**. v. 102, p. 7-15, 2017.

DE MELO, S. C. et al. Chemical constitution and allelopathic effects of *Curcuma zedoaria* essential oil on lettuce achenes and tomato seeds. **Australian Journal of Crop Science**, v. 11, n. 7, p.906-916, 2017.

ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Tipo de explante e controle da contaminação e oxidação no estabelecimento *in vitro* de plantas de macieira (*Malus domestica* Borkh) cvs. Galaxy, Maxigala, Mastergala. **Revista Brasileira de Agrociência**: p. 221-227. 2003.

EUROPEAN PHARMACOPEIA. 2007. 6 ed. Strassbourg, European Directorate for the Quality of Medicines.

FERREIRA, W. D. et al. Propagation, growth and carbohydrates of *Dendrobium* Second Love (Orchidaceae) *in vitro* as affected by sucrose, light and dark. **In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant.** v.47: 420-427. 2011.

GOLLE, D. P. **Estabelecimento, multiplicação, calogênese, organogênese *in vitro* e análise da diversidade genética em acessos de *Eugenia involucrata* DC.** 2010. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.

GOLLE, D. P. et al. Desinfestação superficial de explantes isolados de ramos semilenhosos e herbáceos de *Eugenia involucrata* DC. (Myrtaceae). **Cerne**, Lavras, v. 19, n. 1, p. 77-82, jan./mar. 2013.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: **SPI/Embrapa** - CNPH, 1, p. 183-260, 1998.

HERMAN, E. B. Recent advances in plant tissue culture VIII. Microbial contaminants in plant tissue cultures: solutions and opportunities. **Agrictech Consultants Inc**, Shrub Oak. 2004.

KORD, M; HATHOUT, T. Changes on some growth criteria, metabolic activities and endogenous hormones in tomato plants consequent to spraying with different concentrations of salicyladyde. **Egyptian Journal of Physiological Sci.** v.16, n. 117. 1992.

LORENZI, H. Árvores brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil. **Nova Odessa: Plantarum**, 2008.

MARCUZZO, S. F. Cerejeira-do-mato. In: MARCUZZO, D. F. 30 árvores estratégicas da Mata Atlântica: por um verde mais vivo. **Osório: Prefeitura Municipal de Osório**, 1998.

MONACO, L.C. et. al. Applications of tissue culture in the improvement of coffee. In: REINERT, J.; BAJAJ, Y.P.S. Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue, and organ culture. Berlin: Springer-Verlag, 1977. p.109-126.

MORAIS, T. P. et al. Aplicações da cultura de tecidos em plantas medicinais. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v.14, n.1, p.110-121, 2012.

MURASHIGE, T. SKOOG, F. A revised médium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, 1962.

ORLIKOWSKA, T.; NOWAK, K.; REED, B. Bacteria in the plant tissue culture environment. **Plant Cell Tissue Organ Cult.** v.128, p.487–508, 2016.

PARK, I. K. et al. Fumigant activity of plant essential oils and components from horseradish (*Armoracia rusticana*), anise (*Pinpinella anisum*) and garlic (*Allium sativum*) oils against *Lycoriella ingenua* (*Diptera: Sciaridae*). **Pest Management Science**. v. 62, p. 723-728, 2006.

PRISIC, S. et al. Rice contains two disparate ent-copalyl diphosphate synthases with distinct metabolic functions. **Plant Physiol**. v. 136, p. 4228–4236, 2004.

ROBLES, C.; BONIN, G.; GARZINO, S. C. R. Autotoxic and allelopathic potentials of *Cistus albidus* L. **Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie / Life Sciences**, v. 322, p.677–685, 1999.

RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, D. A. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do cerrado na região do Alto Rio Grande, Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 1, p. 102-123, jan./fev. 2001.

SADEGHIAN, F. et al. Effects of Exogenous Salicylic Acid Application on Growth, Metabolic Activities and Essential Oil Composition of *Satureja khuzistanica* Jamzad. **Journal of Medicinal Plants**. v. 12, n. 47, 2013.

SAHARKHIZ, M. J. et al. Salicylic acid changes physio-morphological traits and essential oil content of catnip (*Nepeta cataria* L.). **Z. Arznei-Gewurzpfl**, v.16, p. 75-77, 2011.

SAHARKHIZ, M. J.; GOUDARZI, T. Foliar Application of Salicylic acid Changes Essential oil Content and Chemical Compositions of Peppermint (*Mentha piperita* L.). **Journal of Essential Oil Bearing Plants**. v.17, n. 3, 2014.

SANCHOTENE, M. C. C. Frutíferas nativas úteis na arborização urbana. 2ed. Porto Alegre: **SAGRA**, 1989.

SATISH, S. et al. Antifungal activity of some plant extracts against important seed borne pathogens of *Aspergillus* sp. **Journal of Agricultural Technology**. v. 3, n.1, p. 109-119, 2007.

SATO, A.Y. et al. Micropropagação de *Celtis* sp: controle da contaminação e oxidação. **Cerne**, v.7, n.2, p.117-23, 2001.

SILVA, M. P. et al. Phytotoxic activity in *Flourensia campestris* and isolation of (–)-hamanasic acid A as its active principle compound. **Phytochemistry**, v. 77, p. 140–148, 2012.

SILVA, D. T. **Óleos essenciais de *Nectandra grandiflora* e *Ocotea acutifolia*: rendimento, composição química e atividades biológicas**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2014.

SILVA, D. T. et al. Análise do efeito da sazonalidade sobre o rendimento do óleo essencial das folhas de *Nectandra grandiflora* Nees. **Revista árvore**, v.39, n.6, p.1065-1072, 2015.

SILVA, D. T. **Caracterização química e atividades biológicas de extrativos obtidos de *Nectandra grandiflora* Nees e *Ocotea lancifolia* (Schott) Mez.** Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2016.

SILVA, D. T. et al. Chemical composition and inhibitory effects of *Nectandra grandiflora* eaves essential oil against wood decay fungi. **Drewno**. v.59, n. 197, 2016.

SOUZA, C.R. et al. Influência do ácido giberélico sobre a arquitetura de plantas de feijão no início de desenvolvimento. **Acta Scientiarum Agronomy**, v.32, n.2, p. 325-32, 2010.

SPATZ, A. K.; GRAY, W. M. Plant Hormone Receptors: new perceptions. **Gene Dev.** v. 22, p. 2139-2148, 2008.

STEFANEL, C. M. **Aspectos da qualidade e sementes e do estabelecimento *in vitro* de *Eugenia involuocrata* de Candolle.** 2016. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2016.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal.** 3. ed. Artmed, Porto Alegre. 2004, 719 p.

UNSICKER, S. B. et al., Protective perfumes: the role of vegetative volatiles in plant defense against herbivores. **Curr. Opinion Plan Biol.**, v. 12, p. 479-85, 2009.

VALENT BIOSCIENCES. Disponível em: <<http://www.valentbiosciences.com>>. Acesso em: 19 nov. 2017.

WACHOWICZ, C. M.; CARVALHO, R. I. N. **Fisiologia vegetal: produção e pós-colheita.** Curitiba: Chanpagnat, 2002. 424p.

XAVIER, A.; WENDLING, I.; DA SILVA, R. L. **Silvicultura clonal: princípios e técnicas.** Viçosa. Universidade Federal de Viçosa, p. 272, 2009.

YAMADA, K.; ANAI, T.; HASEGAWA, K. Lepidimoide, an allelopathic substance in the exadutes from germinated seeds. **Phytochemistry**, v.39, n.5, p. 1031-1032, 1995.

YOKOTANI-TOMITA et al. Growth-promoting allelopathic. Substance exuded from germination *Arabidopsis thaliana* seeds. **Phytochemistry** v.47, n.1, p. 1-2, 1998.

3 MANUSCRITO 2 – *Nectandra grandiflora* Nees & Mart. ex Nees essential oil: growth inhibition and action on ergosterol content of wood rot fungi

Nadia Helena Bianchini^a, Carlos Garrido Pinheiro^a, Bruno Silva de Oliveira^b, Victor dos Santos Barboza^c, Fernando Gouveia^d, Marlove Fátima Birão de Muniz^e, Maria Amália Pavanatto^{c,f}, Berta Maria Heinzmann^{a,g*}

^a Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, BR. CEP 97105-900, Brasil

^b Curso de Graduação em Engenharia Florestal, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, BR. CEP 97105-900, Brasil

^c Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, BR. CEP 97105-900, Brasil

^d Serviço Florestal Brasileiro, Brasília, DF, BR. CEP 70818-900, Brasil

^e Departamento de Defesa Fitossanitária. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, BR-97105-900, Brasil

^f Departamento de Fisiologia e Farmacologia. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, BR-97105-900, Brasil

^g Departamento de Farmácia Industrial. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, BR. CEP 97105-900, Brasil

*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, Telefone: +55 55 3220 9674, Fax: +55 55 3220 8336.

***Nectandra grandiflora* Nees & Mart. ex Nees essential oil: growth inhibition and action on ergosterol content of wood rot fungi**

ABSTRACT

The present study aims to evaluate the antifungal potential of *Nectandra grandiflora* Nees & Mart. ex Nees essential oil (EO) and its major component, (+)-dehydrofukinone (DHF) against white (*Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat. and *Trametes versicolor* (L.: Fr) Pilát) and brown rot fungi (*Lentinus lepideus* (Fr.) Fr. and *Gloeophyllum trabeum* (Pers.: Fr) Murrill). Additionally, the possible effects of these extractives on ergosterol content in the fungi plasma membrane were evaluated. EO chemical characterization was carried out by gas chromatography and the antifungal activity was performed by the radial growth technique. The PDA medium was supplemented with essential oil, 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. The essential oil major components were (+)-dehydrofukinone, bicyclogermacrene, dehydrofukinone epoxide, valencene and kaurene. *Nectandra grandiflora* EO showed antifungal activity against white rot fungi *T. versicolor*, inhibited totally its growth at 1.0 $\mu\text{L mL}^{-1}$. In addition, the results indicate no significant difference between the mycelia growth inhibition of fungi induced by the EO (0.5 $\mu\text{L mL}^{-1}$) and DHF (0.1 $\mu\text{L mL}^{-1}$), which indicates that DHF is one of the compounds responsible for the EO activity on wood decay fungi. Conversely, the EO and DHF caused a decrease in ergosterol content in mycelia of both the white-rot fungi species ($p < 0.05$). In this context, the plasma membrane is an important antifungal target of *N. grandiflora* EO and DHF on white rot fungi *T. versicolor* and *G. applanatum*.

Keywords: Lauraceae. Extractive. (+)-dehydrofukinone. White rot. Brown rot. Ergosterol.

1 INTRODUCTION

Fungi play an important role in ecosystems nutrient cycling. However, under certain conditions, many fungal species can deteriorate timber products (BENTO et al., 2014) by wood rot action. White-rot fungi attack both polysaccharides and lignin indistinctly, giving the wood a clearer appearance (ZABEL; MORRELL, 1992), whereas brown-rot fungi primarily metabolize the holocellulose component and stimulate the loss of wood strength (GOODELL et al., 2008).

Currently, the use of chemical preservatives is effective to control wood decay fungi. However, the intensive application of these products has caused several negative impacts on human health as well as ecological problems during service-life (PÁNEK et al., 2014). Additionally, the application of synthetic antifungal agents has stimulating the fungal resistance (WHITE et al., 1998).

In recent years, many effective wood preservatives against wood decay fungi containing heavy metals such as Cr, As and Cu, have been prohibited in many countries due to its toxicity and environmental persistence. Within this context, many researchers are looking for new compounds, aiming to develop green chemicals and new methods to protect and extend service life of wood products (HSU et al., 2009; REINPRECHT, 2010; BAKAR et al., 2013; YOON; CHA; KIM, 2013; PÁNECK et al., 2014).

Essential oils (EOs) are becoming increasing interest as alternatives to synthetic chemical pesticides, due to their lower toxicity to humans and lower hazard to the environment, when compared to synthetic products (SATISH et al., 2007; CHANDLER et al., 2011; VILLAVERDE et al., 2016). Furthermore, EOs are promising mixtures of natural products for the formulation of safer antifungal agents (VARMA; DUBEY, 2001), since they could improve the efficacy of conventional antifungal products through synergistic effects, including a positive interaction between components, in addition to their low toxicity (SILVA et al., 2016). Within this context, one of the proposed mechanisms of antifungal action for the volatile components of EO is the growth inhibition of fungi by decreasing ergosterol content, affecting membrane structure, and disrupting sterol biosynthesis (PARVEEN et al., 2004; KHAN et al., 2010; KEDIA et al., 2014; SILVA et al., 2015; TIAN et al., 2012).

Nectandra grandiflora Nees & Mart. ex Nees (Lauraceae) is a native tree of south Brazil. The EO of its leaves presents (+)-dehydrofukinone (DHF), an eremophilane-type sesquiterpenoid ketone, as major compound (GARLET et al., 2017). From the biological activities described for the EO of *N. grandiflora* and its major component, it is worth noting the *in vitro* antifungal activity against *Pycnoporus sanguineus* and *Gloeophyllum trabeum*, species which cause white and brown rot, respectively (SILVA et al., 2016). However, several other fungal species can cause wood rot. In addition, the mechanism of action of this activity remains unknown so far.

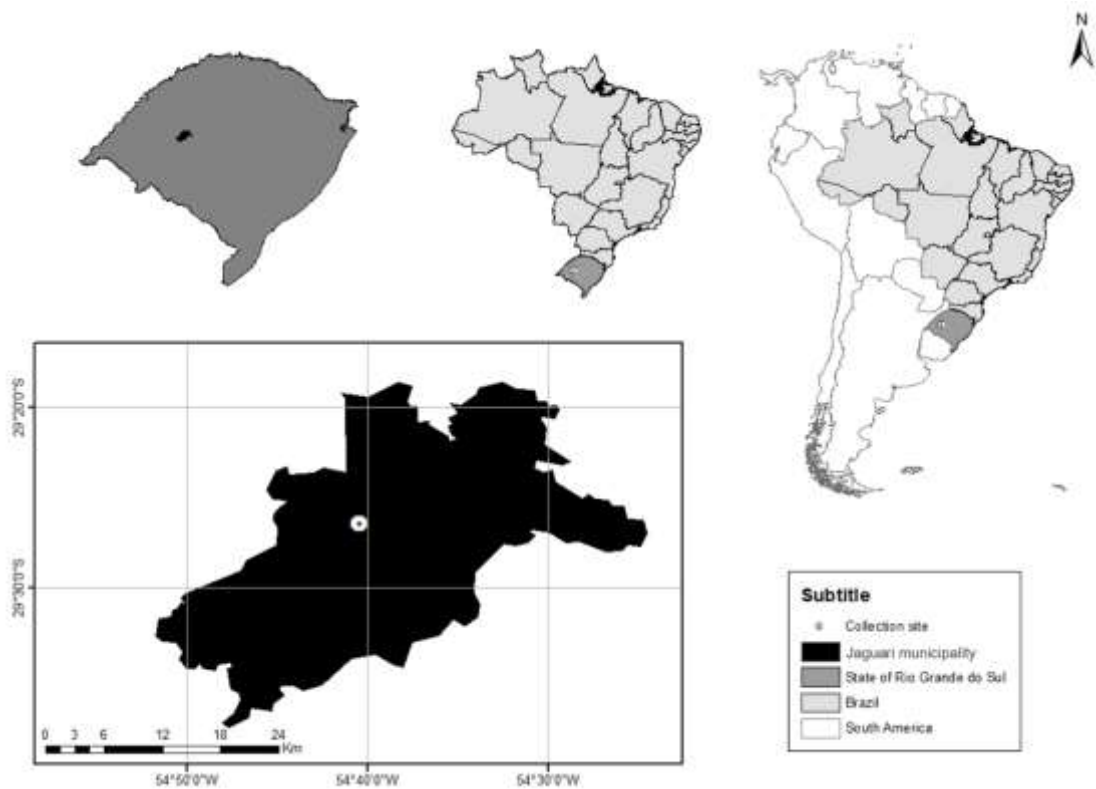
Given the importance of identifying new substances with antifungal activity to provide alternatives to control wood decay fungi, this study was performed to investigate the antifungal potential of *N. grandiflora* EO and DHF, against two white and two brown rot fungi. Additionally, the possible effects of these extractives on ergosterol content in the fungi plasma membrane were evaluated.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 PLANT MATERIAL

Fresh leaves of *N. grandiflora* leaves were collected in Jaguari, Rio Grande do Sul state, Brazil at 29°26'25.09" S and 54°40'27.73" W. The botanical identification was performed by Dr. Solon Jonas Longhi and a voucher specimen was deposited at the Herbarium of the Biology Department of Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil (SMDB 13.162). Access to the national genetic patrimony was given by the National Council of Scientific and Technological Development (CNPq, Brazil: #010191/2014-3).

Figure 1 – Collection place of plant material.



Source: author.

2.2 ESSENTIAL OIL EXTRACTION

Fresh leaves of *N. grandiflora* were fragmented and afterwards the EO was extracted by hydrodistillation process using a Clevenger-type apparatus for 3 h (EUROPEAN PHARMACOPEIA, 2007), in triplicate. The EO yield was determined as weight/volume (w/v). The extracted EO was stored at $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ in glass bottles in a light-free environment, for further chemical analysis, fractioning and biological tests.

2.3 CHEMICAL CHARACTERIZATION AND QUANTIFICATION

The chemical composition of the EO was determined by an Agilent 7890A gas chromatograph coupled to a 5075C mass spectrometer (GC-MS) using a non-polar HP5-MS capillary column (Hewlett Packard, 5% phenylmethylsiloxane, 30 m \times 0.25 mm i.d. \times 0.25 μm film thickness), and electron ionization mode at 70 eV. The carrier gas was helium at a flow rate of $1.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, injector and detector temperatures of $150\text{ }^{\circ}\text{C}$ and $280\text{ }^{\circ}\text{C}$ were used, respectively, and the samples were injected in split inlet mode (ratio 1:100). Oven program: $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 4 minutes, and up to $320\text{ }^{\circ}\text{C}$ at $4\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. The compounds identification was based on the comparison of retention indices calculated by linear interpolation to retention times of *n*-alkane series ($\text{C}_7\text{-C}_{31}$), and of their mass spectra with authentic samples and with literature data (ADAMS, 2009, NIST 2010). Relative amounts of the components were calculated based on GC peak areas, by gas chromatography with a flame ionization detector (GC-FID). Analysis parameters were the same as mentioned above, with exception of split ratio (1:50) and both injector and detector temperatures ($300\text{ }^{\circ}\text{C}$).

2.4 DEHYDROFUKININE ISOLATION

Four chromatography columns (CC) were performed to fractionate the EO aiming to isolate (+)-dehydrofukinone (DHF). In the first CC, 9 g of EO were added to 600 g of silica gel 60 (7.5 x 65 cm) and eluted with hexane-acetone (90:10 v/v) at $1.25\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Fractions of 100 mL were gathered in six main fractions based on thin layer chromatography (TLC) profile and concentrated under reduced pressure at $40\text{ }^{\circ}\text{C}$. The TLC analyses were carried out on silica gel 60 F254 sheets and the spots were detected by vanillin sulfuric acid-UV 365 nm.

Fraction 4 (1.02 g) was submitted to a second CC (2.41 X 55.7 cm, 95 g silica gel 60, impregnated with 10% AgNO₃ (WILLIAMS; MANDER 2001) eluted with hexane-acetone 97:3 at 0.55 mL min⁻¹. Posteriorly, 1.89 g of same fraction 4 (from first CC) were submitted to the third CC (4.4 x 39.3 cm, 140 g silica gel 60, impregnated with 10% AgNO₃ eluted with hexane-acetone 95:5, at 0.87 mL min⁻¹). Subsequently, the fourth CC (77 g silica gel 60, 2.4 x 50.2 cm) was performed with a sample of 0.8337 g, resulting from the fractions 3 (0.0804 g) and 4 (0.2187 g) of second CC and the fraction 2 (0.5346 g) of third CC. The sample components were eluted with hexane-ethyl ether (97:3 v/v), at 0.5 mL min⁻¹. Among the eleven fractions obtained (0.5 mL min⁻¹ mL each), the fraction 8 (0.6204 g) was identified as DHF, according Silva et al. (2016).

2.5 ANTIFUNGAL ACTIVITY BIOASSAY

The fungal strains used in tests were provided by Forest Products Laboratory, DF, Brazil. The brown rot fungi used were *Gloeophyllum trabeum* (Persoon ex Fries) and *Lentinus lepideus* (Fr.) Fr., whereas the white-rot ones selected were *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat. and *Trametes versicolor* (L. ex Fr.). The fungi species were cultivated in Petri dishes (9 cm of diameter) with PDA (potato-dextrose-agar) culture medium. The plates remained in BOD (Biochemical Oxygen Demand) chamber at 25 ± 1°C in light/dark (12 h/12 h) for 15 days.

The PDA medium was supplemented with EO at concentrations of 0.50, 1.0 and 2.0 µL mL⁻¹, which were previously diluted in ethanol (1.0 µL mL⁻¹), and then transferred to the Petri dishes. An absolute control and a negative control containing ethanol at the highest concentration used as diluent (1.0 µL mL⁻¹) were also considered. For the positive control, the fungicide propiconazole at 1.0 µL mL⁻¹ was used. Mycelial discs (1.1 cm diameter) were then transferred aseptically to the center of the plates and incubated in BOD at 25 ± 1 °C in 12 h-photoperiod for approximately seven days. The inhibitory effect of DHF was analyzed at equivalent concentration to that detected in 0.5 µL mL⁻¹ EO (0.0971 µL mL⁻¹). All assays were carried out in 3 replicates of 2 experimental units each.

The growth of the fungal colony was estimated by an average of two perpendicular measurements performed every 2 days. Speed Index of Mycelial Growth (SIMG) was calculated using the following equation, adapted from Oliveira (1992):

$SIMG = (d_1/n_1 + d_2/n_2 + d_n/n_n)$, where n is the number of days after the start of the experiment and dt is the average diameters of fungal colony (mm). Mycelial growth inhibition (%) was calculated by the equation: Growth inhibition (%) = $[(DC - DT) / DC] \times 100$, where DC and DT are average diameters of fungal mycelia of control and treatment, respectively (BADAWY; ABDELGALEIL, 2014). For each fungus, the mycelial growth inhibition caused by the EO was analyzed by probit analysis (FINNEY, 1971) to obtain the 50% inhibitory concentration (IC_{50}) values.

2.6 EFFECTS OF *Nectandra grandiflora* ESSENTIAL OIL AND DEHYDROFUKINONE ON ERGOSTEROL CONTENT OF FUNGI PLASMA MEMBRANE

The effects of the EO and dehydrofukinone on ergosterol content of the plasma membrane of *G. applanatum*, *T. versicolor*, *G. trabeum* and *L. lepideus* were detected according to methodology adapted from previous reports (KEDIA et al., 2012; BENTO et al., 2014; TIAN et al., 2012). Mycelial discs (1.1 cm diameter) were transferred aseptically to the center of the Petri plates containing PDA supplemented with EO at $0.50 \mu\text{L mL}^{-1}$ and DHF at $0.0971 \mu\text{L mL}^{-1}$ (equivalent concentration to that detected in EO at $0.5 \mu\text{L mL}^{-1}$). The extractive and the substance were previously diluted in ethanol ($1 \mu\text{L mL}^{-1}$). A negative control was also considered, containing only PDA and ethanol. All assays were carried out in three repetitions.

After 4 days of incubation in BOD at the conditions above described, the fungi mycelia were harvested and transferred to test tubes for the wet weight verification. A solution of 25% alcoholic potassium hydroxide was added to each sample, followed by the addition of sterile distilled water and *n*-heptane. After the layers separation of each tube, the *n*-heptane one was collected and analyzed by scanned spectrophotometry (Biospetro sp-220) between 230 and 300 nm. According to Tian et al. (2012), the readings at 282 nm corresponding to ergosterol, and at 230 and 282 nm show the presence of the late sterol intermediate 24(28) dehydroergosterol.

The ergosterol amount was calculated as a percentage of the mycelium wet weight as follows (TIAN et al., 2012): % 24(28) dehydroergosterol = $(A_{230}/518)/\text{mycelia wet wt}$; % ergosterol + % 24(28) dehydroergosterol = $(A_{282}/290)/\text{mycelia wet wt}$, where 290 and 518 are the E values (in percent per cm) determined for crystalline ergosterol and 24(28) dehydroergosterol, respectively, and mycelium weight is the net wet weight (g). The ergosterol inhibition was calculated as: $(C - T)/C$

x 100, where C is the percentage of ergosterol in the control set and T is the percentage ergosterol in the treatment set (KEDIA et al., 2014).

2.7 STATISTICAL ANALYSIS

The data were submitted to homogeneity of variances and normality tests. Once the data did not fit the assumptions, the non-parametric Kruskal-Wallis test was chosen. All data are reported as means \pm standard deviations. The analysis was performed using Assistat 7.7 Beta and GraphPad Prism softwares. A significant difference was considered at a level of $P < 0.05$.

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 CHEMICAL CHARACTERIZATION

The *N. grandiflora* EO showed a yield of $0.5330 \pm 0.056\%$ and density of $0.8941 \pm 0.016 \text{ g mL}^{-1}$. The chemical analysis led to the identification of 28 components, representing 86.60% of the total composition (TABLE 1). The major volatile components detected were (+)-dehydrofukinone (20.52%), bicyclogermacrene (11.80%), dehydrofukinone epoxide (8.06%), valencene (6.44%), kaurene (4.93%) and aristolochene<4,5-di-epi-> (4.32%).

Previous reports showed DHF as the main component EO of *N. grandiflora* leaf (GARLET et al., 2016; SILVA et al., 2016). Garlet et al. (2016) obtained an extraction yield $0.46 \pm 0.02\%$, and the major volatile components were (+)-dehydrofukinone (24.70%), bicyclogermacrene (5.93%) and (-)-kaurene (5.49%). Conversely, Silva et al. (2016) described as major components dehydrofukinone (26.85%), valencene (6.89%), kaurene (6.03%), aristolochene<4,5-di-epi> (5.41%) and selin-11-en-4- α -ol (5.34%).

Since the EO studied by Garlet et al. (2016) and Silva et al. (2016) were obtained from leaves collected from the same population, the small differences evidenced in the chemical composition might be due to factors as plant genetic (plant genotype) and other external environmental factors, such as clima, collection season, luminosity, temperature and water availability (BELTRAME et al., 2010; WANG et al., 2012; XIE et al., 2012; JAVAD et al., 2017).

Table 1 - Chemical composition of the essential oil extracted from *Nectandra grandiflora* fresh leaves.

Peak	RT	Compound	KI _c	KI _t	%
1	11.04	α-Pinene	931	932 ^N	1.45%
2	11.70	Camphene	947	948 ^N	0.14%
3	12.86	β-Pinene	975	975 ^N	1.00%
4	15.01	Limonene	1028	1028 ^N	0.19%
5	15.35	β-Z-Ocimene	1036	1037 ^N	0.36%
6	15.76	β-E-Ocimene	1046	1045 ^N	1.99%
7	17.86	Linalool	1099	1098 ^N	0.45%
8	21.12	Z-3-Hexenyl Butyrate	1185	1184 ^N	0.34%
9	28.19	β-Elemene	1388	1384 ^N	1.43%
10	29.17	Aromadendrene	1419	1419 ^N	0.98%
11	29.77	Allo-Aromadendrene	1438	1440 ^N	0.13%
12	29.94	γ-Gurjunene	1443	1444 ^N	1.19%
13	30.30	α-Caryophyllene	1455	1454 ^N	0.42%
14	30.76	Aristolochene<4,5-di-epi->	1469	1473 ^A	4.32%
15	30.85	γ-Selinene	1472	1472 ^N	0.65%
16	30.99	Amorpha-4,7(11)-diene	1477	1481 ^A	1.55%
17	31.10	γ-Muurolene	1480	1479 ^A	0.64%
18	31.31	Valencene	1487	1485 ^N	6.44%
19	31.46	Eremophilene	1492	1489 ^N	2.08%
20	31.56	Bicyclogermacrene	1495	1500 ^A	11.80%
21	33.97	Spathulenol	1575	1573 ^N	3.04%
22	35.53	Eremoligenol	1629	1631 ^A	1.00%
23	36.23	Dehydrofukinone epoxide	1654	-	8.06%
24	36.32	Selin-11-en-4-α-ol	1657	1659 ^A	4.18%
25	40.25	(+)-Dehydrofukinone	1802	1807 [*]	20.52%
26	40.50	Eremophilan-11-en-10-ol	1811	-	3.89%
27	43.51	Rimuene	1930	1925 ^N	3.45%
28	46.22	Kaurene	2043	2043 ^N	4.93%
Total percentage of identification					86,60%

Compounds are listed in order of elution on DB5 column. RT: Retention time; KI_c: calculated Kovats index; KI_t: tabulated Kovats index; N: Nist, 2010; A: Adams, 2009.

*Compared with an authentic DHF sample from our laboratory, which was identified by ¹H and ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy (SILVA, 2016).

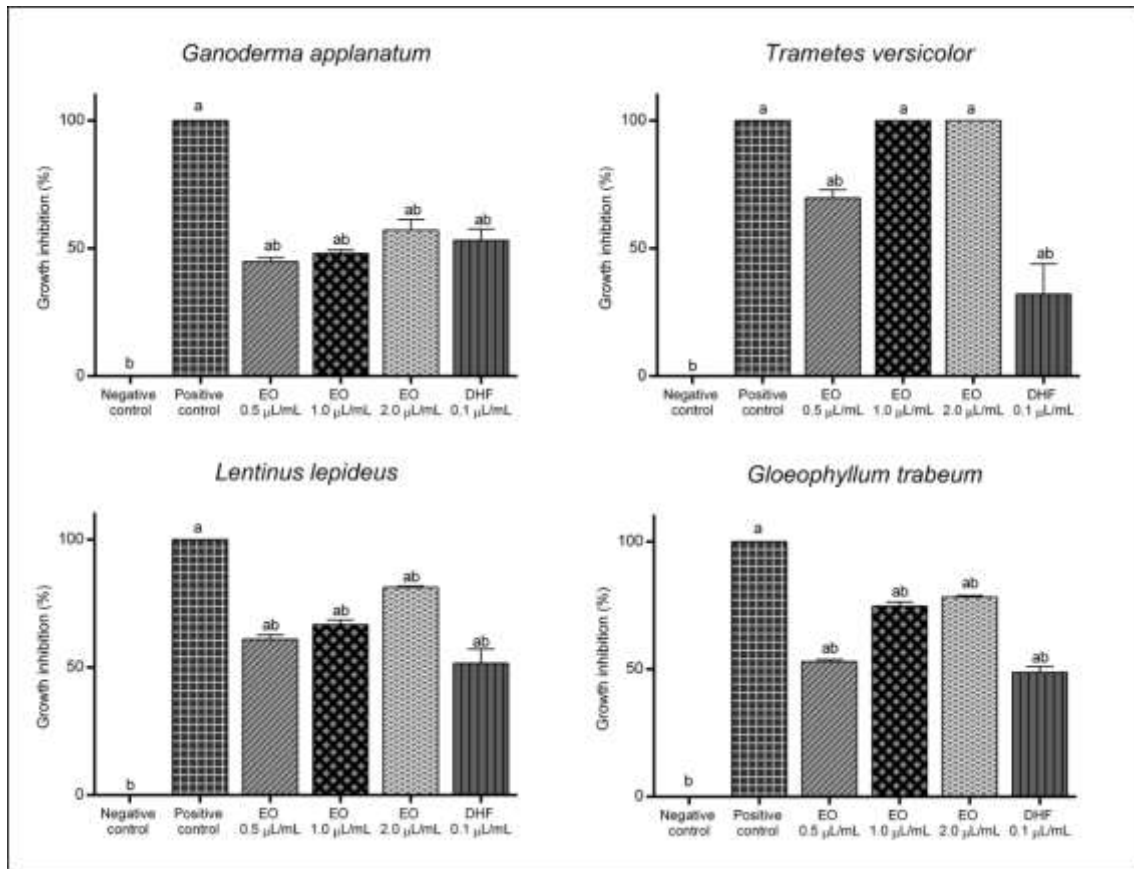
3.2 ANTIFUNGAL ACTIVITY

Regarding the mycelial growth inhibition of the wood decay fungi, the EO and DHF treatments did not differ from positive control in all fungi species tested (Figure 2). The most susceptible fungal species was the white root one *T. versicolor*, which growth was completely inhibited at 1.0 and 2.0 μL mL⁻¹ EO. However, for the additional fungal species evaluated, the extractives activity remained among the positive and negative control, not differing from both controls. Silva et al. (2016) described a growth

inhibition of 47% for the white-rot fungi *P. sanguineus* and 62% for brown-rot fungi *G. trabeum*, both at $1.0 \mu\text{L mL}^{-1}$ EO. Considering the susceptibility of *G. trabeum* to EO and its major component, the results of both studies did not differ for the tested concentrations, indicating that the minor components do not significantly interfere in the observed effect. Furthermore, the EO *Nectandra megapotamica* composed mainly by monoterpenoids showed growth inhibition of 58% for *P. sanguineus*, whereas the extractive inhibited 59% the mycelial growth of *G. trabeum*, at $1.0 \mu\text{L mL}^{-1}$ (BIANCHINI, 2015).

Silva et al. (2016) evaluated the mycelial growth inhibition of *P. sanguineus* and *G. trabeum* by *N. grandiflora* EO at concentrations ranging from 0.25 to $5.0 \mu\text{L mL}^{-1}$. For DHF, these authors chosen to test the amount present in $5.0 \mu\text{L mL}^{-1}$, namely $1.25 \mu\text{L mL}^{-1}$. However, in this work we decided to test only the intermediate concentrations evaluated in the study by Silva et al. (2016), i.e. 0.5, 1.0 and $2.0 \mu\text{L mL}^{-1}$ EO, as well as 0.0971 mL^{-1} DHF, amount of major compound detected in $0.5 \mu\text{L mL}^{-1}$ EO. These concentrations were chosen since one of the objectives of mycelial growth inhibition determination was to define the concentrations to be used for the evaluation of the extractives effect on the ergosterol content on fungal membranes and therefore the growth inhibition must be only partial. In relation to the selected fungal species, we evaluated the most susceptible to EO in the study by Silva et al. (2016), i. e. the brown rot fungus *G. trabeum*, as well as three other species not previously tested: *L. lepideus* (a brown rot fungus), and also two white-rot ones: *G. applanatum* and *T. versicolor*.

Figure 2 – *In vitro* mycelial growth inhibition (MGI%) of *Nectandra grandiflora* essential oil (EO) and its major component (+)-dehydrofukinone (DHF) on *Ganoderma applanatum*, *Trametes versicolor*, *Lentinus lepideus* and *Gloeophyllum trabeum*.



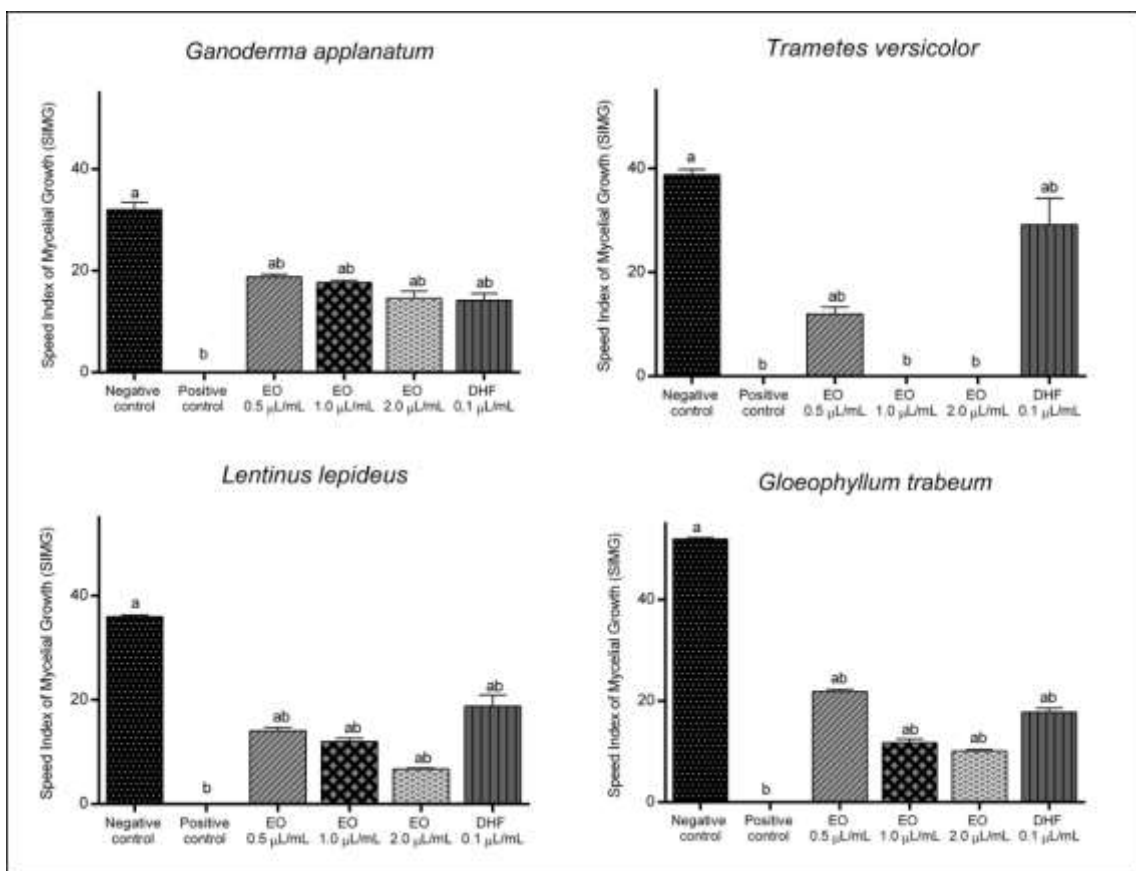
Propiconazole was used as positive control. Data are presented as mean \pm SEM (standard error of the mean). Different letters indicate significant differences by Kruskal-Wallis test ($P < 0.05$).

Considering the SIMG, results for *T. versicolor* at 1.0 and 2.0 $\mu\text{L mL}^{-1}$ EO displayed the same pattern of positive control (Figure 3). However, the EO at 0.5 $\mu\text{L mL}^{-1}$ and DHF at 0.1 $\mu\text{L mL}^{-1}$ did not differ from both controls. This was also observed for all EO concentrations and DHF when assayed against the other fungal species, indicating once again the great susceptibility of *T. versicolor* for the extractives. Accordingly, the EO and DHF treatments had an intermediate effect considering the growth speed of the other white (*G. applanatum*) and brown (*L. lepideus* and *G. trabeum*) rot fungi, not differing from any of the controls at the evaluated concentrations.

Essential oil of *N. megapotamica* at 1.0 $\mu\text{L mL}^{-1}$ showed SIMG value for white-rot fungi *P. sanguineus* of 27, while the brown-rot fungi *G. trabeum* displayed a SIMG value of 25 (BIANCHINI, 2015). In our study, the white-rot fungi *G. applanatum*

exhibited SIMG value of 17.65 ± 0.46 when exposed to $1.0 \mu\text{L mL}^{-1}$ *N. grandiflora* EO, whereas for *T. versicolor*, at the same concentration, the SIMG displayed the same pattern as positive control. Conversely, the brown-rot fungi *L. lepideus* showed SIMG value of 11.96 ± 0.65 and for *G. trabeum*, the SIMG value was 11.75 ± 0.73 , at $1.0 \mu\text{L mL}^{-1}$.

Figure 3 – *In vitro* Speed Index of Mycelial Growth (SIMG) of *Ganoderma applanatum*, *Trametes versicolor*, *Lentinus lepideus* and *Gloeophyllum trabeum* under the effects of *Nectandra grandiflora* essential oil (EO) and (+)-dehydrofukinone (DHF).



Propiconazole was used as positive control. Data are presented as mean \pm SEM (standard error of the mean).

Different letters indicate significant differences by Kruskal-Wallis test ($P < 0.05$).

The results of mycelial growth inhibition tests and half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) using of *N. grandiflora* EO ranged between 0.30 and $0.96 \mu\text{L mL}^{-1}$ (Table 2). Silva et al. (2016) found IC_{50} of $1.22 \mu\text{L mL}^{-1} \pm 0.16$ on white rot fungi *P. sanguineus*, similarly to the result found in this work for *G. applanatum* ($0.96 \mu\text{L mL}^{-1} \pm 0.11$). Furthermore, the IC_{50} values of $0.39 \mu\text{L mL}^{-1} \pm 0.26$ reported to

N. grandiflora EO a on *G. trabeum* (brown rot fungus) were also comparable to those detected in this study ($0.37 \mu\text{L mL}^{-1} \pm 0.02$).

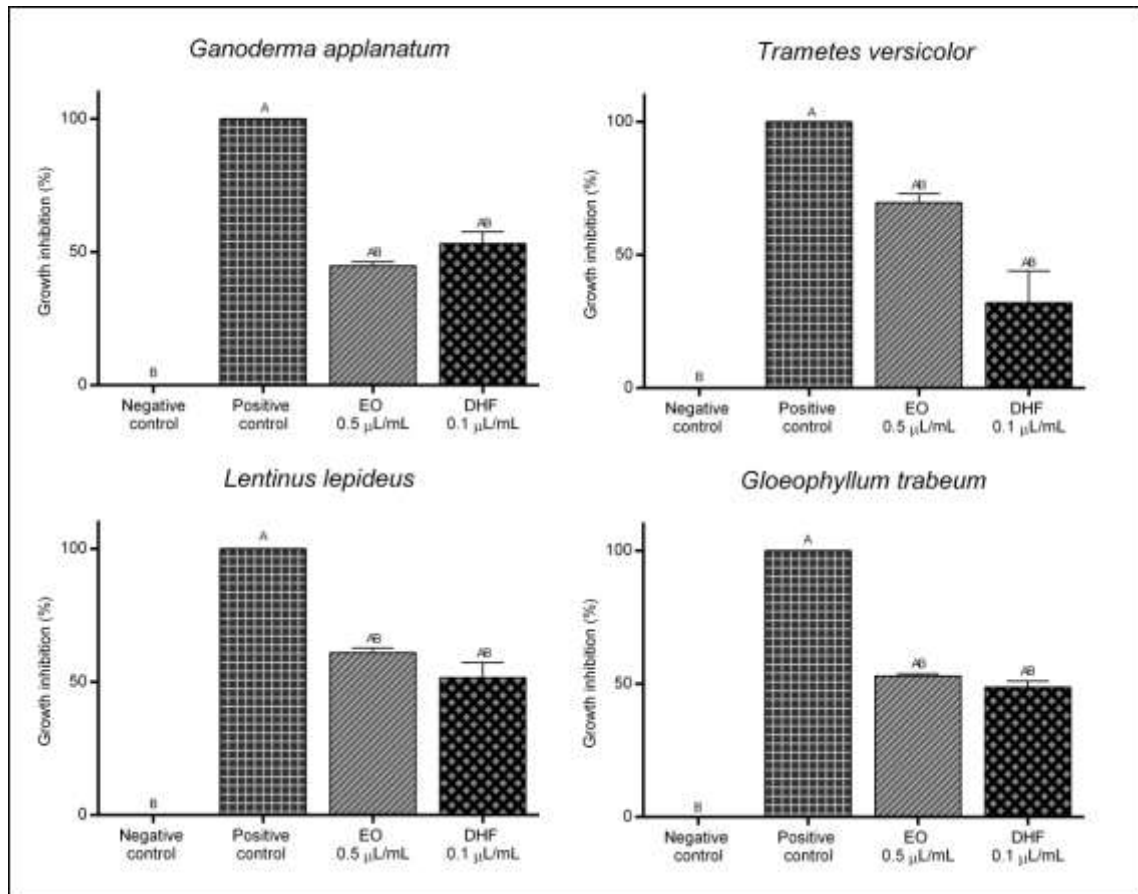
Table 2. *In vitro* mycelial growth inhibition (%) and IC₅₀ of *Nectandra grandiflora* essential oil on *Ganoderma applanatum*, *Trametes versicolor*, *Lentinus lepideus* and *Gloeophyllum trabeum*.

Fungi species	Conc. ($\mu\text{L mL}^{-1}$)	Inhibition mean \pm SEM (%)	IC ₅₀ \pm SEM ($\mu\text{L mL}^{-1}$)
<i>G. applanatum</i>	0.5	44.74 \pm 1.62	0.96 \pm 0.11
	1.0	48.01 \pm 1.36	
	2.0	57.09 \pm 4.13	
<i>T. versicolor</i>	0.5	69.58 \pm 3.31	0.30 \pm 0.02
	1.0	100.00 \pm 0.00	
	2.0	100.00 \pm 0.00	
<i>L. lepideus</i>	0.5	60.90 \pm 1.75	0.30 \pm 0.04
	1.0	66.72 \pm 1.82	
	2.0	81.28 \pm 0.40	
<i>G. trabeum</i>	0.5	52.92 \pm 0.81	0.37 \pm 0.02
	1.0	74.69 \pm 1.58	
	2.0	78.22 \pm 2.32	

Conc. = Concentrations; SEM = standard error of the mean. IC₅₀ values were calculated by probit method (FINNEY, 1971).

Moreover, no significant difference could be detected between the mycelia growth inhibition of fungi induced by the EO ($0.5 \mu\text{L mL}^{-1}$) and the amount of major compound (DHF) detected in this volume ($0.1 \mu\text{L mL}^{-1}$) (Figure 4). Both treatments also did not differ from both controls, showing an intermediate activity among them. Our results indicate that DHF may be responsible for the EO activity on wood decay fungi. Silva et al. (2016) also described no significant difference between the mycelia growth inhibition results of EO and DHF with respect to white-rot fungi *P. sanguineus*. However, these authors reported that this similarity was not found in the brown-rot fungi *G. trabeum* assay, which showed more susceptibility to the EO than DHF. The discrepant results for EO at $0.5 \mu\text{L mL}^{-1}$ and DHF in an amount corresponding to its percentage found in EO in both studies suggest that small differences in chemical composition may promote significant differences in the antifungal effect.

Figure 4 – *In vitro* Mycelial Growth inhibition (%) of *Nectandra grandiflora* essential oil at $0.5 \mu\text{L mL}^{-1}$ and (+)-dehydrofukinone at proportional concentration on *Ganoderma applanatum*, *Trametes versicolor*, *Lentinus lepideus* and *Gloeophyllum trabeum*.



Propiconazole was used as positive control. Data are presented as mean \pm SEM (standard error of the mean). Different letters indicate significant differences by Kruskal-Wallis test ($P < 0.05$).

Pánek et al. (2014), analyzing the antifungal efficacy and stability of 10 different EOs, reported the great resistance of *T. versicolor* to EOs when compared to brown rot fungi. According to Voda et al. (2003), the enzymatic nature of white rot fungi, which produce ligninolytic enzymes, differently from brown-rot fungi, can explain this difference. In addition, *T. versicolor* can deteriorate lignin, phenolic compounds and some antifungal compounds in EO (BAYRAMOGLU; ARICA, 2009). However, our results showed *T. versicolor* as the most susceptible from the fungal species tested. These results could indicate that ligninolytic enzymes were not capable of mitigate the DHF effect, evidencing the substance potential in inhibiting *T. versicolor* growth.

In a recent study, *N. grandiflora* EO showed a great stability and this may be due to the presence of DHF as your major constituent, since the DHF shows a high stability when kept in refrigerated environment (4°C) and it is stable to light- or acid-

induced degradation (GARLET et al., 2017). As proposed by LIZARRAGA et al., (2013), the DHF topological properties support the high stability of this compound due to the six-membered ring linked to the isopropyliden group and to a ketonic function.

Additionally, Zhang et al. (2016) reported the antifungal activity of oxygenated monoterpenes against white-rot fungi. This class of constituents is also present in *N. grandiflora* EO, although in trace amounts (0.79 % of EO chemical composition) and may have contributed to the antifungal activity found in this work. Furthermore, sesquiterpenoids, as major constituents of *N. grandiflora* EO, are linked to a protective function against fungi, bacteria, insects and other pests in plants (BAKKALI et al., 2008).

Although the EO-induced growth inhibition on the tested fungi was around 50%, the antifungal activity did not differ between concentrations. This could be explained by the narrow concentration range tested. Silva et al. (2016) evaluated the inhibitory effects of EO obtained from the leaves of *N. grandiflora* against white and brown rot fungi and described a 79% inhibition of white rot fungi growth and 95% inhibition of brown rot fungi growth, at 5.0 $\mu\text{L mL}^{-1}$ EO. Therefore, higher EO concentrations could completely inhibit the fungi growth.

3.3 EFFECT OF *Nectandra grandiflora* ESSENTIAL OIL AND DEHYDROFUJINONE ON PLASMA MEMBRANE ERGOSTEROL CONTENT

Regarding *G. applanatum*, DHF significantly affected the fungus mycelial wet weight, when compared to negative control (Figure 5A). The absorbance means obtained at 282 nm for ergosterol derivatives was also affected by the substance, since it was significantly lower than the one verified for the negative control (Figure 5B). *G. trabeum* had also its mycelial wet weight significantly affected by DHF (Figure 5C), and the readings at 282 nm presented a lower absorbance mean for the fungus, when compared to negative control (Figure 5D), indicating that ergosterol concentration was affected by the major EO component.

Considering the mycelial wet weight of *T. versicolor*, it was significantly affected by the EO, comparing to the negative control (Figure 5E). The fungus under DHF influence presented a lower absorbance mean at 282 nm, when compared to the negative control (Figure 5F). However, the mycelial wet weight of this species grew under DHF presence did not differ from negative control. *L. lepideus* had its mycelial

wet weight also significantly impaired by the EO (Figure 5G). However, the readings realized at 282 nm for the extractive displayed higher absorbance values when compared to the negative control (Figure 5H).

For *L. lepideus*, although a mycelial weight loss caused by EO could be detected, the extractive evoked an increase of sterol concentration when compared to control. So, the extractive could have stimulated the production of ergosterol, that may be a fungal defense strategy. Avanço et al. (2017) reported that turmeric EO at low concentrations caused an oscillation in the production of ergosterol by *Fusarium verticillioides*.

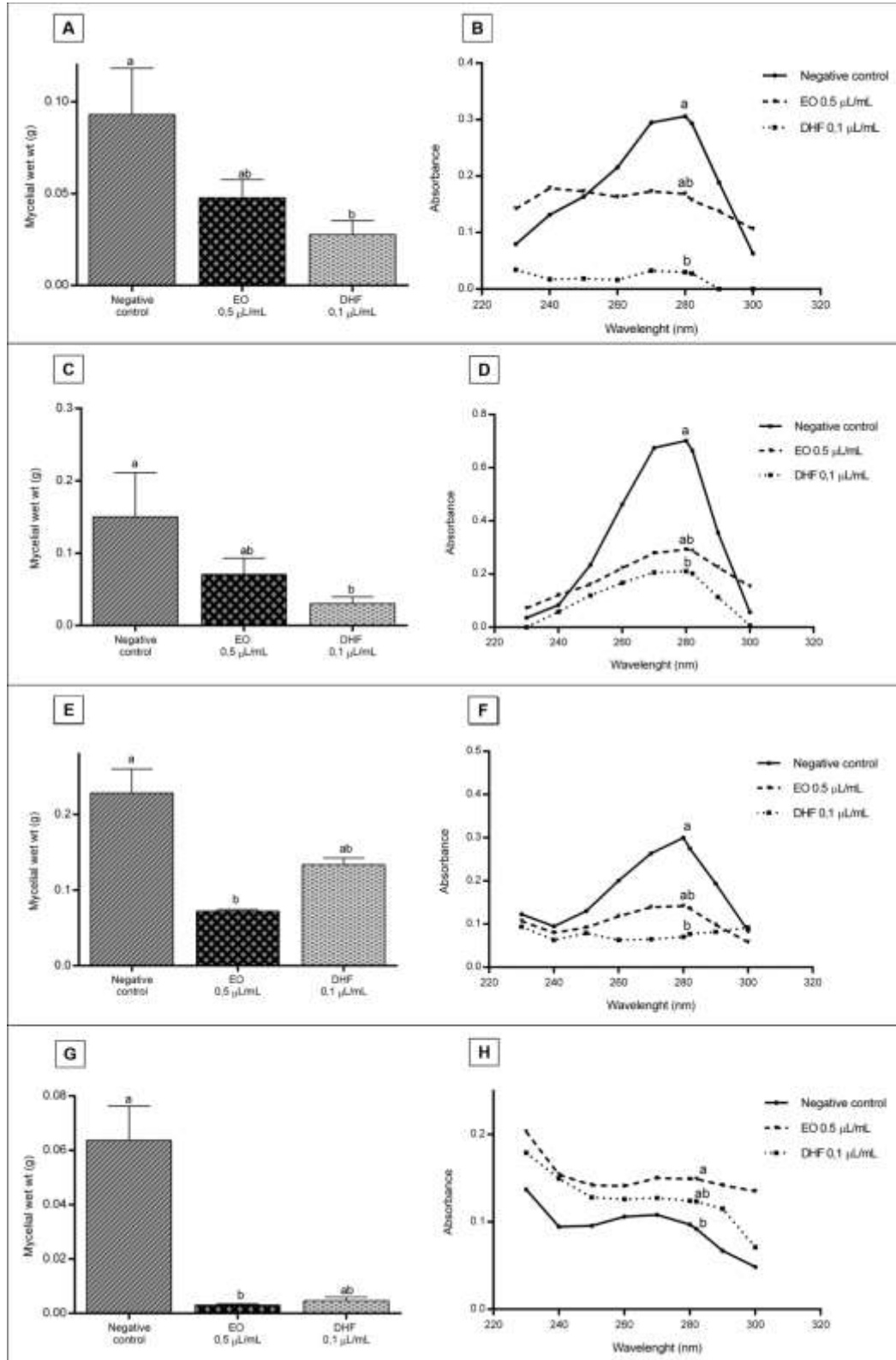
On the other hand, this increase in ergosterol content in *L. lepideus* when exposed to *N. grandiflora* EO may alternatively be explained by a hormesis effect. This phenomenon can be observed in all groups of organisms such as bacteria, fungi, angiosperms and animals (CALABRESE, 2005). Hormesis occurs when a toxic substance at high doses shows beneficial effects when applied at low doses (ARALDI, 2011).

Our observations revealed that *N. grandiflora* EO and DHF can affect the ergosterol content in white rot fungi. Compared to control group, the EO presented 54.48 % decrease, whereas DHF evoked a decrease of 83.46 % in sterol content in *G. applanatum*. For *T. versicolor*, the EO caused a decrease of 44.59 % in ergosterol content, while in presence of DHF the decrease observed was 89.69 %. However, the ergosterol contents of brown rot fungi were not affected by the extractive or its major compound, according to the ergosterol content reduction formula (TIAN et al., 2012).

The greatest decrease of ergosterol content was observed when both white rot fungi were exposed to DHF than when they grew in contact with the EO. The lower effect of the EO suggests the occurrence of an antagonistic action among DHF and one or more of the additional EO components. These components can activate compensatory mechanisms, resulting in adaptive responses by the fungus and a consequent reprogramming of gene expression to protect the cell wall structure, beyond down-regulation of ergosterol biosynthesis (PARVEEN et al., 2004; OUYANG; TAO; JING, 2016).

However, for *T. versicolor* and *L. lepideus*, the EO presented a greater effect in mycelial wet weight when compared to its major constituent. For these fungi, probably a positive interaction between the EO constituents, with potentiation, synergistic or additive effects, resulting in greater mass loss.

Figure 5 – Mycelial wet weight (g) and absorbance values of sterols extracted from *Ganoderma applanatum* (A, B), *Gloeophyllum trabeum* (C, D), *Trametes versicolor* (E, F) and *Lentinus lepideus* (G, H) mycelia growing in medium containing *Nectandra grandiflora* essential oil or (+)-dehydrofukinone.



Different letters indicate significant differences between treatments by Kruskal-Wallis test ($P < 0.05$).

Previous studies have reported that EO can result in a considerable reduction or oscillation in the production of ergosterol, which as the major sterol component of the fungal cell membrane is specific and important to fungi establishment (PINTO et al., 2009; AVANÇO et al., 2017). Since ergosterol is one of the principal sterol components in fungal membrane (NIEMENMAA; GALKIN; HATAKKA, 2008), generally a decrease in its content results in osmotic disturbances, disruption of cell growth and proliferation (TAO; OUYANG; JIA, 2014; KHAN et al., 2010; SUN et al., 2011). So, the antifungal mechanism of EOs is commonly attributed to the membrane disruption by their low-molecular weight and highly lipophilic components, which could pass easily through cell membranes and cause disruption of the fungal cell organization, causing a considerable impairment on the ergosterol content. Hence, the plasma membrane is also an important antifungal target (CHAO et al., 2005; HU et al., 2017).

The main class of compounds in the *N. grandiflora* EO are terpenes, as DHF, classified as sesquiterpenoid. Terpenes contained in EOs are usually are lipophilic molecules and this property could explain their damaging action on the cell walls of wood decay fungi. The EOs have a lower probability of generating microbial resistance because of their chemical complexity and their action mechanism (COWAN, 1999; COX et al., 2000). Besides the its capacity to disturb the cellular membrane, the antifungal mechanism of volatile compounds has been attributed to the interference with the cellular metabolism, reaction with active sites of enzymes, or action as H⁺ carriers (BAJPAI et al., 2013; ULTEE; BENNIK; MOEZELAAR, 2002). Some chemical fungicides exhibited their antifungal effect by blocking the ergosterol biosynthesis, which can give rise to the disruption of cell structure and function, even to the death of cell (HAMAMOTO et al., 2002; WANG et al., 2014).

Another intriguing aspect deals with the difference observed between the mycelial growth (mm) and the mycelial wet wt values (g) obtained to fungal species, since in the first parameter the treatments did not differ from controls. However, the difference is detected when the mycelial wet weight values were evaluated. This may have occurred because in weight evaluation, it is possible to measure the fungi vertical growth (mycelium thickness). Conversely, when evaluating fungal growth through parallel readings to the growth axis, it is not possible to quantify growth this parameter.

Our results indicated that *N. grandiflora* EO has antifungal activity against the white rot fungi *T. versicolor*. Conversely, the EO and DHF caused a decrease in

ergosterol content in both the white-rot fungi species. In this context, the plasma membrane is an important antifungal target of *N. grandiflora* EO and DHF on *T. versicolor* and *G. applanatum*. Therefore, future studies are needed to characterize other active EO components on fungi growth, as well as *in-situ* assays and toxicity evaluation. In addition, studies aiming to develop an adequate formulation with these extractives as wood preservatives need to be carried out, in order to overcome their volatility, as well as studies regarding to cost-benefit ratio.

The *N. grandiflora* EO completely inhibited growth of white-rot fungi *T. versicolor* at 1.0 and 2.0 $\mu\text{L L}^{-1}$, showing its potential to control the growth of this pathogen. Additionally, both EO and DHF reduced the ergosterol content in white-rot fungi *T. versicolor* and *G. applanatum*. These results corroborate to determine the potential of *N. grandiflora* EO and its major component as components of environmentally sustainable biopesticides.

REFERENCES

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy**. Illinois: Allured Publishing Corporation, 2009. 804 p.

ARALDI, D. B. **Interferência alelopática de extratos de *Hovenia dulcis* Thunb. na germinação e crescimento inicial de plântulas de *Parapiptadenia rígida* (Benth.) Brenan**. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal), 208 p. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brasil, 2011.

AVANÇO, G. B. et al. *Curcuma longa* L. essential oil composition, antioxidant effect, and effect on *Fusarium verticillioides* and fumonisin production. **Food Control**. v. 73, p. 806-813, 2017.

BADAWY, M. E. I.; ABDELGALEIL, S. A. M. Composition and antimicrobial activity of essential oils isolated from Egyptian plants against plant pathogenic bacteria and fungi. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 776-782, 2014.

BAJPAI, V. K.; SHARMA, A.; BAEK, K. H. Antibacterial mode of action of *Cudrania tricuspidata* fruit essential oil, affecting membrane permeability and surface characteristics of food-borne pathogens. **Food Control**. v. 32, p. 582–90, 2013.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils-a review. **Food Chemistry and Toxicology**, v. 46, p. 446-475, 2008.

BAKAR, E. S. et al. Durability of phenolic-resin-treated oil palm wood against subterranean termites a white-rot fungus. **Int. Biodeter. Biodeg**. v. 85, p. 126–130, 2013.

BAYRAMOGLU, M.; ARICA, M. Y. Immobilization of laccase onto poly (glucidylmethacrylate) brush grafted poly(hydroxythylmethacrylate) film. Enzymatic oxidation of phenolic compounds. **Materials Science and Engineering**. v. 6, n. 1, p. 1990-1997, 2009.

BELTRAME, J. M. et al. Estudo de obtenção de óleos essenciais e fatores de influência em sua composição. In: II ENDICI – Encontro de Divulgação Científica e Tecnológica. **Anais da...** Toledo. Universidade Federal do Paraná. P.31-35. 2010.

BENTO, T. S. et al. Growth inhibition and antioxidant response of wood decay fungi exposed to plant extracts of *Casearia* species. **Letters in Applied Microbiology**, v. 58, n. 1, p. 79-86, 2014.

BIANCHINI, N. H. **Óleos essenciais de *Blepharocalyx salicifolius* (H.B.K.) berg e *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez.** 2015. 51 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2015.

CALABRESE, E. J. Paradigm lost, paradigm found: The reemergence of hormesis as a fundamental dose response model in the toxicological sciences. **Environ. Pollution**, Geneva, n. 138, p. 379-411, 2005.

CHANDLER, D. et al. The development, regulation and use of biopesticides for integrated pest management. **Phil. Trans. R. Soc. B.** v. 366, p. 1987–1998, 2011.

CHAO, L. K. et al. Study on the antiinflammatory activity of essential oil from leaves of *Cinnamomum osmophloeum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 53, n. 18, p. 7274–7278, 2005.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 12, p. 564-582, 1999.

COX, S. D. et al. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). **Journal of Applied Microbiology**. v. 88, p. 170-175, 2000.

FINNEY, D. J. **Probit analysis**. University Printing House, Cambridge. 1971.

GARLET, Q. I. et al. Effect of (+)-dehydrofukinone on GABAA receptors and stress response in fish model. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 49, n. 1, p. 1-9, 2016.

GARLET, Q. I. et al. (+)-Dehydrofukinone modulates membrane potential and delays seizure onset by GABAa receptor-mediated mechanism in mice. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 332, p. 52–63, 2017.

GOODELL, B.; QIAN, Y.; JELLISON, J. Fungal decay of wood: soft rot- brown rot-white rot, development of commercial wood preservatives. **American Chemical Society**, 2008.

HAMAMOTO, H. et al. Tandem repeat of a transcriptional enhancer upstream of the sterol 14 α -demethylase gene (CYP51) in *Penicillium digitatum*. **Appl Environ Microb.** v. 66, p. 3421–3426, 2000.

HEINZMANN, B. M. et al. **Método de sedação e/ou anestesia em animais e uso de deidrofuquinona.** BR1020140136304, 2014.

HSU, F. L. et al. Effects of alkyl chain length of gallates on their antifungal property and potency as an environmentally benign preservative against wood-decay fungi. **International Biodeterioration and Biodegradation.** V. 63, n. 5, p. 543–547, 2009.

HU, Y. et al. Mechanisms of antifungal and anti-aflatoxigenic properties of essential oil derived from turmeric (*Curcuma longa* L.) on *Aspergillus flavus*. **Food Chemistry**, v. 220, p. 1-8, 2017.

JAVAD et al. Biological Activities of Essential Oils: From Plant Chemoecology to Traditional Healing Systems. **Molecules**, v. 22, n. 70, 2017.

KEDIA, A. et al. Antifungal and antiaflatoxigenic properties of *Cuminum cyminum* (L.) seed essential oil and its efficacy as a preservative in stored commodities. **International Journal of Food Microbiology.** v.168, ed. 169, p. 1–7, 2014.

KHAN, A. et al. *Ocimum sanctum* essential oil and its active principles exert their antifungal activity by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity. **Res Microbiol.** v. 161, p. 816–823, 2010.

LIZARRAGA, E. et al. A structural and vibrational study of dehydrofukinone combining FTIR, FTRaman, UV–visible and NMR spectroscopies with DFT calculations. **J. Mol. Struct.** v. 1048, p. 331–338, 2013.

NIEMENMAA, O.; GALKIN, S.; HATAKKA, A. Ergosterol contents of some woodrotting basidiomycete fungi grown liquid and solid culture conditions. **International Biodeterioration & Biodegradation.** v. 62, p. 125-134, 2008.

NIST. **NIST/EPANIH Mass Spectral Library & Search Program.** Hoboken: John Wiley & Sons, 2010.

OLIVEIRA, J. A. Efeito do tratamento fungicida em sementes e no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativa* L.) e pimentão (*Capsicum annum* L.). **Ciência e Prática.** v. 16, n.1, p. 42-47, 1992.

OUYANG, Q.; TAO, N.; JING, G. Transcriptional profiling analysis of *Penicillium digitatum*, the causal agent of citrus green mold, unravels an inhibited ergosterol biosynthesis pathway in response to citral. **BMC Genomics.** v. 17, p. 599, 2016.

PÁNEK, 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.

PINTO, E. et al. Antifungal activity of the clove essential oil from *Syzygium aromaticum* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. **Journal of Medical Microbiology**. v. 58, n. 11, p. 1454–1462, 2009.

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

SATISH, S. et al. Antifungal activity of some plant extracts against important seed borne pathogens of *Aspergillus* sp. **Journal of Agricultural Technology**. v. 3, n.1, p. 109-119, 2007.

SILVA, B. N. et al. Antifungal activity and inhibition of fumonisin production by *Rosmarinus officinalis* L. essential oil in *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg. **Food Chem**, v. 166, p. 330–336, 2015.

SILVA, D. T. et al. Chemical composition and inhibitory effects of *Nectandra grandiflora* leaves essential oil against wood decay fungi. **Drewno**, v.59, n. 197, 2016.

SILVA, D. T. **Caracterização química e atividades biológicas de extrativos obtidos de *Nectandra grandiflora* Nees e *Ocotea lancifolia* (Shott) Mez.** 2016, 161p. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2016.

SUN, X. P. et al. PdCYP51B, a new putative sterol 14a–demethylase gene of *Penicillium digitatum* involved in resistance to imazalil and other fungicides inhibiting ergosterol synthesis. **Appl Microbiol Biot**. v. 91, p. 1107–1119, 2011.

TAO, N. G.; OUYANG, Q. L.; JIA, L. Citral inhibits mycelial growth of *Penicillium italicum* by a membrane damage mechanism. **Food Control**. v. 41, p. 116–121, 2014.

TIAN, J. et al. The control of *Aspergillus flavus* with *Cinnamomum jensenianum* Hand.-Mazz essential oil and its potential use as a food preservative. **Food Chemistry**, v. 130, p. 520–527, 2012.

ULTEE, A.; BENNIK, M. H. J.; MOEZELAAR, R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food–borne pathogen *Bacillus cereus*. **Appl Environ Microb**. v. 68, p. 1561–1568, 2002.

VARMA, J.; DUBEY, N. K. Efficacy of essential oils of *Caesulia axillaris* and *Mentha arvensis* against some storage pests causing biodeterioration of food commodities. **Int J Food Microbiol**. v. 68, p. 207–210. 2001.

VILLAVERDE, J. J. et al. Biopesticides from natural products: current development, legislative framework, and future trends. **BioResources**. v.11, p. 5618–5640, 2016.

VODA, K. et al. Effect of the antifungal activity of oxygenated aromatic essential oils compounds on the white-rot *Trametes versicolor* and the brown-rot *Coniophora puteana*. **International Biodegradation and Biodeterioration**. v. 51, n. 1, p. 51-59, 2003.

WANG, H. W. et al. Comparative seasonal variation and chemical composition of essential oils from the leaves and stems of *Schefflera heptaphylla* using microwave-assisted and conventional hydrodistillation. **Ind. Crops Prod.** v. 36, p. 229–237, 2012.

WANG, J. L. et al. Novel mutations in CYP51B from *Penicillium digitatum* involved in prochloraz resistance. **J Microbiol.** v. 52, p. 762–770, 2014.

WHITE, T. C.; MARR, K. A.; BOWDEN, R. A. Clinical, cellular and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. **Clin Microbiol Rev.** v. 11, p. 382–402, 1998.

WILLIAMS, C. M.; MANDER, L. N. Chromatography with silver nitrate. **Tetrahedron.** v. 57, p. 425-447, 2001.

XIE, Y. J. et al. Chemical variation in essential oil of *Cryptomeria fortunei* from various areas of China. **Ind. Crops Prod.** v.36, p. 308–312, 2012.

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.

ZABEL, R. A.; MORRELL, J. J. Wood microbiology: decay and its prevention. San Diego: **Academic Press**, 1992. 476p.

ZHANG, Z. et al. **International Biodeterioration & Biodegradation.** v. 106, p. 157-160, 2016.

4 DISCUSSÃO

O OE de *N. grandiflora* apresenta predominantemente terpenos em sua composição química. Prsic et al. (2004) descreveram que diversas diterpeno sintases estão envolvidas na biossíntese de fitoalexinas e do fitormônio giberelina. Adicionalmente, já foi descrito na literatura que os sesquiterpenos, como o constituinte majoritário do OE de *N. grandiflora*, a DHF, contribuem direta ou indiretamente na defesa contra o ataque de herbívoros. Já os diterpenoides, como o rimueno e kaureno presentes no extrativo avaliado, proporcionam proteção direta da espécie produtora, podendo ser classificados como fitoalexinas (PHILLIPS; CROTEAU, 1999). As fitoalexinas são compostos de baixo peso molecular produzidas pelo sistema de defesa das plantas e, em muitas espécies vegetais, os diterpenos e sesquiterpenos podem agir como fitoalexinas (CHENG et al., 2007).

Atrelado a isso destaca-se que, tanto o crescimento quanto o desenvolvimento das plantas são regulados pela ação e pelo balanço de diferentes grupos de reguladores de crescimento, que promovem ou inibem tais processos (CHENG et al., 2007). Em técnicas de cultura de tecidos, é corriqueiro o uso destes reguladores de crescimento, por meio da suplementação dos cultivos com giberelinas, auxinas, citocininas (SOUZA et al., 2010; DIAS et al., 2012). Entretanto, estes autores ressaltam que devem ser avaliadas baixas concentrações destes reguladores vegetais. O mesmo foi observado quando o OE foi avaliado em cultivos *in vitro* de explantes de *E. involucrata*, uma vez que os mesmos não sobreviveram quando expostos a altas concentrações do OE.

Dentre os fitormônios existentes, destaca-se a giberelina, classificada como diterpeno (TAIZ; ZEIGER 2004; SPARTZ; GRAY 2008). Dentre outras funções, este regulador de crescimento participa da divisão celular e do crescimento da parte aérea dos vegetais (TAIZ; ZEIGER, 2009). Neste sentido, devido à semelhança na estrutura química entre os constituintes do OE de *N. grandiflora* e a giberelina, os terpenoides presentes neste extrativo podem ter colaborado para o estabelecimento dos explantes de *E. involucrata*, justificando o incremento no número de folhas emitidas pelos explantes quando expostos a baixas concentrações do OE de *N. grandiflora*.

Os compostos do metabolismo secundário derivados de plantas, como os OEs, geralmente apresentam mais de um modo de ação sobre o metabolismo das plantas e demais organismos com os quais os vegetais interagem. Conseqüentemente, as

combinações dos diferentes efeitos em distintos níveis tornam eficazes as ações desses compostos sobre o metabolismo de diferentes seres vivos e, especificamente, dos vegetais e, ao mesmo tempo, dificulta o estabelecimento de seus diferentes modos de ação de maneira precisa (MORRISSEY, 2009). Esta relação pode ser estabelecida com os resultados encontrados no Manuscrito 1. Inicialmente, o objetivo do experimento foi verificar o potencial dos OEs para o controle de agentes contaminantes que dificultam o crescimento e estabelecimento dos explantes de *E. involucrata* cultivados *in vitro*. Então, elegeu-se o OE de *N. grandiflora* para esta finalidade, considerando que já haviam sido descritas na literatura atividades antifúngicas (SILVA et al., 2016) e antibacterianas (CUNICO et al., 2010) para este extrativo.

Entretanto, durante a avaliação do experimento, percebeu-se que a adição de baixas concentrações do OE supracitado ao meio de cultura, apesar de não ter inibido o desenvolvimento de fungos e bactérias, proporcionou um incremento significativo no número de folhas emitidas pelos explantes quando comparados ao controle. Como consequência, houve um reflexo no aumento da porcentagem de estabelecimento das plântulas cultivadas *in vitro*.

Com base no exposto, ressalta-se a benesse que os OEs podem proporcionar aos explantes de *E. involucrata* cultivados *in vitro*, uma vez que pode haver uma combinação das diferentes atividades dos seus constituintes químicos em um único produto. Adicionalmente, destaca-se o ineditismo deste trabalho, sendo que não foram encontrados relatos na literatura sobre o uso de OEs como bioestimulantes em explantes de espécies lenhosas cultivados *in vitro*. Desta maneira, abre-se caminhos para uma nova linha de pesquisa, com o intuito de verificar o uso potencial tanto de OEs e suas substâncias isoladas quanto de extratos de diferentes espécies vegetais para atuarem como bioestimulantes e/ou reguladores de crescimento de espécies lenhosas cultivadas *in vitro*.

Em relação às atividades biológicas dos componentes químicos dos OEs, Graña et al. (2013) relataram que o monoterpene citral apresentou fitotoxicidade durante a germinação e o crescimento de *Arabidopsis thaliana*, além de ocasionar um grau de desorganização morfológica e estrutural dos meristemas de raiz. Estes autores relataram também que o monoterpene alterou o conteúdo de auxina e interferiu na divisão celular, além de ter promovido a desorganização sobre a ultraestrutura celular em mudas de *A. thaliana*. Adicionalmente, Romagni et al. (2000)

relataram que monoterpenos, como o 1,8-cineol, inibiram os índices mitóticos em *Echinochloa cruss-galli* e *Cassia obtusifolia*. Com base no exposto, ressalta-se que os compostos voláteis nem sempre apresentam efeitos benéficos para as plantas. Ao mesmo tempo em que podem beneficiar o desenvolvimento de determinada espécie, podem apresentar toxicidade frente a outras plantas. O mesmo raciocínio é válido para as concentrações do extrativo avaliadas nos experimentos.

No que diz respeito às diversas classes de metabólitos secundários existentes, destacam-se os isoprenoides, também chamados de terpenos ou terpenoides (PRINS; VIEIRA; FREITAS, 2010). Essa classe de metabólitos secundários é muito importante devido às suas funções biológicas como atração de polinizadores e dispersores de sementes, proteção contra herbívoros, alelopatia (PARÉ; TUMLINSON, 1999), dentre outras. Adicionalmente, os isoprenoides podem ocorrer também como metabólitos primários, tendo como representantes a plastoquinona, a giberelina, brassinosteroides e carotenoides (RODRIGUEZ-CONCEPCIÓN; BORONATO, 2002). Como pode ser visualizado a Tabela 1, os terpenoides podem ser classificados de acordo com o número de unidades de carbono, sendo que suas moléculas apresentam, via de regra, número de carbonos múltiplo de 5.

Tabela 1 - Condensação de unidades de isopreno na formação de terpenoides.

Número de unidades de isopreno	Número de átomos de carbono	Nome ou classe
1	5	Isopreno
2	10	Monoterpenoides
3	15	Sesquiterpenoides
4	20	Diterpenoides
5	25	Sesterpenoides
6	25	Triterpenoides
8	40	Tetraterpenoides
N	N	Polisoprenoides

Fonte: Simões et al. (2000), adaptado.

Em relação aos constituintes químicos presentes no OE de *N. grandiflora*, destaca-se a classe dos componentes majoritários presentes no extrativo, os sesquiterpenoides. Estes constituintes fazem parte dos terpenoides, grupo mais abundante e estruturalmente diversificado de metabólitos secundários oriundos de plantas (PASCHOLD et al., 2006; CHENG et al., 2007). Os terpenoides podem ser produzidos em órgãos como tecidos vegetativos, flores e ocasionalmente em raízes (DUDAREVA et al., 2004) e desempenham um importante papel nas interações planta-inseto, planta-patógeno e planta-planta (PASCHOLD et al., 2006).

Atrelado a isto, foi relatado que o uso de diversos produtos naturais no tratamento terapêutico possui uma ação sinérgica expressiva quando combinados com o uso de antibióticos (SOUSA et al, 2011; FIGUEREDO et al, 2013). Com base no exposto, considerando a diversidade e a complexidade dos constituintes químicos presentes no OE de *N grandiflora*, pode ter ocorrido um efeito sinérgico ou aditivo entre as substâncias presentes no extrativo (SILVA et al., 2016) com os reguladores de crescimento, beneficiando o estabelecimento dos explantes micropropagados. Desta maneira, ressalta-se o potencial deste OE para atuar como regulador de crescimento e/ou bioestimulante em explantes de *E. involucrata* cultivados *in vitro*, tanto de forma isolada quanto concomitante a fitormônios de uso convencional. Como consequência, pode-se diminuir ou até mesmo suprimir o seu uso dos produtos comerciais, diminuindo os custos de cultivo.

Outro aspecto interessante em relação aos terpenoides, como os diterpenos e sesquiterpenos presentes no OE de *N. grandiflora*, é o fato de eles serem descritos também como fitoalexinas, que atuam na defesa direta de plantas contra herbívoros e patógenos microbianos (CHENG et al., 2007). Corroborando ao exposto, Saharkhiz et al. (2011) relataram que as plantas medicinais e aromáticas e/ou seus metabólitos secundários, poderiam ter seu uso potencializado como pesticidas, herbicidas ou fungicidas em sistemas de agricultura orgânica e/ou como preservante natural de alimentos e antioxidantes alimentares. Adicionalmente existem relatos na literatura de que os sesquiterpenos apresentam também importantes atividades biológicas, como propriedades antibacterianas e atividade citotóxica moderada (LIMBERGER et al, 2004). Constantin et al. (2001) descreveram que os constituintes α - e β - pineno, biciclogermacreno, β -cariofileno, espatulenol e germacreno-D obtidos a partir do OE de *Piper cernuum* apresentaram atividade antimicrobiana frente a *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus*.

Além dos efeitos benéficos mencionados anteriormente para os metabólitos secundários, destaca-se que estes constituintes químicos também são fontes promissoras de substâncias ativas para combater fungos apodrecedores da madeira. Prashar et al. (2003) relataram que os OEs podem apresentar atividade tanto frente a leveduras quanto a fungos filamentosos. Diversos estudos já relataram o uso potencial de OEs para esta finalidade, como por exemplo os óleos obtidos de *Cinnamomum osmophloe*, *Eucalyptus camaldulensis*, *Piper gaudichaudianum* e a própria *N. grandiflora*, bem como o uso de algumas de suas substâncias puras (WANG et al., 2005; MAREI et al., 2012; SCHINDLER, 2013; SALEM et al., 2016; SILVA et al., 2016; TRES, 2016). Esta afirmação vem ao encontro dos resultados encontrados no Manuscrito 2, onde destaca-se que o OE de *N. grandiflora* inibiu totalmente o crescimento do fungo causador de podridão-branca *T. versicolor*, nas concentrações de 1.0 e 2.0 $\mu\text{L mL}^{-1}$.

Silva et al. (2016) avaliaram a atividade antifúngica tanto do OE de *N. grandiflora* quanto do seu constituinte majoritário frente a fungos apodrecedores da madeira *P. sanguineus* e *G. trabeum*. Os resultados evidenciaram que o OE foi efetivo na inibição dos fitopatógenos, sendo que o fungo causador de podridão-parda apresentou maior vulnerabilidade ao efeito do OE em relação ao constituinte majoritário. Isto pode indicar que houve um efeito sinérgico ou aditivo entre as substâncias químicas presentes no OE de *N. grandiflora*. Já nos testes realizados com o composto isolado frente ao fungo de podridão-branca, os resultados não diferiram daqueles encontrados nos tratamentos com o OE, sugerindo que a atividade do OE tenha sido causada pelo seu componente majoritário.

OEs de outras espécies do gênero *Nectandra* também já foram estudados para o controle de fungos apodrecedores da madeira. O OE de *N. megapotamica* inibiu o crescimento do fungo causador de podridão-parda *G. trabeum* em cerca de 59% a 1,0 $\mu\text{L mL}^{-1}$, ao passo que inibiu 58% do crescimento do fungo *P. sanguineus* nesta mesma concentração (BIANCHINI, 2015). Em relação à composição química do OE de *N. megapotamica*, o extrativo apresentou como constituintes majoritários predominantemente hidrocarbonetos monoterpenicos, como α -selineno, α -pineno, β -pineno e sabineno, bem como o hidrocarboneto sesquiterpênico biciclogermacreno. Alguns destes constituintes fazem parte da composição química do OE de *N. grandiflora*, e mesmo estando em baixas concentrações, podem ter contribuído para inibir o crescimento dos fitopatógenos avaliados.

Em relação aos fungos causadores de podridão-branca na madeira, Bayramoglu e Arica (2009) relataram que o fitopatógeno *T. versicolor* apresentou uma alta produção da enzima extracelular ligninolítica lacase. Esta enzima degrada a lignina e desativa continuamente os compostos fenólicos com alta atividade antifúngica presentes no OE por eles avaliado. Pánek et al. (2014) corrobora esta afirmação, informando que *T. versicolor* mostrou ser menos sensível ao efeito de OEs e aos compostos isolados avaliados no seu estudo. Entretanto, os resultados apresentados no Manuscrito 2 destacam o oposto. Dentre os fungos avaliados, *T. versicolor* mostrou ser o mais sensível ao efeito do OE de *N. grandiflora*, uma vez que na concentração de $1 \mu\text{L mL}^{-1}$, o extrativo inibiu totalmente o seu crescimento. Isto demonstra o potencial deste OE para o controle deste fitopatógeno, já que diversos autores relataram ter encontrado dificuldades para inibir o crescimento deste fungo (VODA et al., 2003; BAYRAMOGLU; ARICA, 2009; PÁNEK et al., 2014). No entanto, futuramente deverão ser realizados testes adicionais para verificar se o OE apresentou efeito fungicida ou fungitóxico. Corroborando o exposto, Mariano (2017) relatou que o OE de *Melaleuca alternifolia* apresentou toxidez frente ao fungo *T. versicolor* a uma concentração de 0,060% e 0,080%.

Contudo, Tres (2016) verificou o potencial do OE de *Piper gaudichaudianum* e seu constituinte majoritário frente a fungos causadores de podridão-branca (*T. versicolor*) e parda (*G. trabeum*) na madeira. Os resultados encontrados evidenciaram que, dentre as espécies fúngicas avaliadas, o fungo causador de podridão-branca *T. versicolor* também demonstrou maior suscetibilidade aos extrativos avaliados.

No que tange ao modo de ação destes extrativos nos fungos apodrecedores da madeira, diversos estudos demonstraram que a membrana plasmática fúngica é um dos principais alvos para a ação antifúngica dos OEs. Isto porque a membrana plasmática desempenha um papel vital na manutenção de um ambiente homeostático, troca de materiais e transferência de energia e informação na célula, para mantê-la saudável e viva. Na membrana celular fúngica, o ergosterol é o principal componente da classe dos esteróis, sendo responsável por manter a função e a integridade das células fúngicas, além de regular a fluidez da membrana, a permeabilidade e a atividade de muitas enzimas ligadas a ela, desempenhando um papel fundamental no crescimento celular. De acordo com diferentes estudos, a interrupção das vias biossintéticas de esteróis por substâncias naturais ou sintéticas inibiu o crescimento

de fungos causadores de podridão-branca e podridão-parda na madeira, além de espécies como *Candida* spp., *Aspergillus* spp. e dermatófitos (RODRIGUEZ et al., 1985; NIEMENMAA; GALKIN; HATAKKA, 2008; PINTO et al., 2009; TIAN et al., 2012; PARVEEN et al., 2004; AVANÇO et al., 2017; HU et al., 2017;).

Existem relatos na literatura de diferentes metodologias utilizadas para determinar o conteúdo de ergosterol contido em fungos. Niemenmaa et al. (2008) avaliaram o conteúdo de ergosterol existente em basidiomicetos causadores de podridão-branca e podridão-parda. A avaliação foi realizada semanalmente, durante 35 dias, em meio de cultivo líquido, em ágar e em blocos de madeira. As análises foram feitas por Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC).

Considerando a natureza lipofílica dos monoterpenos e outros constituintes de OEs obtidos a partir de plantas, a presença destes extrativos no meio de cultura pode promover o estresse no ambiente celular lipídico (PARVEEN et al., 2004). Estes autores relatam ainda que o estresse pode induzir uma reprogramação genômica, visando evitar a desintegração da arquitetura da parede celular. Corroborando o exposto, Ouyang et al. (2016) relataram que o citral apresentou atividade antifúngica frente ao fungo *Penicillium digitatum* e, após análises realizadas por RNA-Seq., os autores verificaram que o composto promoveu uma diminuição na biossíntese do ergosterol. Em relação ao estresse causado pelos extrativos no ambiente celular, Parveen et al. (2004) relataram que os genes relacionados ao metabolismo celular de lipídios e ácidos graxos, à estrutura e organização da parede celular, à detoxificação e o transporte celular foram estimulados em células tratadas com terpineno, como forma de defesa frente ao extrativo.

Um estudo realizado por Kelly et al. (1995), afirma que o mecanismo de ação primária pelo qual os fármacos antifúngicos azólicos inibem o crescimento da espécie de levedura *Saccharomyces cerevisiae* é a interrupção das vias biossintéticas normais dos esteróis, resultando em uma diminuição da biossíntese de ergosterol. Adicionalmente, vários estudos têm demonstrado que os OEs também podem causar uma redução considerável na quantidade de ergosterol em diversas espécies fúngicas (PINTO et al., 2009; TIAN et al., 2012; HU et al., 2017; AVANÇO et al., 2017).

Outro benefício já descrito para o uso de OEs é a diminuição do risco de resistência, uma vez que sua complexidade química dificulta o seu aparecimento, já que seus compostos podem atuar por meio de diferentes mecanismos antimicrobianos e também de interação com os agentes antimicrobianos de uso convencional

(BERTINI et al., 2005; BAKKALI et al., 2008). Adicionalmente, Fica (2004) relata que diversos antifúngicos utilizados no tratamento de infecções causadas por *Candida* spp., além de produzirem efeitos colaterais, frequentemente induzem à resistência dos fungos. Este autor relatou também que o efeito sinérgico observado por meio do uso de OEs pode aumentar o efeito antifúngico e diminuir a resistência observada.

No que tange à atividade antibacteriana dos OEs, estes extrativos podem atuar como modificadores da atividade antibiótica (RODRIGUES et al., 2009; TINTINO et al., 2013). Isto porque uma potencialização pode ser promovida por meio de um aumento na atividade, causando alterações na permeabilidade da membrana celular, tornando a mesma mais permeável à absorção de antibióticos e/ou causando perda de conteúdo celular vital (BURT et al., 2004). O estudo realizado por Sheldon (2005) vem ao encontro destas informações. Este autor relata que dentre os mecanismos pelos quais os OEs podem intensificar a ação de antibacterianos de uso convencional, destaca-se o aumento da permeabilidade da membrana, permitindo maior entrada do produto, impedindo o sistema de efluxo bacteriano.

O uso concomitante de OEs e antifúngico comercial para o controle de fungos dermatófitos foi descrito por Danielli et al. (2017). Estes autores descreveram que os OEs de *N. lanceolata* e *N. megapotamica* apresentaram efeito antidermatófito e afinidade pelo ergosterol, o que indica um possível envolvimento na membrana fúngica em sua ação. Adicionalmente, os autores relataram que a combinação dos extrativos com o antifúngico comercial apresentou efeito sinérgico e aditivo na maioria dos isolados fúngicos, reduzindo a concentração ativa dos agentes antifúngicos quando combinados aos OEs. Considerando que os preservantes da madeira de uso convencional apresentam elevada toxicidade (REINPRECHT, 2010), o uso combinado de OEs com os produtos químicos pode ser uma alternativa para reduzir a quantidade utilizada em tratamentos de preservação da madeira.

Em se tratando do rendimento e da composição química do OE de *N. grandiflora* apresentada nos Manuscritos 1 e 2, a sutil diferença observada deve-se as diferentes épocas do ano em que as coletas do material vegetal foram realizadas. As folhas utilizadas para a obtenção do OE empregado na realização dos testes biológicos e análise química no Manuscrito 1 foram coletadas durante o verão, em janeiro de 2016. Entretanto, a coleta do material vegetal para o Manuscrito 2 foi realizada durante a primavera, em novembro de 2016. Apesar de ambas as coletas terem sido realizadas durante o mesmo ano e na mesma população, é natural que os

constituintes encontrados não sejam exatamente os mesmos. Isto porque diversos fatores podem afetar o comportamento de produtos do metabolismo secundário, como estágio de desenvolvimento da planta, sazonalidade, temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, sanidade, entre outros fatores (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

No que tange às dificuldades encontradas para a viabilização da aplicação dos OEs a campo como preservantes da madeira ou como bioestimulante em cultivos *in vitro*, destaca-se a sua volatilidade (BATISH et al., 2008) e o relativamente baixo rendimento de extração, devido à pouca quantidade produzida pela planta (NASCIMENTO et al., 2007). Entretanto, esta limitação pode ser contornada por meio do uso da nanotecnologia, que favorece o sistema de controle do crescimento dos fitopatógenos por promover uma liberação gradual e a fotoproteção dos componentes ativos presentes nos OEs (SOUZA, 1999), além de diminuir a lixiviação (PERES, 2015). Este fato implica consequentemente na redução da quantidade de extrativo a ser aplicada e no direcionamento do efeito dos componentes ativos, reduzindo a volatilidade e perda por fatores externos (KUMAR et al., 2014).

Portanto, sugere-se que futuramente seja realizado o preparo de nanoemulsões tanto com o OE de *N. grandiflora* quanto com a DHF, visando diminuir sua volatilidade e potencializar seu efeito. Adicionalmente, a realização de testes com esta nanoemulsão em corpos de prova de madeira frente ao fungo *T. versicolor* também se faz necessária, já que este apresentou maior susceptibilidade frente aos extrativos avaliados. Outro aspecto a ser considerado é que a caracterização do modo de ação dos extrativos avaliados sobre o crescimento dos fungos de podridão-parda anda precisa ser estudada, além de realizar ensaios *in situ* e a avaliação da sua toxicidade.

5 CONCLUSÃO

- O uso do OE obtido a partir das folhas de *N. grandiflora* estimulou a emissão de folhas em explantes de *E. involucrata* cultivados *in vitro*, o que sugere um possível potencial para atuar como bioestimulante para esta espécie lenhosa;
- A adição do OE de *N. grandiflora* ao meio de cultivo *in vitro* não apresentou influência sobre o grau de contaminação microbiana e oxidação fenólica nos explantes de *E. involucrata*;
- O uso do OE de folhas de *N. grandiflora* na concentração de 1,0 e 2,0 $\mu\text{L L}^{-1}$ inibiu completamente o crescimento micelial do fungo causador de podridão-branca *T. versicolor*, evidenciando o potencial deste extrativo para controlar o crescimento deste fitopatógeno;
- O OE de *N. grandiflora* não foi eficiente para o controle do crescimento micelial dos fungos *G. applanatum*, *G. trabeum* e *L. lepideus* nas concentrações avaliadas;
- Os tratamentos com o constituinte majoritário DHF não diferiram estatisticamente dos tratamentos com OE para todos os fungos avaliados;
- Tanto o OE de folhas de *N. grandiflora* quanto o seu constituinte majoritário reduziram o conteúdo de ergosterol nos fungos causadores de podridão-branca *T. versicolor* e *G. applanatum*.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy**. Illinois: Allured Publishing Corporation, 2009. 804 p.
- AMUSANT, N. et al. Chemical compounds from *Eperua falcata* and *Eperua grandiflora* heartwood and their biological activities against wood destroying fungus (*Coriolus versicolor*). **Holz als Roh- UND Werkstoff**. v. 65, n. 1, p. 23-28, 2005.
- ANDRADE, M. W.; LUZ, J. M. Q.; LACERDA, A. S. et al. Micropropagação de aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. Allemão). **Ciência Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, n. 1, p. 174-180, 2000.
- ARALDI, D. B. **Interferência alelopática de extratos de *Hovenia dulcis* Thunb. na germinação e crescimento inicial de plântulas de *Parapiptadenia rígida* (Benth.) Brenan**. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal), 208 p. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brasil, 2011.
- AVANÇO, G. B. et al. *Curcuma longa* L. essential oil composition, antioxidant effect, and effect on *Fusarium verticillioides* and fumonisin production. **Food Control**. v. 73, p. 806-813, 2017.
- BACKES, A.; IRGANG, B. **Árvores do Sul: guia de identificação e interesse ecológico**. Porto Alegre: Pallotti, 2002.
- BADAWY, M. E. I.; ABDELGALEIL, S. A. M. Composition and antimicrobial activity of essential oils isolated from Egyptian plants against plant pathogenic bacteria and fungi. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 776-782, 2014.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils-a review. **Food Chemistry and Toxicology**, v. 46, p. 446-475, 2008.
- BARRETT-BEE K; DIXON G. Ergosterol biosynthesis inhibition: a target for antifungal agents. **Acta biochimica Polonica**.v. 42, p. 465-479, 1994.
- BASSAN, J.S. et al. Oxidação fenólica, tipo de explante e meios de cultura no Estabelecimento *in vitro* de canafístula (*Peltophorum dubium* (SPRENG.) TAUB.). **Ciência Florestal**. v. 16, n. 4, p. 381-390, 2006.
- BATISH, D. R. et al. Eucalyptus essential oil as a natural pesticide. **Forest Ecology and Management**. v. 256, n. 12, p. 2166-2174. 2008.
- BAYRAMOGLU, M.; ARICA, M. Y. Immobilization of laccase onto poly (glucidylmethacrylate) brush grafted poly(hydroxyethylmethacrylate) film. Enzymatic oxidation of phenolic compounds. **Materials Science and Engineering**. v. 6, n. 1, p. 1990-1997, 2009.

BELTRAME, J. M. et al. Estudo de obtenção de óleos essenciais e fatores de influência em sua composição. In: II ENDICI – Encontro de Divulgação Científica e Tecnológica. **Anais da...** Toledo. Universidade Federal do Paraná. P.31-35. 2010.

BENTO, T. S. et al. Growth inhibition and antioxidant response of wood decay fungi exposed to plant extracts of *Casearia* species. **Letters in Applied Microbiology**, v. 58, n. 1, p. 79-86, 2014.

BERTINI, L. M. et al. Sensibility profile of bacteria against essential oils of some plants of the Northeast of Brazil. **Infarma**, v. 17, p. 80-83, 2005.

BIANCHINI, N. H. **Óleos essenciais de *Blepharocalyx salicifolius* (H.B.K.) berg e *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez.** 2015. 51 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2015.

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.

BRITO, J. P.; OLIVEIRA, J. E. M.; BARTOLI, S. A. Toxicidade de óleos essenciais de *Eucalyptus* spp. Sobre *Callosobruchus maculatus* (Fabr., 1775) (Coleoptera: Bruchidae). **Revista de Biologia e Ciênci da Terra**, v. 6, n.1, p. 96-103, 2006.

BUDIJA, F. et al. Possibilities of use of própolis for wood finishing. **Wood Research**. v. 53, n. 2, p. 91-101, 2008.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in food: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, p. 223-253, 2004.

CARVALHO, P. E. **Espécies arbóreas brasileiras.** Brasília: EMBRAPA Informações Tecnológicas; Colombo: EMBRAPA Florestas, 2008. v.3, 593 p.

CARVALHO, W. et al. Uma visão sobre a estrutura, composição e biodegradação da madeira. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 8, p. 1-5, 2009.

CASTRO, P. R. E.; VIEIRA, E. L. **Aplicações de reguladores vegetais na agricultura tropical.** Guaíba: Agropecuária, 2001. 588 p

CHENG, A. et al. X. Plant Terpenoids: Biosynthesis and Ecological Functions. **Journal of Integrative Plant Biology**. v. 49, n. 2, p. 179–186. 2007.

CONSTANTIN, M. B. et al. Essential oils from *Piper cernuum* and *Piper regnellii*: Antimicrobial activities and analysis by GC/MS and ¹³C-NMR. **Planta Medica**, v. 67, p. 771-773, 2001.

CORRÊA, M. P. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas.** Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1984. 646 p.

COSTA, M. G. C.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; OTONI, W. C. Importância das contaminações e dos microrganismos endêmicos na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas. In: SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. (Ed.). Contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas. Brasília, DF: **Embrapa Informação Tecnológica**, p. 17-60, 2010.

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

DANIELLI, L. J. et al. Chemosensitization of filamentous fungi to antifungal agents using *Nectandra* Rol. ex Rottb. species essential oils. **Industrial crops and products**. v. 102, p. 7-75, 2017.

DÉON, G. **Manual de Preservação da Madeira em Clima Tropical**. Série Técnica 3, Yokohama: ITTO. 116pp, 1989.

DIAS, J. P. T. et al. Biostimulante na promoção da brotação de estacas de raiz de amoreira-preta. **Ver. Bras. Frutic.** v. 34, n. 1, p. 001-007, 2012.

DINIZ, A. C. B.; ASTARITA, L. V.; SANTARÉM, E. R. Alterações dos metabólitos secundários em plantas de *Hypericum perforatum* L. (Hypericaceae) submetidas à secagem e ao congelamento. **Acta Botânica Brasílica**, v. 21, n. 2, p. 443-450, 2007.

DUDAREVA, N. et al. (E)- β -Ocimene and myrcene synthase genes of floral scent biosynthesis in snapdragon: Function and expression of three terpene synthase genes of a new terpene synthase subfamily. **Plant Cell**. v.15, p. 1227–1241, 2003.

ETIENNE, H.; BERTHOULY, M. Temporary immersion systems in plant micropropagation. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 69, n. 3, p. 215-231, 2002.

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

FAZOLIN, M. et al. Propriedade inseticida dos óleos essenciais de *Piper hispidinervum* C. DC.; *Piper aduncum* L. e *Tanaecium nocturnum* (Barb. Rodr.) Bur. & K. Shum sobre *Tenebrio molitor* L., 1758. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 1, p. 113-120, 2007.

FENG, W.; ZHENG, X. Essential oils to control *Alternaria alternate* *in vitro* and *in vivo*. **Food Control**, v. 18, p. 1126-1130, 2007.

FERREIRA, D. F. **Sistemas de análise estatística para dados balanceados**. Lavras: UFLA/ DEX/SISVAR, 2000.145p.

FICA, A. C. Tratamiento de Infecciones Fungicas Sistémicas- Primeira Parte: Fluconazol, Itraconazol y Voriconazol. **Revista Chilena de Infectologia**, v. 21, p. 26-38, 2004.

FIGUEREDO, F. G. et al. Modulation of the antibiotic activity by extracts from *Amburana cearensis* A. C. Smith and *Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan. **Biomed Research International**, v. 1013, p. 1 – 5, 2013.

FONSECA, S.; FREIRE, H. Sementes recalcitrantes: problemas na pós colheita. **Bragatina**, v. 62, n. 2, p. 297-303, 2003.

GARCIA-GONZALES, R. et al. Plant tissue culture: Current status, opportunities and challenges. **Ciencia e Investigación Agraria**, Santiago, Chile, v. 37, n. 3, p. 5-30, 2010.

GARLET, Q. I. et al. Antimicrobial activity of (+)- Dehydrofukinone isolated from *Nectandra grandiflora* essential oil. In: 47° Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2015, Água de Lindóia. **Anais... Água de Lindóia: 2015.**

GARLET, Q. I. et al. Effect of (+)-dehydrofukinone on GABAA receptors and stress response in fish model. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 49, n. 1, p. 1-9, 2016.

GEORGE, E. F. Plant tissue procedure - Background. In: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; GEORGE, E. F.; DEBERGH. Micropropagation: Uses and Methods. In: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G.-J. (Ed.). Plant propagation by tissue culture. 3. ed. **Dordrecht: Springer**, v. 1, p. 29-64, 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.

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

GOLLE, D. P. **Estabelecimento, multiplicação, calogênese, organogênese *in vitro* e análise da diversidade genética em acessos de *Eugenia involucrata* DC.** 2010. 159 p. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal De Santa Maria, Santa Maria, 2010.

GOYAL, A. K. et al. Micropropagation and assessment of genetic fidelity of *Dendrocalamus strictus* (Roxb.) nees using RAPD and ISSR markers. 3 **Biotech** v.5, n.4, p.473–482, 2015.

GRAÑA, E. et al. Citral Induces Auxin and Ethylene-Mediated Malformations and Arrests Cell Division in *Arabidopsis thaliana* Roots. **J Chem Ecol** v. 39, p. 271–282, 2013.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: **SPI/Embrapa** - CNPH, 1, p. 183-260, 1998.

HAJHASHEMI, V.; DAVARI E. Evaluation of antianxiety and sedative effects of essential oil of *Ducrosia anethifolia* in mice. **Clinics**. v.65, n. 10, p. 1037-1042, 2010.

HALLMANN, J. et al. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Can. J. Microbiol.**v.43, p.895–914 1997.

HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v. 55, p. 481-504, 2000.

HEINZMANN, B. M.; SPITZER, V.; SIMÕES, C. M. O. Óleos voláteis (cap. 12). In: Farmacognosia: do produto natural ao medicamento. Porto Alegre: Ed. Artmed, 2017. 486p.

HU, Y. et al. Mechanisms of antifungal and anti-aflatoxigenic properties of essential oil derived from turmeric (*Curcuma longa* L.) on *Aspergillus flavus*. **Food Chemistry**, v. 220, p. 1-8, 2017.

HUANG, Z.; MAHER, K; AMARTEY, S. A. Effects of heartwood extractives in dahoma (*Piptadeniastrum africanum*) on decay resistance to white and brown-rot fungi. **The International Research Group on Wood Preservation IRG/WP 04-10536**. 2004.

HUSSAIN, A. et al. Rosmarinus officinalis essential oil: antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n.4, p. 1070 - 1078, 2010.

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

IRITI, M. et al. Histo-cytochemistry and scanning electron microscopy of *Lavender glandular* trichomes following conventional and microwave-assisted hydrodistillation of essential oils: A comparative study. **Flavour Fragr. J.** v. 21, p. 704–712, 2006.

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

ISMAN, 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.

JAVAD et al. Biological Activities of Essential Oils: From Plant Chemoecology to Traditional Healing Systems. **Molecules**, v. 22, n. 70, 2017.

KELLY, S. L. et al. Mode of action and resistance to azole antifungals associated with the formation of 14 α -methylegosta-8, 24(28)-dien-3 β , 6 α -diol. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 207, p. 910–915, 1995.

KIENDREBEOGO, M. et al. Antiacetylcholinesterase and antioxidant activity of essential oils from six medicinal plants from Burkina Faso. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 21, n. 1, p. 63 - 69, 2011.

KNAAK, N.; FIUZA, L. M. Potencial of essential plant oils to control insects and microorganisms. **Neotropical Biology and Conservation**, v.5, n. 2, p. 120-132, 2010.

KNEIFEL, W.; LEONHARDT, W. Testing of different antibiotics against gram-positive and gram-negative bacteria isolated from plant-tissue culture. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 29, n. 2, p. 139-144, 1992.

KUMAR, S. et al. Synthesis, characterization and field evaluation of pesticide loaded sodium alginate nanoparticles. **Carbohydrate Polymers**, 101: 1061-1067, 2014.

LATA, H. et al. Identification of IAA-producing endophytic bacteria from micropropagated Echinaceae plants using 16S rRNA sequencing. **Plant Cell Tissue Organ Cult.** v.85, p.353–359, 2006.

LEIFERT, C.; RITCHIE, J. Y.; WAITES, W. M. Contaminants of plant tissue and cell cultures. **World J Microbiol Biotechnol.** v.7, p.452–469, 1991.

LIMBERGER, R. P. et al. Volatile oils of the Myrcia species native to Rio Grande do Sul. **Química Nova**, v. 27, p. 916-919, 2004.

LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil. **Nova Odessa: Plantarum**, 1992.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras**. Instituto Plantarum de Estudos da Flora, Ltd., São Paulo, Brasil, 2002.

LORENZI, H. Árvores brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil. Nova Odessa: Plantarum, 2008.

LUPETTI, A. et al. Molecular basis of resistance to azole antifungals. **Trends Mol. Med.** V. 8, n. 2, p. 76–81, 2002.

MANO, H., MORISAKI, H. Endophytic bacteria in the rice plant. **Microbes Environ.** V.23, p.109–117, 2008

MARCHIORI, J. N. C. **Dendrologia das angiospermas: das magnoliáceas às flacurtiáceas**. Santa Maria: Editora da UFSM, 1997. 217 p.

MARCUZZO, S. F. Cerejeira-do-mato. In: MARCUZZO, D. F. 30 árvores estratégicas da Mata Atlântica: por um verde mais vivo. **Osório: Prefeitura Municipal de Osório**, 1998.

MAREI, G. I. K.; ABDEL, R. M. A.; ABDELGALEIL, S. A. M. Comparative antifungal activities and biochemical effects of monoterpenes on plant pathogenic fungi. **Pesticide Biochemistry and Physiology**. v. 103, n. 1, p. 56-61, 2012.

MARIANO, L. G. **Potencialidade de óleos essenciais de *Pinus elliotti* e *Melaleuca alternifolia* como preservantes de madeira contra a ação de fungo da podridão-branca**. 2017. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS. 2017.

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

- MELO, J. O. et al. Anti-inflammatory activity of crude extract and fractions of *Nectandra falcifolia* leaves. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, n.1, 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.
- MIHALJEVIĆ, I. *In vitro* sterilization procedures for micropropagation of 'Oblačinska' sour cherry. *Journal of Agricultural Sciences*, v.58, n.2, p. 117-126, 2013.
- MIZRA, P. et al. Establishment of long-term proliferating shoot cultures of elite *Jatropha curcas* L. by controlling endophytic bacterial contamination. **Plant Cell Tissue Organ Cult** v.100, p.89–197, 2010.
- MORAIS, T. P. et al. Aplicações da cultura de tecidos em plantas medicinais. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v.14, n.1, p.110-121, 2012.
- MORENO, P. R. H. et al. Chemical constituents and antitumour activity of *Nectandra grandiflora*. **International Journal of Pharmacognosy**, India, v. 31, n. 3, p. 189-192, 1993.
- MORESCHI, J. C. **Biodegradação e Preservação da Madeira** - Volume III: Métodos de Tratamento da Madeira (Apostila) 2011.
- MORRISSEY, J. P. 2009. Biological Activity of Defence-Related Plant Secondary Metabolites (cap.13), in **Plant-derived Natural Products**. Anne E. Osbourn, Virginia Lanzotti (Eds.), Springer.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, 1962.
- MUSHROOM TABLE. Pioneering Biodynamic Mushroom Growing. Great Bromley, Essex. Disponível em: < <https://www.mushroomtable.com/mushrooms-and-health/>>. Acesso em: jan. 2018.
- NAMBARA, E.; MARION-POLL, A. Abscisic acid biosynthesis and catabolism. **Annu Rev Plant Biol.** v. 56, p. 165-185, 2005.
- NASCIMENTO, P. F. C. et al. Antimicrobial activity of the essential oils: a multifactor approach of the methods. **Rev Bras Farmacogn**, 17:108-113, 2007.
- NEGI, D.; SAXENA, S. Micropropagation of *Bambusa balcooa* Roxb. through axillary shoot proliferation. **In Vitro Cell Dev Plant.** v.47, n.5, p.604–610, 2011.
- NERIO, L. S.; OLIVERO-VERBEL, J.; STASHENKO, E. Repellent activity of essential oils: a review. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 372-378, 2010.

NIEMENMAA, O.; GALKIN, S.; HATAKKA, A. Ergosterol contents of some woodrotting basidiomycete fungi grown liquid and solid culture conditions. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 62, p.125-134, 2008.

NIST. **NIST/EPANIH Mass Spectral Library & Search Program**. Hoboken: John Wiley & Sons, 2009.

ODUTAYO, O. I. et al. Microbial contaminants of cultured *Hibiscus cannabinus* and *Telfaria occidentalis* tissues. **Afr. J. Biotechnol.** v.3, n.9, p.473-476, 2004.

OLIVEIRA, A. M. F. et al. Agentes destruidores da madeira. In: LEPAGE, E. S. (Coord.). Manual de preservação de madeiras. São Paulo: IPT, v.1, p.99-278, 1986.

OLIVEIRA, J. A. Efeito do tratamento fungicida em sementes e no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativa* L.) e pimentão (*Capsicum annum* L.). **Ciência e Prática**. v. 16, n.1, p. 42-47, 1992.

OLIVEIRA, J. T. D. S. et al. Influência dos extrativos na resistência ao apodrecimento de seis espécies de madeira. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 29, n. 5, p. 819-826, 2005.

OUYANG, Q.; TAO, N.; JING, G. Transcriptional profiling analysis of *Penicillium digitatum*, the causal agent of citrus green mold, unravels an inhibited ergosterol biosynthesis pathway in response to citral. **BMC Genomics**. v. 17, p. 599, 2016.

PÁNEK, 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.

PARÉ, P. W.; TUMLINSON, J. H. Plant volatiles as a defense against insect herbivores. **Plant Physiol.** v. 121, p. 325-331, 1999.

PARK, I. K. *et al.* Fumigant activity of plant essential oils and components from horseradish (*Armoracia rusticana*), anise (*Pinpinella anisum*) and garlic (*Allium sativum*) oils against *Lycoriella ingenua* (*Diptera: Sciaridae*). **Pest Management Science**. v. 62, p. 723-728, 2006.

PARVEEN, M. et al. Response of *Saccharomyces cerevisiae* to a monoterpene: Evaluation of antifungal potential by DNA microarray analysis. **Journal of Antimicrobial and Chemotherapy**, v. 54, p. 46-55, 2004.

PASCHOLD, A.; HALITSCHKE, R.; BALDWIN, I. T. Using ‘mute’ plants to translate volatile signals. **Plant J.** v. 145, p. 275–291, 2006.

PATEL, B. et al. One step pre-hardening micropropagation of *Bambusa balcooa* Roxb. **J Phytol.** v.7, p.1–9, 2015.

PERES, C. M. **Nanoencapsulamento do óleo essencial das folhas e frutos de *Xylopia aromatica* Lamm. e sua atividade frente a oviposição de *Bemisia tabaci* (Genn.) (hemiptera: aleroydidae) biótipo b.** 2015. 98 p Dissertação (Mestrado em

Agroquímica), Programa de Pós-Graduação em Agroquímica do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde, 2015.

PHILLIPS, M. A.; CROTEAU, R. B. Resin-based defenses in conifers. **Trends Plant Sci.** v. 4, p. 184–190, 1999.

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

PINHEIRO, C. G. **Óleo essencial de *Hesperozygis ringens* (Benth.) Epling: variabilidade do rendimento, composição química e atividades biológicas.** 2014. 90 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria. 2014.

PINTO, E. et al. Antifungal activity of the clove essential oil from *Syzygium aromaticum* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. **Journal of Medical Microbiology**, v.58, n.11, p.1454–1462, (2009).

PIRGOZLIEV, S. R. et al. Effect of timing of fungicide application on the development of *Fusarium* head blight and accumulation of deoxynivalenol (DON) in winter wheat grain. **Cereal Res. Commun.** v. 36, p. 289–299, 2008.

PIZATTO, W. **Avaliação biométrica da estrutura e da dinâmica de uma floresta Ombrófila Mista de São João do Triunfo-PR: 1995 a 1998.** 1999. 172 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1999.

PRABUSEENIVASAN, S.; JAYAKUMAR, M.; IGNACIMUTHU, S. *In vitro* antibacterial activity of some plant essential oils. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, p. 6-39, 2006.

PRASHAR, A. et al. Antimicrobial action of palmarosa oil (*Cymbopogon martinii*) on *Saccharomyces cerevisiae*. **Phytochemistry**, v. 63, p. 569–575, 2003.

PRINS, C. L. et al. Growth regulators and essential oil production. **Brazilian Society of Plant Physiology**. v. 22, n. 2, p. 91-102, 2010.

PRISIC, S. et al. Rice contains two disparate ent-copalyl diphosphate synthases with distinct metabolic functions. **Plant Physiol.** v. 136, p. 4228–4236, 2004.

QUINET, A. Sinopse taxonômica da família Lauraceae no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, Belo Horizonte, v. 19, n. 3, p. 563-572, 2005.

RAMOS, J. M. O. et al. Chemical constituents and potential anti-inflammatory activity of the essential oil from the leaves of *Croton argyrophyllus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 23, n. 4, p. 644-650, 2013.

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

REITZ, R.; KLEIN, R. M.; REIS, A. Projeto madeira do Rio Grande do Sul. Porto Alegre: **Secretaria da Agricultura e Abastecimento**. 1988.

RIBEIRO, A. B.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. D. S. Antioxidant flavonol glycosides from *Nectandra grandiflora* (Lauraceae). **Eclética Química**, Araraquara, v. 27, n. Special, p. 35- 44, 2002.

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

RODRIGUES, F. F. G.; COSTA, J. G. M.; COUTINHO, H. D. M. Synergy effects of the antibiotics gentamicin and the essential oil of *Croton Zehntneri*. **Phytomedicine**, v. 16, p. 1052-1055, 2009.

RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, D. A. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do cerrado na região do Alto Rio Grande, Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 1, p. 102-123, jan./fev. 2001.

RODRIGUEZ, R. J. et al. Multiple functions for sterols in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochim. Biophys. Acta**. v. 837, p. 336–343, 1985.

RODRIGUEZ-CONCEPCIÓN, M.; BORONATO, A. Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics. **Plant Physiol**. v. 130, p. 1079-1089, 2002.

ROMAGNI, J. G.; ALLEN, S. N.; DAYAN, F. E. Allelopathic effects of volatile cineoles on two weedy plant species. **J. Chem. Ecol**. v. 26, p. 303–313. 2000.

ROWELL, R.M. **Wood chemistry and wood composites**. Boca Raton: CRC Press, 2005, 473 p.

SAHARKHIZ, M. J. et al. Salicylic acid changes physio-morphological traits and essential oil content of catnip (*Nepeta cataria* L.). **Z. Arznei-Gewurzpfl**, v. 16, p. 75-77. 2011.

SAKAI, A.; YOSHIMURA, H. Monoterpenes of *Salvia leucophylla*. **Curr. Bioact. Compd.**, v. 8, p. 90–100, 2012.

SALEM, M. Z. M. et al. Antifungal activities of two essential oils used in the treatment of three commercial woods deteriorated by five common mold fungi. **International Biodeterioration and Biodegradation**. v. 106, p. 88-96, 2016.

SANCHOTETE, M. C. C. Frutíferas nativas úteis na arborização urbana. 2ed. Porto Alegre: **SAGRA**, 1989.

SANGWAN, N. S. et al. Regulation of essential oil production in plants. **Plant Growth Regul**. v. 34, p. 03-21, 2001.

SANTINI, E. J. **Biodeterioração e preservação da madeira**. Santa Maria: CEPEF/FATEC, 17 125p. 1988.

SARTOR, R. B. **Modelagem, simulação e otimização de uma unidade industrial de extração de óleos essenciais por arraste de vapor**. 2009. 75 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2009.

SATISH, S. et al. Antifungal activity of some plant extracts against important seed borne pathogens of *Aspergillus* sp. **Journal of Agricultural Technology**. v. 3, n.1, p. 109-119, 2007.

SATO, A.Y. et al. Micropropagação de *Celtis* sp: controle da contaminação e oxidação. **Cerne**, v.7, n.2, p.117-23, 2001.

SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry**, v. 30, n. 12, p. 3875-3883, 1991.

SCHEIDER, N. et al. Assessing the intensity of *Fusarium* damage in wheat: a comparison of selected disease parameters during disease development and the role of fungicides. **J. Plant. Dis. Protect.** v. 116, p. 118–123, 2009.

SCHINDLER, B. **Óleo essencial de *Piper gaudichaudianum* Kunth: Rendimento, composição química e atividade fungitóxica**. 2013. 100 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria – RS, 2013.

SENGAR, R. S.; SENGAR, K.; GARG, S. K. Biotechnological approaches for high sugarcane yield. **Plant Sciences Feed**, Pune, Maharashtra, India, v. 1, n. 7, p. 101-111, 2011.

SEN-SUNG, C.; HUANG-YUAN, L.; SHANG-TZEN, C. Chemical composition and antifungal activity of essential oils from different tissues of Japanese Cedar (*Cryptomeria japonica*). **J Agric Food Chem**. v.53, p. 614–619, 2005.
In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, Oxon, v. 47, n. 2, p. 234-249, 2011.

SHELDON, A. T. Sheldon Antibiotic resistance: a survival strategy. **Clinical Laboratory Science**, v. 18, p. 170–180, 2005.

SHEN, H. et al. Detection of indigenous endophytic bacteria in *Eucalyptus urophylla* *in vitro* conditions. **Front Agric China**. v.4, p.37–41, 2010.

SILVA, R. D. et al. Parâmetros hematológicos e bioquímicos da Tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus* L.) sob estresse por exposição ao ar. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 32, n. 1, p. 99-107, 2012.

SILVA, D. T. **Caracterização química e atividades biológicas de extrativos obtidos de *Nectandra grandiflora* Nees E *Ocotea lancifolia* (Schott) Mez**. 2016.

Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2016.

SILVA, D. T. et al. Chemical composition and inhibitory effects of *Nectandra grandiflora* leaves essential oil against wood decay fungi. **Drewno**, v.59, n. 197, 2016.

SILVA, D. T. **CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE EXTRATIVOS OBTIDOS DE *Nectandra grandiflora* Nees E *Ocotea lancifolia* (Shott) Mez.** 2017, 161p. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2017.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da Plana ao Medicamento.** 2 ed. Florianópolis: Edda UFSC; Porto Alegre: Artmed, 2000.

SINGH, T.; SINGH, A. P. A review on natural products as wood protectant. **Wood Sci. Technol.** v. 46, p. 851-870, 2012.

SINGH, T.; CHITTENDEN, C.; VESENTINI, D. *In vitro* antifungal activity of chilli against wood degrading fungi. **The International Research Group on Wood Preservation IRG/WP 06-10572.** 2006.

SIQUEIRA, A. A. et al. Avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial de *Eucalyptus globulus*: uma alternativa aos antibióticos convencionais. **Scientia: Rev. Cent. Univ. Vila Velha.** v. 8, p.199-214, 2007.

SNYMAN, S. J. et al. Biotechnological approaches for high sugarcane yield. **Plant Sciences Feed**, Pune, Maharashtra, India, v. 1, n. 7, p. 101- 111, 2011.

SOBRAL, M. *Eugenia involucrata* DC. In: SOBRAL, M. A família das Myrtaceae no Rio Grande do Sul. Porto Alegre: **Unisinos**, 2003.

SOBRAL, M. et al. **Flora arbórea e arborescente do Rio Grande do Sul**, Brasil. RiMa, 2006.

SOUSA, E. O. et al. Antibacterial activity and interference of *Lantana camara* Linn and *Lantana montevidensis* Briq in the resistance against aminoglycosides. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 67, p. 845-851, 2011.

SOUZA, J. A. **Estudo da biodegradação do ácido 2,4-diclorfenoxiacético em formulações de liberação controlada.** Tese (Programa de PósGraduação da Universidade de Campinas), 1999.

SOUZA, C. R. et al. Influência do ácido giberélico sobre a arquitetura de plantas de feijão no início de desenvolvimento. **Acta Scientiarum Agronomy**, v.32, n.2, p. 325-32, 2010.

SPATZ, A. K.; GRAY, W. M. Plant Hormone Receptors: new perceptions. **Gene Dev.** v. 22, p. 2139-2148, 2008.

STANGERLIN, D. M. et al. Resistência natural da madeira de três espécies amazônicas submetidas ao ataque de fungos apodrecedores. **Ciência da Madeira** (Brazilian Journal of Wood Science). v. 4, n. 1, p. 15-32, 2013.

STEFANEL, C. M. **Aspectos da qualidade e sementes e do estabelecimento *in vitro* de *Eugenia involucrata* de Candolle**. 2016. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2016.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3. ed. Artmed, Porto Alegre. 2004, 719 p.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 819 p.

TEALE, W. D.; PAPANOV, I. A.; PALME, K. Auxin in action: signaling, transport and the control of plant growth and development. **Nat Rev Mol Cell Biol**. v. 7, p. 847-859, 2006.

THOMAS, P.; KUMARI, S. Inconspicuous endophytic bacteria mimicking latex exudates in shoot-tip cultures of papaya. **Scientia Horticulturae**. v.124, p.469–474, 2010.

THOMAS, P.; GOPLAKRISHNAN, C.; KRISHNAREDDY, M. Soft rot inciting *Pectobacterium carotovorum* (syn. *Erwinia carotovora*) is unlikely to be transmitted as a latent pathogen in micropropagated banana. **Plant Cell Tissue Organ Cult**. v.105, p.423–429, 2011.

TIAN, J. et al. The control of *Aspergillus flavus* with *Cinnamomum jensenianum* Hand.-Mazz essential oil and its potential use as a food preservative. **Food Chemistry**, v. 130, p. 520–527, 2012.

TINTINO, S. R. et al. *In vitro* evaluation of antimicrobial activity and modulating the ethanol and hexane extracts of *Costus arabicus* bulb. **Bioscience Journal**, v. 29, p. 732-738, 2013.

TOLEDO, C. P. **Identificação e controle de microrganismos contaminantes no processo de micropropagação de cana-de-açúcar**. 2011. 71 p. Dissertação (Mestrado em Ciências). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo. Piracicaba – SP. 2011.

TRES, J. **Rendimento e composição química do óleo essencial de raízes de *Piper gaudichaudianum* Kunth e atividade fungitóxica *in vitro***. 2017. 100 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria – RS, 2017.

VITTI, A. M.S.; BRITTO, J. O. Óleo essencial de eucalipto. **Documentos Florestais**, n.17, p.1-26, 2003.

WANG, S. Y.; CHEN, P. F.; CHANG, S. T. Antifungal activities of essential oils and their constituents from indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*) leaves against wood decay fungi. **Bioresource Technology**. v. 96, n. 7, p. 813-818, 2005.

WILLIAMS, C. M.; MANDER, L. N. Chromatography with silver nitrate. **Tetrahedron**. v. 57, p. 425-447, 2001.

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.

ZABEL, R. A.; MORRELL, J. J. Wood microbiology: decay and its prevention. San Diego: **Academic Press**, 1992. 476p.

ZANON, M. M. F.; GOLDENBERG, R.; MORAES, P. L. R. The genus *Nectandra* Rol. Ex Rottb. (Lauraceae) in Paraná State, Brazil. **Acta Botanica Brasilica**, Belo Horizonte, v. 23, n. 1, p. 22-35, 2009.