

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

Bibiana Fontana Batista

**ÓLEO ESSENCIAL DE *OCOTEA LANCIFOLIA* (SCHOTT) MEZ:
INFLUÊNCIA DE DIFERENTES MÉTODOS DE SECAGEM DO
MATERIAL VEGETAL E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA**

**Santa Maria, RS
2020**

Bibiana Fontana Batista

**ÓLEO ESSENCIAL DE *OCOTEA LANCIFOLIA* (SCHOTT) MEZ: INFLUÊNCIA DE
DIFERENTES MÉTODOS DE SECAGEM DO MATERIAL VEGETAL E
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA**

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

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

Santa Maria, RS
2020

Batista, Bibiana Fontana

Óleo essencial de ocotea lancifolia (schott) mez:
influência de diferentes métodos de secagem do material
vegetal e avaliação da atividade antifúngica / Bibiana
Fontana Batista.- 2020.

74 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, 2020

1. Canela-pilosa 2. Atividade fungicida. 3. Mecanismo
de ação 4. Processamento pós-colheita 5. Ergosterol. Óxido
de cariofileno I. Heinzmann, Berta Maria II. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

© 2020

Todos os direitos autorais reservados a **Bibiana Fontana Batista**. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

E-mail: bibianafbat@gmail.com

Bibiana Fontana Batista

**ÓLEO ESSENCIAL DE *OCOTEA LANCIFOLIA* (SCHOTT) MEZ: INFLUÊNCIA DE
DIFERENTES MÉTODOS DE SECAGEM DO MATERIAL VEGETAL E
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA**

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

Aprovado em 30 de Janeiro de 2020:



Berta Maria Heinzmann, Prof^a. Dr.^a(UFSM)
(Presidente/Orientador)



Silvana Rosso, Dr^a. (UNIPAMPA)



Denise Schmidt, Dr^a. (UFSM)

Santa Maria, RS
2020

AGRADECIMENTOS

À minha família, agradeço por todo apoio, amor, carinho, conforto nas horas difíceis e orações. Minha imensa gratidão aos meus pais, Leonel e Lurdes, pelo incondicional amor e apoio demonstrado em tantas palavras de conforto e incentivo. Ao meu irmão Jozias, pelo apoio, companheirismo, incentivo e paciência em inúmeros momentos desta caminhada.

A todos os professores que de alguma forma contribuíram para a minha formação. Especialmente à professora Berta, pelas orientações, ensinamentos e confiança e paciência durante a elaboração desta dissertação.

À professora Marlove e a toda equipe do Laboratório de Fitopatologia.

A todos os colegas do Laboratório de Extrativos Vegetais, pela ajuda, parceria, companheirismo e troca de conhecimentos. Em especial a amiga e colega de Laboratório Nádia, pela fundamental parceria e auxílio durante a elaboração dos experimentos.

Aos bolsistas de iniciação científica Alana e Guilherme, por todo auxílio.

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, que possibilitaram a realização desta dissertação de mestrado.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro para a elaboração deste trabalho.

Aos demais professores, funcionários e colegas, que participaram de alguma forma da minha formação.

Agradeço à banca, por ter aceitado o convite para avaliar esta dissertação.

A todos os amigos não mencionados aqui, mas que de alguma forma contribuíram para a concretização desse trabalho.

Muito obrigada!

RESUMO

ÓLEO ESSENCIAL DE *OCOTEA LANCIFOLIA* (SCHOTT) MEZ: INFLUÊNCIA DE DIFERENTES MÉTODOS DE SECAGEM DO MATERIAL VEGETAL E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

Autora: Bibiana Fontana Batista
Orientadora: Berta Maria Heinzmann

As plantas produtoras de óleos essenciais (OEs) são ricas em metabólitos secundários, estes desempenham importante função em suas defesas naturais contra micro-organismos. Entre os micro-organismos que causam perdas econômicas no setor florestal estão os fungos. A espécie *Ocotea lancifolia* é potencial produtora de OEs, com ampla gama de possíveis bioatividades. A crescente utilização e demanda por OEs, torna necessária a otimização do processamento do material vegetal, para aumentar o rendimento, sem alterar características organolépticas e químicas. Portanto esta dissertação visou determinar o potencial antifúngico do óleo essencial (OE) de *O. lancifolia* frente a fungos apodrecedores da madeira, e verificar sua ação sobre o conteúdo de ergosterol na membrana plasmática dos fitopatógenos. Adicionalmente, buscou-se avaliar a influência de diferentes métodos de secagem sobre o rendimento, densidade, propriedades organolépticas e composição química dos OEs de folhas de *O. lancifolia*. Para a determinação do potencial antifúngico do OE, este, diluído em etanol, foi adicionado ao meio nutritivo BDA. O potencial antifúngico foi verificado frente ao fungo causador de podridão-branca *Ganoderma applanatum* e ao fungo causador de podridão-parda *Lentinus lepideus*. O OE foi avaliado nas concentrações de 1,0; 1,5; 2,0 e 5,0 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, considerando ainda etanol a 1,0 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ (controle negativo) e propiconazol a 1,0 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ (controle positivo/fungicida comercial). Através da análise da composição química do OE foram identificados como compostos majoritários: óxido de cariofileno (41,46%), γ -curcumen-15-al (17,05%) e Z- α -trans-Bergamotol (7,52%). Para a atividade antifúngica, os resultados demonstraram que o OE inibiu o crescimento do micélio das duas espécies fúngicas, sendo esta atividade dependente de concentração. O índice de crescimento micelial (ICM) foi afetado significativamente nas concentrações de 1,5; 2,0 e 5,0 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ que não diferiram estatisticamente do fungicida comercial. Para a espécie *L. lepideus*, o OE na concentração de 5,0 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ provocou atividade fungicida. Nas avaliações do efeito do OE sobre o teor de ergosterol, foi observada tendência a diminuição do seu conteúdo nas duas espécies fúngicas. Quanto ao estudo sobre a influência de diferentes métodos de secagem, foram utilizados os processos de secagem ao ar, liofilização, em micro-ondas, e em estufa a 45 e 60°C, sobre rendimento, densidade, cor e compostos químicos do OE de folhas de *O. lancifolia*, através da comparação com o OE de folhas frescas. Pôde-se, constatar que as secagens por micro-ondas e liofilização forneceram os maiores rendimentos, além disso, os diferentes métodos não afetaram a densidade do extrativo. Para OEs submetidos ao método de secagem em forno a 45 e 60 °C, houve drástica mudança de cor. As análises da composição química dos OEs demonstraram o composto óxido de cariofileno como o majoritário em todos os OEs obtidos após os processos de secagem, e que os demais compostos foram influenciados possivelmente pelo tempo e temperatura, resultando em diferenças em sua estrutura química e/ou na percentagem dos compostos. Diante do exposto destaca-se o potencial do OE de *O. lancifolia* como inibidor do crescimento dos fungos apodrecedores testados, bem como o potencial dos métodos modernos de secagem no fornecimento de OE em maior rendimento e sem alteração das características organolépticas.

Palavras-chave: Canela-pilosa. Atividade fungicida. Mecanismo de ação. Processamento pós-colheita. Ergosterol. Óxido de cariofileno.

ABSTRACT

OCOTEA LANCIFOLIA ESSENTIAL OIL (SCHOTT) MEZ: INFLUENCE OF DIFFERENT VEGETABLE DRYING METHODS AND ANTI-FUNGAL ACTIVITY ASSESSMENT

AUTHOR: BIBIANA FONTANA BATISTA
ADVISOR: BERTA MARIA HEINZMANN

Plants producing essential oils (EOs) are rich in secondary metabolites, which play an important role in their natural defenses against microorganisms. Among the microorganisms that cause economic losses in the forest sector are fungi. *Ocotea lancifolia* is a potential producer of EOs, with a wide range of possible bioactivities. The increasing use and demand for EOs, makes it necessary to optimize the processing of plant material to increase yield without changing organoleptic and chemical characteristics. Therefore, this dissertation aimed to determine the antifungal potential of *O. lancifolia* essential oil (EO) against wood decay fungi, and to verify its action on ergosterol content in the plasma membrane of phytopathogens. In addition, we sought to evaluate the influence of different drying methods on yield, density, organoleptic properties and chemical composition of the EOs of *O. lancifolia* leaves. To determine the antifungal potential of the EO, this, diluted in ethanol, was added to the nutrient medium BDA. The antifungal potential was verified against the white rot fungus *Ganoderma applanatum* and the brown rot fungus *Lentinus lepideus*. EO was evaluated at concentrations of 1.0; 1.5; 2.0 and 5.0 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, also considering ethanol at 1.0 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ (negative control) and propiconazole at 1.0 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ (positive control/ commercial fungicide). Through the analysis of the chemical composition of the EO the following were identified as major compounds: caryophyllene oxide (41.46%), γ -curcumen-15-al (17.05%) and Z- α -trans-Bergamotol (7.52%). For antifungal activity, the results showed that the EO inhibited the mycelium growth of the two fungal species, being this activity dependent on concentration. Mycelial growth index (MCI) was significantly affected at 1.5; 2.0 and 5.0 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ that did not differ statistically from the commercial fungicide. For *L. lepideus* species, the EO at a concentration of 5.0 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ caused fungicidal activity. In evaluations of the effect of EO on ergosterol content, a tendency to decrease its content was observed in both fungal species. Regarding the study on the influence of different drying methods, the processes of air drying, lyophilization, microwave and oven at 45 and 60°C were used, on yield, density, color and chemical compounds of the EO Of *O. lancifolia* leaves by comparison with fresh leaf EO. It was found that microwave drying and lyophilization provided the highest yields, and the different methods did not affect the density of the extractive. For EOs submitted to the oven drying method at 45 and 60°C, there was a drastic color change. The analysis of the chemical composition of the EO showed the caryophyllene oxide compound as the major in all EOs obtained after the drying processes, and that the other compounds were possibly influenced by time and temperature, resulting in differences in their chemical structure and / or percentage of compounds. Given the above, we highlight the potential of *O. lancifolia* EO as a growth inhibitor of the rotting fungi tested, as well as the potential of modern drying methods to provide OE in higher yield and without altering the organoleptic characteristics.

Keywords: Canela-pilosa. Fungicidal activity.Mechanism of action. Postharvest processing. Ergosterol. Caryophyllene oxide.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

- Figura 1 – Detalhe das folhas de *Ocotea lancifolia*, localizada no distrito de Santo Antônio, na cidade de Santa Maria - RS.....16
- Figura 2 – Esquema do experimento adaptado para a avaliação do conteúdo de ergosterol na interação do OE folhas de *Ocotea lancifolia* com fungos apodrecedores da madeira25

ARTIGO 1

- Figura 1 – Experimento de inibição do crescimento micelial *in vitro* do óleo essencial de folhas de *Ocotea lancifolia* (OE) em *Ganoderma applanatum* (GA) e *Lentinus lepideus* (LL).....37
- Figura 2 – Índice de crescimento micelial *in vitro* (IMC) e inibição do crescimento micelial *in vitro* (%) com aplicação do óleo essencial de folhas de *Ocotea lancifolia* (OE) de *Ganoderma applanatum* e *Lentinus lepideus*.39
- Figura 3 – Massa úmida micelial (g) e valores de absorvância de esteróis extraídos do micélio de *Ganoderma applanatum* (A, B) e *Lentinus lepideus* (C, D) em meio contendo $1,0 \mu\text{L.mL}^{-1}$ de óleo essencial de *Ocotea lancifolia*.....41

ARTIGO 2

- Figura 1 – Rendimento do óleo essencial de *Ocotea lancifolia* em comparação com (1) folhas frescas quanto aos métodos de secagem, (2) folhas secas ao ar, (3) folhas secas por liofilização, (4) folhas secas em micro-ondas, (5) folhas secas em estufa a $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ e (6) folhas secas em estufa a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$53
- Figura 2 – Imagens com a coloração dos óleos essenciais de folhas de *Ocotea lancifolia*, obtidos após diferentes processos pós-colheita.....60
- Figura 3 – Análises de Agrupamento Hierárquico pelo método de Ward da composição química dos óleos essenciais de folhas de *Ocotea lancifolia* submetidas a diferentes métodos de secagem62
- Figura 4 – Gráfico de dispersão dos Componentes Principais considerando os componentes majoritários dos óleos essenciais de *Ocotea lancifolia* e sua correlação dos diferentes tratamentos63

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Tabela 1 – Composição química do óleo essencial de folhas de *Ocotea lancifolia* ..35

ARTIGO 2

Tabela 1 – Composição química dos óleos essenciais obtidos de folhas de *Ocotea lancifolia*, frescas e secas por diferentes métodos de secagem.56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- BDA – Meio de cultura composto por batata, dextrose e ágar.
- BOD – Incubadora com fotoperíodo e temperatura controlada
- ICM – Índice de Crescimento Micelial
- MS – Meio de Cultura Murashige e Skoog
- OE – Óleo Essencial
- OEs – Óleos Essenciais
- AAH – Análises de Agrupamento Hierárquico
- ACP – Análise de Componentes Principais

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 REFERENCIAL TEÓRICO.....	14
1.1.1 Óleos essenciais	14
1.1.2 A espécie <i>Ocotea lancifolia</i> (Schott) Mez.....	15
1.1.3 Secagem do material vegetal	17
1.1.4 Fungos apodrecedores da madeira	18
1.2 PROPOSIÇÃO	20
1.3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
1.3.1 Coleta e identificação da espécie	20
1.3.2 Preparo do material vegetal: diferentes tratamentos	21
1.3.2.1 Folhas frescas	21
1.3.2.2 Secagem ao ar à temperatura ambiente	21
1.3.2.3 Secagem por liofilização.....	21
1.3.2.4 Secagem em forno Micro-ondas	21
1.3.2.5 Secagem em estufa.....	21
1.3.3 Extração dos óleos essenciais	22
1.3.4 Análise da composição química do óleo essencial	22
1.3.5 Bioensaio de atividade antifúngica e mecanismo de ação.....	23
1.3.5.1 Cultivo dos fungos apodrecedores	23
1.3.5.2 Efeito do OE sobre o conteúdo de ergosterol da membrana fúngica	24
1.3.6 Análise estatística	26
2 ARTIGO 1 –ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS DE OCOTEA LANCIFOLIA (SCHOTT) MEZ: INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DE FUNGOS APODRECEDORES DA MADEIRA E INFLUÊNCIA SOBRE O TEOR DE ERGOSTEROL.....	27
3 ARTIGO 2 –EFEITO DE DIFERENTES MÉTODOS DE SECAGEM SOBRE RENDIMENTO, DENSIDADE, COR E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS DE OCOTEA LANCIFOLIA (SCHOTT) MEZ.....	46
4 DISCUSSÃO	67
5 CONCLUSÃO	74
REFERÊNCIAS.....	75

1 INTRODUÇÃO

A crescente utilização de plantas nas mais diversas áreas, tanto tecnológicas quanto tradicionais, e a demanda por estes materiais vegetais demonstra a necessidade de otimização no seu processamento e de comprovação das atividades a que estão relacionados. Além de usos populares como os medicinais, o uso de espécies vegetais é comprovadamente eficaz no combate a radicais livres, auxilia na atração de agentes polinizadores e na defesa de plantas contra predadores. Também merece ser destacada sua utilização em atividades agrícolas e silviculturais, como alternativa viável devido à ação inseticida, repelindo insetos possivelmente causadores de perdas econômicas, assim como ação fungicida prevenindo patologias antes e após a colheita (PINHEIRO, 2014; SOUZA FILHO, 2009; ISMAN; MACHIAL, 2006).

As plantas são ricas fontes de constituintes oriundos do metabolismo secundário, que podem ter seus potenciais investigados em diferentes áreas de pesquisa. Estes componentes do metabolismo secundário podem ser classificados em diferentes classes, como óleos essenciais, ácidos fenólicos, flavonoides, cumarinas, saponinas, alcaloides, taninos, entre outras, as quais são matéria-prima para inúmeros produtos de alto valor comercial (GOBBO-NETO; LOPES, 2007; SALLEH; AHMAD, 2017).

As espécies pertencentes à família Lauraceae são potenciais produtoras de óleos essenciais (OEs) com amplas possibilidades de usos relacionadas as suas bioatividades (REIS-AVILA; OLIVEIRA, 2017). O gênero *Ocotea* é um dos mais representativos desta família, sendo que suas espécies são popularmente conhecidas como canelas e são consideradas de relevante importância econômica. Este gênero é característico por possuir inúmeras espécies com compostos voláteis, como componentes de OEs, em misturas complexas ou compostos isolados, os quais estão ligados às suas atividades biológicas, como antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória, antifúngica, entre outras (SALLEH; AHMAD, 2017).

Os extrativos vegetais, como os OEs, são uma promissora fonte de substâncias que podem fornecer maior proteção antifúngica às superfícies da madeira, podendo ser responsável pela maior ou menor suscetibilidade ao ataque destes microorganismos. Os preservantes como os à base de tanino demonstram impacto positivo na preservação de madeiras, assim como o OE de *N. grandiflora*,

por exemplo, que possui atividade antifúngica frente aos fungos de podridão da madeira *P. sanguineus* e *G. trabeum* (SILVA et al., 2013; TEACA et al., 2019).

O controle de doenças e pragas através de extrativos vegetais, diferentemente dos tradicionalmente utilizados, possui baixo impacto ao ambiente. Nas últimas décadas tem-se procurado melhorar as técnicas de avaliação utilizadas para detectar suas bioatividades, devido à vasta gama de espécies potencialmente ativas quanto aos extrativos como pesticidas botânicos (ISMAN, 1997; SELLAMI et al., 2011; SALLEH; AHMAD, 2017). Os métodos mais frequentemente utilizados na preservação de madeiras preconizam o uso de produtos derivados de petróleo, que são altamente tóxicos ao ambiente e aos seres vivos. Existe, desta forma, uma tendência mundial à exploração de produtos que controlem a deterioração da madeira, ao mesmo tempo em que não apresentem alto impacto aos seres vivos e ao ambiente (CHITTENDEN; SINGH, 2011; SCHULTZ; NICHOLAS, 2002).

O uso dos compostos provindos de plantas medicinais e aromáticos pela população vem tornando-se expressivo e crescente, desta forma a demanda por espécies e seus constituintes com bioatividades descritas reforça a necessidade de processar maior quantidade de material vegetal, sendo que a secagem pode vir a propiciar a maximização na produção. Além disso, o aumento do uso dos processos de secagem atinge diversas linhas tecnológicas, como na indústria alimentícia e de biotecnologias, demonstrando a importância e o interesse prático do estudo do processamento pós-colheita do material vegetal, utilizado através do emprego de diferentes métodos de secagem (SELLAMI et al., 2011; EBADI et al., 2015; CHUA et al., 2019).

Desta forma, o estudo do estabelecimento das atividades como a antifúngica e sua interação com os OEs configuram uma possível alternativa para o desenvolvimento de produtos para a preservação da madeira que sejam mais seguros para os seres humanos e o ambiente. Estas bioatividades podem receber diferentes enfoques de investigação. Pinheiro (2018) traz que a avaliação de um possível mecanismo de ação antifúngica, possibilita o entendimento de como se dá a influência deste extrativo sobre a sobrevivência e o desenvolvimento fúngicos, podendo contribuir para a obtenção de um preservante da madeira eficaz e de baixa toxicidade para os organismos não alvo. Ainda, que o conteúdo de ergosterol presente na membrana plasmática dos fungos pode estar relacionado ao mecanismo segundo o qual o OE exerce seu efeito fungitóxico.

A presente dissertação está organizada na forma de dois manuscritos. De acordo com as normas da Universidade Federal de Santa Maria, encontra-se estruturada iniciando com a Introdução, sendo na sequência apresentado o Referencial Teórico, abrangendo de forma breve alguns temas relevantes para o estudo, seguido dos objetivos do trabalho descritos no item Proposição. Posteriormente são descritos os Materiais e Métodos utilizados para a realização dos artigos e, na sequência, os resultados são apresentados na forma de dois Artigos. O Artigo 1 apresenta os resultados da atividade antifúngica do OE de folhas de *O. lancifolia* frente a fungos apodrecedores da madeira, e ainda avalia a possível relação de seu efeito com a concentração de ergosterol na membrana celular fúngica. O Artigo 2 relaciona-se à influência de diferentes métodos de secagem sobre o rendimento e a composição química do OE de folhas de *O. lancifolia*. No item Discussão, os resultados de ambos os Artigos foram interpretados e relacionados entre si, considerando fundamentos e argumentos encontrados na literatura, e finalizando com a Conclusão e as Referências utilizadas na elaboração desta dissertação.

1.1 REFERECIAL TEÓRICO

1.1.1 Óleos essenciais

Os vegetais produzem inúmeros compostos orgânicos, que por vezes não possuem ação direta nos processos fundamentais das plantas, como fotossíntese, assimilação dos nutrientes, transporte de solutos, entre outros, porém influem em funções ecológicas importantes, como nas defesas, na proteção contra infecções patogênicas, agem ainda como atrativos para polinizadores e animais dispersores de sementes e auxiliam na competição natural entre plantas (TAIZ, et al., 2017). Estes compostos são ditos metabólitos secundários, que desempenham importante papel de prover resistência às plantas, pois todas produzem estes metabólitos, porém existem variações na quantidade, qualidade e até mesmo no período de produção, pois este está ligado a eventos ocorridos em cada planta, sendo que cada espécie responde de forma própria, assim como é a ocorrência de intempéries do meio onde habitam (FERREIRA; AQUILA, 2000).

Os óleos essenciais constituem uma mistura complexa de substâncias,

bastante odoríferas e líquidas, de estruturas químicas heterogêneas (VITTI; BRITO, 2003). Estes também conhecidos como óleos voláteis foram definidos pela International Stand Organization (ISO) como produtos obtidos através da destilação por arraste com vapor d'água, de partes de plantas como folhas, flores e frutos ou por prensagem do pericarpo no caso de frutos cítricos.

Para plantas ricas em óleos essenciais, estes localizam-se em estruturas secretoras internas e/ou externas, como tricomas glandulares, células secretoras internas, ductos resinosos em coníferas, entre outros (TAIZ, et al., 2017). Nas espécies da família Lauraceae estes compostos são armazenados principalmente em células secretoras denominadas idioblastos, as quais estão distribuídas ao longo de todas as partes da planta (MARQUES, 2001; CAMARGO, 2011; GONÇALVES et al., 2018).

A composição química dos OE é bastante ampla, podendo ser um conjunto formado por hidrocarbonetos terpênicos, álcoois, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, ácidos orgânicos, entre outros. Estes compostos estão presentes em diferentes concentrações. Desta forma ao ser feita a análise da composição dos óleos essenciais, geralmente destacam-se os que representam maior concentração, sendo denominados compostos majoritários (VITTI; BRITO, 2003; GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

1.1.2 A espécie *Ocotea lancifolia* (Schott) Mez

As espécies pertencentes à família Lauraceae podem ser de porte arbóreo e arbustivo, estas possuem expressiva importância econômica, estando presente tanto na indústria como no uso empírico pela população, como utilização na culinária, na produção de papel, fornecendo madeira para construção civil e marcenaria, produção de óleos e uso medicinal (CAMARGO, 2011; REIS-AVILA; OLIVEIRA, 2017; SALLEH; AHMAD, 2017).

O gênero *Ocotea* é um dos maiores representantes da família Lauraceae com cerca de 350 espécies, destas aproximadamente 160 com ocorrência no Brasil (BALLABENI et al., 2007; ROHWER; KUBITZKI, 1993). As espécies deste gênero são consideradas ainda espécies medicinais muito utilizadas, na forma de infusões com as folhas, como tônico e estomáquico e a casca em muitos casos utilizada como antirreumática e depurativa (MARQUES, 2001; SALLEH; AHMAD, 2017).

Conhecida popularmente como canela, canela-pilosa ou canela-sabão, a espécie *O. lancifolia* é de porte arbóreo, nativa no Paraguai e Brasil, ocorrendo nos biomas Mata Atlântica e Cerrado (QUINET et al., 2015). Sua floração ocorre em janeiro, abril, maio e setembro, enquanto sua frutificação ocorre em novembro, o formato de suas folhas pode variar de orbicular a estreito-lanceolado (Figura 1) (MARQUES, 2001).

Figura 1 – Detalhe das folhas de *Ocotea lancifolia*, localizada no distrito de Santo Antônio, na cidade de Santa Maria - RS



Fonte: SILVA (2016).

O OE de folhas da espécie *O. lancifolia* possui algumas propriedades biológicas descritas na literatura, como antiparasitária com potencial utilização contra *Lestimania* e *Trypanosoma cruzi*, e ainda o OE da espécie apresenta propriedades anestésicas e sedativas em peixes. A espécie *O. lancifolia* possui atividade antifúngica relatada para o seu OE de folhas frente a espécie de *Fusarium moniliforme* e do extrato bruto obtido de folhas e de suas frações frente aos fungos *G. trabeum* e *T. versicolor*, demonstrando o alto potencial dos extrativos provindos da espécie de estudo quanto às atividades e propriedades biológicas de seus compostos (FOURNET et al., 2007; SILVA et al., 2013; SILVA et al., 2018).

Para o gênero *Ocotea* existem relatos na literatura da atividade contra fungos, onde o OE de da espécie *O. quixos* teve atividade antifúngica contra fungos

dermatófitos (*Trichophyton mentagrophytes*, *Pythium ultimum*), e *Candida albicans* assim como o OE da espécie *O. odorífera* apresentou atividade contra cepas de *C. albicans* e *C. tropicalis*. Para a espécie *O. macrophylla* foi observado que a fração obtida de folhas, composta por alcaloides demonstrou atividade contra o fungo *Fusarium oxysporum*. Ainda as espécies do gênero *Ocotea* possuem descritas diferentes atividades biológicas, como atividade citotóxica dos OEs de folhas e raízes de *O. gomizii* e *O. morae*, atividade antibacteriana do OE de folhas de *O. praetermissa* e *O. endresiana* frente a *Bacillus cereus*. Ademais, os OEs de espécies do gênero possuem atividade anti-inflamatória, e anti-trombótica (TAKAKU; HABER; SETZER, 2007; SALLEH; AHMAD, 2017; SILVA et al., 2017b).

1.1.3 Secagem do material vegetal

As plantas, geralmente, possuem grande quantidade de água que varia conforme a espécie e seu período vegetativo. Para a comercialização de partes de plantas para diferentes finalidades, como por exemplo, para fins medicinais e condimentares, ou na produção de extrativos para diferentes finalidades, muitas vezes é necessário realizar a secagem do material vegetal, evitando o ataque microbiano, proporcionando maior conservação para o transporte, etc. Para alguns autores, a secagem pode aumentar a vida útil do produto final, retardando o crescimento de micro-organismos e prevenindo algumas reações bioquímicas, que também podem alterar as características do mesmo (DÍAZ-MAROTO et al., 2003).

Considerando este aspecto, estudos de diferentes métodos de secagem e suas possíveis influências sobre as características dos extrativos, como rendimento e composição química, possuem grande importância para detectar possíveis interferências sobre sua quantidade e qualidade (EBADI et al., 2015).

Os métodos de secagem mais citados na literatura baseiam-se na imposição de temperatura controlada, como secagem em estufa de ar quente às temperaturas de 45 °C, 65 °C e até a 80 °C, secagem em forno micro-ondas, secagem por fluxo de ar controlado em temperatura ambiente, secagem por liofilização, além de secagem ao ar livre com temperatura ambiente (RAHIMMALEK; GOLI, 2013; BARBOSA et al., 2006; SELLAMI et al., 2011; VENSKUTONIS, 1997).

A secagem por micro-ondas pode acarretar o aumento da eficiência de extração de certos compostos, à medida que a pressão criada pelo vapor durante o

aquecimento por micro-ondas causa modificações nos tecidos vegetais, aumentando sua porosidade. Estas modificações contribuem para a remoção mais rápida da umidade assim como a extração de compostos (ROUTRAY; ORSAT; GARIEPY, 2014; LI et al., 2019). Já o processo de secagem por liofilização é considerado um método que preserva as características e principalmente a aparência do material vegetal fresco. Propicia também maior eficiência de extração, através do processo de desidratação a baixas temperaturas, estas são capazes ainda de minimizar alguns dos processos de degradação (DÍAZ-MAROTO et al., 2003; CHUA et al., 2019).

No caso de plantas produtoras de OEs, podem ocorrer algumas mudanças nas concentrações dos compostos voláteis durante os processos de secagem. Tais mudanças podem estar ligadas a fatores como o método de secagem utilizado e as características do material vegetal a ser processado (VENSKUTONIS, 1997). Da mesma forma, se pode observar que a secagem e os métodos utilizados podem ter influência também sobre a liberação ou retenção dos compostos voláteis presentes no material vegetal (SELLAMI et al., 2011).

1.1.4 Fungos apodrecedores da madeira

Os fungos estão presentes em diversos locais na natureza como em jardins, parques, matas, até mesmo em gramados e na arborização urbana, ou seja, onde encontrem as condições propícias ao seu desenvolvimento (BAUMER, 2009). Para o desenvolvimento de microorganismos como os fungos apodrecedores na madeira, são necessárias algumas condições básicas específicas, relacionadas à fonte de alimento, que são a presença de celulose, hemicelulose e lignina, à temperatura, onde a faixa ótima para o desenvolvimento seria no intervalo de 24 a 32 °C, o teor de oxigênio livre de aproximadamente 1% permitindo o estabelecimento fúngico, e o pH entre 4,5 e 5,5. Ainda, o teor de umidade da madeira que coincide com o ponto de saturação das fibras, onde geralmente também enquadram-se as condições ótimas para o desenvolvimento fúngico e ainda propiciam espaço físico para a propagação de seus esporos (CARVALHO et al., 2009; KIM; SUTLEY; MARTIN, 2019; MORESCHI, 2013). A madeira quando está sob o ataque de fungos, segundo Santos (1992), podem ocorrer alterações que atingem a composição química,

resistência física e mecânica, permeabilidade, capacidade acústica, assim como maior susceptibilidade a ataques de insetos.

Entre os micro-organismos presentes na natureza que mais causam a degradação da madeira estão os fungos decompositores, estes agem colapsando as partes como celulose, hemicelulose e lignina. O início da degradação pelos fungos apodrecedores da madeira se dá através da penetração da hifa fúngica pelo lúmen da célula vegetal, resultando no acúmulo de secreções metabólicas provindas do estabelecimento do patógeno. A interação destas secreções também gera resposta da parede celular fúngica pela produção de enzimas que facilitem a penetração das hifas (CARVALHO et al., 2009; RAMBO, 2014).

Para o entendimento da dinâmica da atividade antifúngica e o possível controle das infecções fúngicas são utilizados como referência alguns mecanismos de ação tanto do hospedeiro quanto do patógeno, podendo ser observados os eventos que propiciam a ocorrência da infecção fúngica, por exemplo através de falhas nas defesas ou pelas respostas através das enzimas da parede celular. Entre outros métodos, a determinação do conteúdo de ergosterol é utilizado como um indicador de biomassa fúngica, visto que o ergosterol é o principal esteroide de membranas fúngicas (KELLY et al., 1995; NIEMENMAA; GALKIN; HATAKKA, 2008; CARVALHO et al., 2009). Os compostos utilizados no controle destes micro-organismos, extrativos ou drogas fungicidas, podem apresentar diferentes mecanismos de ação. Um dos mais relevantes é a ação primária na inibição da biossíntese do ergosterol, isto pode resultar na formação de membranas plasmáticas defeituosas estando diretamente relacionadas ao estabelecimento fúngico (KELLY et al., 1995; RAMBO, 2014).

Em relação aos fungos decompositores da madeira, os quais desencadeiam perdas econômicas, pode-se classificá-los, segundo Carvalho et al. (2009), em fungos de decomposição branca os quais podem degradar os três componentes da parede celular vegetal, celulose, hemicelulose e lignina; fungos de decomposição parda, que são capazes de degradar as frações polissacarídicas, que são a celulose e hemicelulose, e os fungos de decomposição branda que degradam os polissacarídeos e a também a lignina, porém mais vagarosamente. Dentre estes, estão descritos na literatura os da classe basidiomiceto, na qual estão os fungos causadores de podridão-parda, *Lentinus lepideus* (Fr.) Fr., que ataca os polissacarídeos da parede celular, confere à madeira coloração pardacenta, e

podridão-branca, como *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat., que ataca tanto polissacarídeos quanto lignina, porém causa coloração mais clara à madeira atacada (OLIVEIRA et al., 2005).

1.2 PROPOSIÇÃO

O presente estudo teve como objetivo avaliar rendimento, composição química e atividade antifúngica do OE das folhas de *O. lancifolia*.

Para isso, teve-se como objetivos específicos:

- Investigar a atividade antifúngica do OE de *O. lancifolia* na inibição de crescimento micelial de fungos basidiósporos, causadores da podridão-parda e podridão-branca na madeira, *G. applanatum* e *L. lepideus*, respectivamente.
- Investigar o efeito do OE sobre o teor de ergosterol dos fungos *G. applanatum* e *L. lepideus*.
- Analisar a composição química do OE das folhas de *O. lancifolia* submetidas a cinco diferentes métodos de secagem.
- Verificar rendimento e densidade dos OE extraídos das folhas de *O. lancifolia* submetidas as diferentes métodos de secagem.

1.3 MATERIAIS E MÉTODOS

1.3.1 Coleta e identificação da espécie

As folhas de *O. lancifolia* foram coletadas em uma população nativa no distrito de Santo Antônio, na cidade de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil, sob as coordenadas 29° 37' Sul e 53° 52' Oeste. A espécie foi identificada por João Batista Baitello e um exemplar do material coletado está arquivado no Herbário do Departamento de Ciências Florestais, da Universidade Federal de Santa Maria (HDCF / UFSM) sob o número 6399.

1.3.2 Preparo do material vegetal: diferentes tratamentos

1.3.2.1 Folhas frescas

Ao serem coletadas as folhas da espécie *O. lancifolia* parte do material vegetal foi separado e utilizadas fresco para extração.

1.3.2.2 Secagem ao ar à temperatura ambiente

Na secagem ao ar à temperatura ambiente, as folhas foram expostas em ambiente fechado e climatizado à temperatura de aproximadamente 22 ± 2 °C, com luz fluorescente em períodos de aproximadamente 8 horas claro/ 16 horas escuro, por 14 dias.

1.3.2.3 Secagem por liofilização

Para a realização da secagem por liofilização, primeiramente as amostras de folhas foram congeladas a -30 °C por um período de 48 horas, em seguida estas foram transferidas para Liofilizador de bancada modelo L101 (Fabricante: Liobras) por um período de 120 horas a uma temperatura de -45 °C e pressão de 200 µHg (VENSKUTONIS, 1997).

1.3.2.4 Secagem em forno Micro-ondas

Para a secagem em forno micro-ondas foi realizado teste piloto com base em estudos realizados por Sellami et al. (2011), para definir o tempo ótimo para a espécie *O. lancifolia*. Este processo de secagem foi realizado em micro-ondas digital doméstico (Panasonic: NN-ST369WRUK) com as seguintes características: 220 V-60Hz, 800We. O ajuste de tempo foi feito com a ajuda do relógio do próprio forno, totalizando 2 minutos de secagem por amostra na potência de 500W.

1.3.2.5 Secagem em estufa

As folhas de *O. lancifolia* foram submetidas à estufa de secagem com circulação de ar (Fabricante: J Prolab) com termômetro digital atingindo

temperaturas de 37 a 70 °C, sendo utilizadas para amostras distintas temperaturas, de 45 °C, por um período de 7 dias e a 60 °C por 5 dias, sendo os períodos de exposição ao forno adaptados, realizando se pesagens diárias até peso constante das folhas secas.

1.3.3 Extração dos óleos essenciais

Os óleos essenciais foram obtidos a partir de folhas secas pelos diferentes métodos de secagem, assim como de folhas frescas. Em todos os tratamentos as folhas foram moídas em multiprocessador doméstico (marca:Philco;modelo: All in one Citrus) e posteriormente foram submetidas à hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger por 3 horas (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). Após a extração dos OEs, separadamente, foi calculado o rendimento em relação ao peso seco de material vegetal extraído (% m.m⁻¹) e a densidade (g.mL⁻¹).

1.3.4 Análise da composição química do óleo essencial

As análises das composições químicas dos OE foram realizadas, quantitativamente através de cromatografia gasosa (CG) em cromatógrafo gasoso 7890A (Agilent) equipado com detector por ionização de chama (DIC). Na realização destas análises foi utilizada coluna capilar de sílica HP-5 (5% fenil, 95% metilsiloxano; 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm de espessura de fase), com o gás de arraste Hélio (1 mL/min) e o volume de injeção das amostras 2,0 µL (2:1000 em hexano; v/v). A temperatura inicial do forno foi de 40 °C, mantida isotermicamente por 4 min sendo, gradualmente, elevada até 320 °C numa taxa de 4 °C/min. O tempo total de cada análise foi de 76 min, onde injetor e detector foram operados à 300 °C (PINHEIRO, 2014).

As análises qualitativas das amostras foram realizadas em um cromatógrafo gasoso 7890A acoplado a um detector de espectrometria de massas Agilent modelo 5975C, com ionização por impacto de elétrons a 70 eV, utilizando coluna capilar HP5-MS (5% fenil, 95% metilsiloxano; 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm de espessura de fase). As temperaturas do injetor, interface, fonte de íons e detector foram mantidas a 250, 280, 230 e 150 °C, respectivamente. Como gás de arraste foi utilizado o Hélio (1 mL/min) e o aquecimento do forno programado da mesma forma descrita acima. A

identificação dos constituintes dos OE foi feita por comparação dos índices de retenção de Kovats (IR), os quais foram calculados através de uma curva obtida com uma mistura padrão de *n*-alcanos (C8-C32), injetados nas mesmas condições descritas anteriormente e pela fragmentação dos espectros de massas com os dados documentados nas espectrotecas (ADAMS, 2009; NIST, 2009). As análises cromatográficas dos OE foram realizadas através do *software* MS Chemstation Data Analysis (Agilent Technologies, versão 2.0).

1.3.5 Bioensaio de atividade antifúngica e mecanismo de ação

1.3.5.1 Cultivo dos fungos apodrecedores

Para os ensaios de avaliação da atividade antifúngica *in vitro*, foram realizados em colaboração com a Prof^a. Dr^a. Marlove Fátima Brião Muniz, do Laboratório de Fitopatologia, do Departamento de Defesa Fitossanitária da UFSM. Foram utilizadas as espécies de fungos apodrecedores da madeira *Ganoderma applanatum* e *Lentinus lepideus*. Os fungos utilizados foram obtidos a partir da repicagem das colônias puras isoladas e cedidas pelo Engenheiro Florestal Dr. Fernando Nunes Gouveia, do Laboratório de Produtos Florestais da Universidade Federal de Brasília.

Para o bioensaio foram usados discos de aproximadamente 15 mm contendo o micélio dos fungos citados anteriormente. Estes foram transferidos para o centro de placas de Petri, previamente esterilizadas, contendo BDA e o OE, nas concentrações de 1,0; 1,5; 2,0; e 5,0 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ a serem testadas, diluídas em etanol (1:1). O monitoramento para fins de avaliação iniciou após 24 horas de incubação, e seguiu-se a cada 48 horas, através de medições do diâmetro da colônia, sendo considerada a média de duas medidas diametralmente opostas. Estas foram realizadas em intervalos de dois, até as colônias fúngicas atingirem $\frac{3}{4}$ do diâmetro da placa (7 dias).

O índice de crescimento micelial (ICM), foi calculado pela fórmula adaptada por Oliveira (1992), onde:

$$ICM = \left[\left(\frac{C1}{N1} \right) + \left(\frac{C2}{N2} \right) + \dots + \left(\frac{Cn}{Nn} \right) \right]$$

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:

$$\% = \left[\frac{(CT - Ct) * 100}{CT} \right]$$

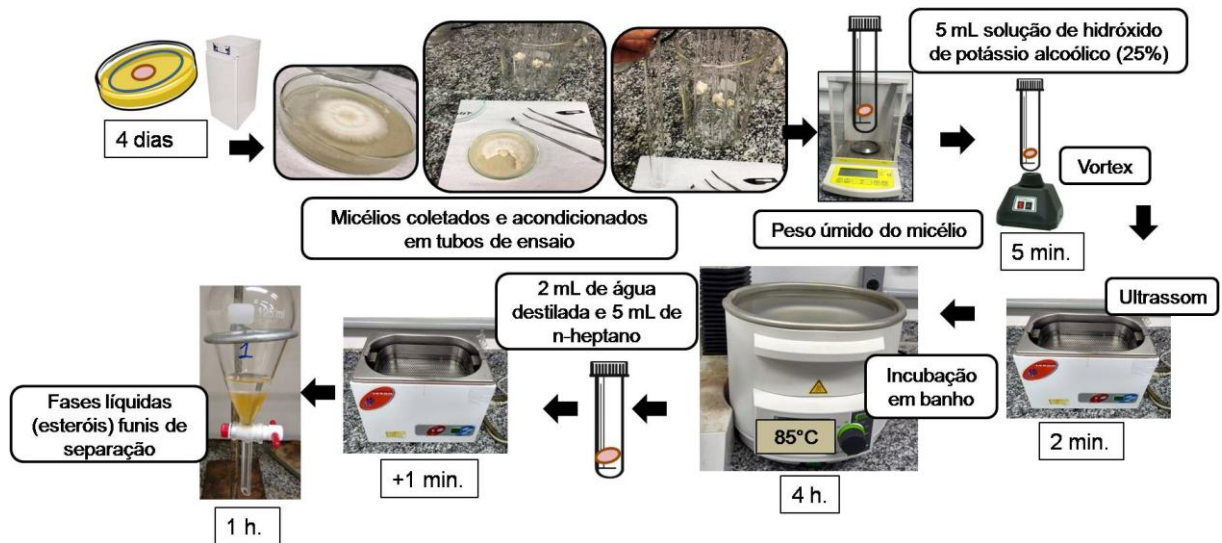
Onde CT e Ct correspondem ao crescimento micelial na testemunha e no tratamento, respectivamente.

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

O estudo da possível ação do OE sobre o conteúdo de ergosterol foi realizado de acordo com método adaptado de Kedia et al. (2014). Neste método foi avaliada a interação das espécies fúngicas com o OE de *O. lancifolia* na concentração de $1,0 \mu\text{L mL}^{-1}$. Após quatro dias de incubação, os micélios das espécies fúngicas foram coletados e acondicionados separadamente em tubos de ensaio, quando o peso úmido do micélio fúngico foi verificado. Posteriormente, 5 mL de uma solução de hidróxido de potássio alcoólico (25%) foi adicionada a cada um dos tubos. Em seguida, os mesmos foram agitados em vórtex por um período de 5 minutos, seguido de 2 minutos no ultrassom. Em seguida, foram submetidos à incubação em banho de água a 85°C por 4 horas.

Após o período de incubação, os esteróis foram extraídos de cada amostra por adição de uma mistura de 2 mL de água destilada e 5 mL de n-heptano, seguida pela agitação em ultrassom pelo período de 1 minuto. Posteriormente, as fases líquidas contendo os esteróis foram transferidas para funis de separação e deixadas à temperatura ambiente por 1 hora, para que ocorresse a separação das camadas (Figura 2).

Figura 2 – Esquema do experimento adaptado para a avaliação do conteúdo de ergosterol na interação do OE folhas de *Ocotea lancifolia* com fungos apodrecedores da madeira



Fonte: autor (2019).

A camada de n-heptano foi então coletada e analisada por espectrofotometria entre 230 e 300 nm. A presença de ergosterol e de seu intermediário 24 (28)-dehidroergosterol foi caracterizada por uma curva composta por quatro picos. A ausência de ergosterol nas amostras seria indicada por uma linha plana.

A quantidade de ergosterol foi calculada considerando a porcentagem de peso úmido de cada micélio fúngico, a partir das fórmulas:

$$\% \text{ de ergosterol} + \% \text{ 24(28) dehidroergosterol} = (A_{282}/290) / \text{ peso do micélio fúngico};$$

$$\% \text{ 24(28) dehidroergosterol} = (A_{230}/518) / \text{ peso do micélio fúngico};$$

$$\% \text{ de ergosterol} = (\% \text{ de ergosterol} + \% \text{ 24(28) dehidroergosterol}) - \% \text{ de 24(28) dehidroergosterol}.$$

Onde:

290 é o valor de E (%/cm) determinado para ergosterol cristalino.

518 é o valor de E (%/cm) determinado para 24 (28) dehidroergosterol.

Peso do micélio fúngico é considerado seu peso úmido (g).

A redução percentual na quantidade de ergosterol foi calculada pela fórmula:

$$(C - T)/C \times 100$$

Onde: C é o percentual de ergosterol no controle e T é o percentual de ergosterol no tratamento avaliado.

1.3.6 Análise estatística

Todos os dados foram testados para verificar a normalidade e homogeneidade de variâncias, aos quais não se adequaram, portanto foi utilizado teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis para as análises. Os mesmos foram apresentados relativos à média \pm desvio padrão, com diferença significativa ao nível de $P < 0,05$. As análises foram realizadas com o auxílio do software GraphPad Prism. Em relação à comparação da composição e os métodos de secagem, esta foi realizada por Análises de Agrupamento Hierárquico (AAH), usando o método de Ward com distância euclidiana como medida de dissimilaridade. Os resultados obtidos a partir da análise AAH foram complementados pela Análise de Componentes Principais (ACP). Para análise multivariada, os dados foram submetidos ao software estatístico PAST- Paleontological Statistics, Versão 3.25.

2 ARTIGO 1 –ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS DE *OCOTEA LANCIFOLIA* (SCHOTT) MEZ: INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DE FUNGOS APODRECEDORES DA MADEIRA E INFLUÊNCIA SOBRE O TEOR DE ERGOSTEROL

Bibiana Fontana Batista^a, Nadia Helena Bianchini^a, Alana Silveira Pavlack^b, Guilherme Elias Andrade^b, Fernando Gouveia^c, Marlove Fátima Brião de Muniz^d, Berta Maria Heinzmann^{a,e*}

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

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

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

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

^eDepartamento 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.

RESUMO

ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS DE *OCOTEA LANCIFOLIA* (SCHOTT) MEZ: INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DE FUNGOS APODRECEDORES DA MADEIRA E INFLUÊNCIA SOBRE O TEOR DE ERGOSTEROL

O presente estudo teve como objetivo analisar a composição química do óleo essencial (OE) de folhas de *O. lancifolia* e o seu efeito antifúngico *in vitro*, frente a duas espécies de fungos apodrecedores da madeira, no ano de 2018. As espécies *Lentinus lepideus* (Fr.) Fr. e *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat. foram cultivadas em presença do óleo essencial, determinando-se o índice de crescimento micelial (ICM) a percentagem de inibição de crescimento e a possível ação do OE sobre o teor de ergosterol, componente da membrana celular fúngica. A caracterização da composição química do OE foi feita por cromatografia gasosa e a atividade antifúngica foi verificada pela medida do crescimento radial do micélio fúngico. O meio de cultivo foi o BDA o qual foi suplementado com o OE nas concentrações de 1,0; 1,5; 2,0; e 5,0 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, previamente diluídas em etanol. Ainda foram considerados: controle negativo (etanol a 1,0 $\mu\text{L.mL}^{-1}$) e controle positivo (propiconazol a 1,0 $\mu\text{L.mL}^{-1}$). Os principais compostos presentes no OE foram: óxido de cariofileno (41,46%), γ -curcumen-15-al (17,05%), Z- α -trans-Bergamotol (7,52%) e acetato de E-nerolidila (6,33%). Para as duas espécies fúngicas, o OE inibiu o crescimento do micélio, sendo esse dependente de concentração, o ICM afetado significativamente nas concentrações de 1,5; 2,0 e 5,0 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ aos quais não diferiram do controle positivo (fungicida comercial). A maior concentração apresentou atividade fungicida frente a *L. lepideus*. A avaliação do teor de ergosterol demonstrou certa diminuição em seu conteúdo, nas duas espécies fúngicas, quando expostas ao OE, porém mais pronunciada na espécie *L. lepideus*.

Palavras-chave: Lauraceae. Bioatividade. Extrativos. Sesquiterpenoides. Ergosterol. Canela-pilosa.

ABSTRACT

The objective of the present study was to analyze the chemical composition of the essential oil (EO) of *O. lancifolia* leaves and its antifungal effect *in vitro* against two species of wood rot fungi, in the year 2018. The species *Lentinus lepideus* (Fr.) Fr. and *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat. were cultivated in the presence of the essential oil, determining the mycelial growth index (MCI), the growth inhibition percentage and the possible action. Of EO on the content of ergosterol, component of the fungal cell membrane. The characterization of the chemical composition of the EO was made by gas chromatography and the antifungal activity was verified by measuring the radial growth of the fungal mycelium. The culture medium was BDA which was supplemented with OE at concentrations of 1,0; 1,5; 2,0; and 5,0 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, previously diluted in ethanol. Also considered were: negative control (1,0 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ ethanol) and positive control (1,0 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ propiconazole). The main compounds present in the EO were: caryophyllene oxide (41,46%), γ -curcumen-15-al (17,05%), Z- α -trans-Bergamotol (7,52%) and E-acetate nerolidyl (6,33%). For both fungal species, OE inhibited mycelium growth, being this concentration dependent, the ICM significantly affected at concentrations of 1,5; 2,0 and 5,0 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ which did not differ from the positive control (commercial fungicide). The highest concentration showed fungicidal activity against *L. lepideus*. The evaluation of ergosterol content showed some decrease in its content, in both fungal species, when exposed to EO, but more pronounced in the species *L. lepideus*.

Keywords: Lauraceae. Bioactivities. Extractives. Sesquiterpenoids. Ergosterol. Canela-pilosa.

1 INTRODUÇÃO

As espécies vegetais são um grupo com grande potencial para geração de produtos inovadores provindos de seus extrativos vegetais. A utilização destas abrange diversos setores que possuem importância cultural e econômica frente à humanidade, como na alimentação, medicina, perfumaria e cosméticos, além de subsidiar pesquisas de substâncias ativas envolvidas na capacidade de interação entre plantas, macro e microrganismos (MARQUES, 2001; SINGH; SINGH, 2012). Dentre os materiais ligados diretamente ao uso racional e sustentável de recursos naturais, sendo importante ferramenta para o manejo e conversão dos mesmos, estão os produtos florestais não-madeiros (MARQUES, 2001; PINHEIRO, 2014).

O gênero *Ocotea* compreende mais de 350 espécies, é pertencente à família Lauraceae; muitas das espécies deste gênero possuem importância econômica considerável para indústria de alimentos, perfumaria e medicamentos (FOURNET et al., 2007; BALLABENI et al., 2007; CAMARGO, 2011; SALLEH; AHMAD, 2017). São espécies ricas em óleos essenciais (OEs) com diversas atividades biológicas descritas na literatura como citotóxica, antibacteriana e antifúngica, anti-inflamatória, antioxidante, entre outras (MARQUES, 2001; SALLEH; AHMAD, 2017).

Os OEs compreendem uma classe de extrativos muito promissora, sendo misturas complexas de substâncias químicas voláteis que desempenham importantes funções ecológicas para as plantas de forma geral, seja através da resistência ao ataque de organismos patogênicos, seja pela atração de polinizadores e dispersores de sementes, favorecendo a sobrevivência da planta no ambiente (TAIZ, et al., 2017; ISMAN; MACHIAL, 2006). Tendo em vista algumas destas funções, os compostos químicos presentes nos OEs podem ser relacionados a bioatividades importantes de resistência e assim são considerados promissores para a geração e formulação de produtos naturais para utilização como agentes antifúngicos toxicológica e ambientalmente mais seguros (TAIZ, et al., 2017; TIAN et al., 2012; KEDIA et al., 2014). Para o óleo essencial (OE) da espécie *Ocotea lancifolia* existem relatos sobre a atividade anestésica e sedativa em peixes e ainda atividade do OE frente à espécie de fungo causador de podridão de sementes (SILVA et al., 2013; SILVA et al., 2018).

Microrganismos como fungos causadores do apodrecimento da madeira estão entre os maiores agentes de perdas econômicas nos diversos setores de utilização e processamento de madeira. A espécie *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat. é

causadora de podridão branca na madeira e a espécie *Lentinus lepideus* (Fr.) Fr., por sua vez, causa a podridão-parda. Estas espécies de fungos podem ainda causar deterioração das raízes, colo, além de troncos de árvores. São, portanto, espécies alvo de interesse na pesquisa, visando à possível geração de métodos eficientes de controle, devido aos danos que podem causar (CARVALHO et al., 2009).

O presente estudo teve por objetivo analisar a composição química do OE de folhas de *O. lancifolia*, assim como seu efeito antifúngico, através da determinação do índice de crescimento micelial *in vitro* de fungos apodrecedores da madeira, além da averiguação de um possível modo de ação deste óleo na concentração de importante componente da membrana celular fúngica, através da determinação do conteúdo de ergosterol.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

Folhas de *O. lancifolia* foram coletadas de indivíduos adultos, no período de abril de 2013 a março de 2014, sendo as coletas distribuídas em todas as estações do ano. De uma população nativa no distrito de Santo Antônio, na cidade de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil, sob as coordenadas 29° 37' Sul e 53° 52' Oeste, conforme descrito por Silva et al. (2018). A espécie foi identificada por João Batista Baitello, e um exemplar do material coletado está arquivado no Herbário do Departamento de Ciências Florestais, Universidade Federal de Santa Maria (HDCF / UFSM) sob o número 6399.

2.2 EXTRAÇÃO E ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL

O OE foi obtido a partir de folhas frescas, as quais foram trituradas em multiprocessador doméstico da marca Philco, (modelo All in one Citrus), e posteriormente foram submetidas à hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger por 3 horas (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010), em triplicata. O extrativo testado neste trabalho resultou da reunião dos OEs de folhas de *O. lancifolia* coletadas nas quatro estações do ano de acordo com Silva et al. (2018), este *pool* foi armazenado em freezer à baixa temperatura por aproximadamente quatro anos.

A análise da composição química do *pool* dos OEs foi realizada, quantitativamente através de cromatografia gasosa (CG) em cromatógrafo gasoso 7890A (Agilent) equipado com detector por ionização de chama (DIC). Este procedimento foi realizado em coluna capilar de sílica fundida HP-5 (5% fenil, 95% metilsiloxano; 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm de espessura de fase), com o gás de arraste Hélio (1 mL/min) e o volume de injeção das amostras de 2,0 µL (2:1000 em hexano; v/v). A temperatura inicial do forno foi de 40 °C, mantida isotermicamente por 4 min sendo, gradualmente, elevada até 320 °C à 4 °C/min. O tempo total de cada análise foi de 76 min., onde injetor e detector foram operados à 300 °C (SILVA et al., 2018).

As análises qualitativas das amostras foram realizadas em um cromatógrafo gasoso 7890A acoplado a um detector de espectrometria de massas Agilent modelo 5975C, com ionização por impacto de elétrons a 70 eV, fazendo uso de coluna capilar de sílica fundida HP5-MS, com as mesmas especificações acima citadas. As temperaturas do injetor, interface, fonte de íons e detector foram mantidas a 250 °C, 280 °C, 230 °C e 150 °C, respectivamente. O gás de arraste e o aquecimento do forno foram os mesmos descritos anteriormente.

A identificação dos constituintes do *pool* dos OEs foi feita por comparação dos índices de retenção de Kovats (IR), os quais foram calculados através de uma curva obtida por uma mistura padrão de *n*-alcanos (C8-C32), injetados em condições iguais as descritas anteriormente e pela fragmentação dos espectros de massas comparados com os dados documentados nas espectrotecas (ADAMS, 2009; NIST, 2009). As análises cromatográficas dos OE foram realizadas por meio do *software* MS Chemstation Data Analysis (Agilent Technologies, versão 2.0).

2.3 BIOENSAIO ANTIFÚNGICO *IN VITRO* COM FUNGOS APODRECEDORES DA MADEIRA

Os bioensaios para verificação da atividade antifúngica *in vitro* foram realizados no ano de 2018, em colaboração com o Laboratório de Fitopatologia, do Departamento de Defesa Fitossanitária da UFSM. Sendo utilizadas as espécies de fungos apodrecedores da madeira *Ganoderma applanatum* e *Lentinus lepideus*, as quais foram obtidas a partir da repicagem das colônias puras isoladas e cedidas pelo

Engenheiro Florestal Dr. Fernando Nunes Gouveia, do Laboratório de Produtos Florestais da Universidade Federal de Brasília.

No bioensaio foram usados discos de aproximadamente 15 mm contendo o micélio dos fungos citados anteriormente, estes foram transferidos para o centro de placas de Petri, previamente esterilizadas, contendo meio de cultura constituído de batata, dextrose e ágar (BDA: 200, 20 e 18 g respectivamente, em 1L de água destilada) e o *pool* dos OEs, nas concentrações de 1,0; 1,5; 2,0; e 5,0 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ a serem testadas, diluídas em etanol (1:1), sendo feitas seis repetições por tratamento. Posteriormente, as placas foram incubadas em BOD com temperatura controlada para 25 ± 2 °C, com fotoperíodo de 12 horas. O monitoramento para fins de avaliação iniciou após 24 horas de incubação e seguiu sendo feita a cada 48 horas, através de medições do diâmetro da colônia, sendo considerada a média das duas medidas diametralmente opostas, realizadas em intervalos de dois em dois dias, até as colônias fúngicas atingirem $\frac{3}{4}$ do diâmetro da placa (7 dias).

O índice de crescimento micelial (ICM), foi calculado pela fórmula adaptada por Oliveira (1992), onde: $ICM = \left[\left(\frac{C_1}{N_1} \right) + \left(\frac{C_2}{N_2} \right) + \dots + \left(\frac{C_n}{N_n} \right) \right]$. 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: $\% = \left[\frac{(CT - Ct) * 100}{CT} \right]$. Onde CT e Ct correspondem ao crescimento micelial na testemunha e no tratamento, respectivamente.

2.4 EXTRAÇÃO DE ERGOSTEROL DOS FUNGOS AVALIADOS

Para o estudo da possível ação do *pool* dos OEs sobre o conteúdo ergosterol foi realizado no ano de 2019 no Laboratório de Extrativos Vegetais, na UFSM, de acordo com método adaptado (KEDIA et al., 2014; TIAN et al., 2012), em que foi avaliada a interação das espécies fúngicas com o OE de *O. lancifolia* na concentração de 1,0 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ com seis repetições por tratamento. Após quatro dias de incubação, os micélios das espécies fúngicas foram coletados e acondicionados separadamente em tubos de ensaio, quando o peso úmido do micélio fúngico foi verificado. Posteriormente, 5 mL de uma solução de hidróxido de potássio alcoólico (25%) foi adicionada a cada um dos tubos. Em seguida, os mesmos foram agitados

em vórtex por um período de 5 minutos, seguido de 2 minutos no ultrassom. Em seguida, foram submetidos à incubação em banho de água a 85 °C por 4 horas.

Posteriormente, o período de incubação, os esteróis foram extraídos de cada amostra por adição de uma mistura de 2 mL de água destilada e 5 mL de n-heptano, seguida pela agitação em ultrassom pelo período de 1 minuto. Posteriormente, as fases líquidas contendo os esteróis foram transferidas para funis de separação e deixadas à temperatura ambiente por 1 hora, para que ocorresse a separação das camadas.

A camada de n-heptano foi então coletada e analisada por espectrofotometria entre 230 e 300 nm. A presença de ergosterol e de seu intermediário 24(28)-dehidroergosterol é caracterizada por uma curva composta por quatro picos. A ausência de ergosterol nas amostras é indicada por uma linha plana.

A quantidade de ergosterol foi calculada considerando a porcentagem de peso úmido de cada micélio fúngico, a partir das fórmulas:

% de ergosterol + % 24(28)-dehidroergosterol = (A_{282/290})/ peso do micélio fúngico;

% 24(28)-dehidroergosterol = (A_{230/518})/ peso do micélio fúngico;

% de ergosterol = (% de ergosterol + % 24(28)-dehidroergosterol) - % de 24(28)-dehidroergosterol.

Onde: 290 é o valor de E (%/cm) determinado para ergosterol cristalino; 518 é o valor de E (%/cm) determinado para 24(28)-dehidroergosterol; Peso do micélio fúngico é considerado seu peso úmido (g).

A redução percentual na quantidade de ergosterol foi calculada pela fórmula:

$$(C - T)/C \times 100.$$

Onde: C é o percentual de ergosterol no controle e T é o percentual de ergosterol no tratamento avaliado.

2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram submetidos aos testes de normalidade e homogeneidade de variâncias e não atenderam aos pressupostos, portanto foi utilizado teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis para as análises. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão, com diferença significativa ao nível de P < 0,05. As análises foram realizadas com o auxílio do software GraphPad Prism.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL

A análise da composição química do pool dos OEs obtidos de folhas de *O. lancifolia*, feita por GC-MS e GC-FID, possibilitou a identificação e quantificação de 25 compostos químicos presentes no extrativo, representando 97,42% da composição volátil total do OE (Tabela 1). As classes de compostos mais representativas identificadas no OE foram a dos sesquiterpenoides oxigenados, representando 89,21% das substâncias identificadas no OE, e a classe dos hidrocarbonetos oxigenados não derivados do isopreno com 5,67%. O composto majoritário identificado foi o óxido de cariofileno, com 41,46 % da composição total do OE, seguido de γ -curcumen-15-al (17,05%), Z- α -trans-bergamotol (7,52%), acetato de E-Nerolidila (6,33%) e criptomeriona (3,68%). Em análises do OE extraído de folhas de espécies de *Ocotea*, da mesma forma, foi observada na composição química principalmente a classe de compostos sesquiterpenoides, representando em média de 40 a 80% da composição total (TAKAKU; HABER; SETZER, 2007).

O composto majoritário óxido de cariofileno é utilizado em cosméticos e como conservante de alimentos, este é considerado uma substância aromatizante natural e pode ser preparado sinteticamente, possui atividade citotóxica, antibacteriana, e propriedades antifúngicas (SILVA et al. 2010; SILVA et al. 2018). No presente estudo a elevada concentração desta substância demonstra uma potencialidade para a valorização do extrativo pela indústria farmacêutica e alimentícia. Outro composto presente no OE e que é considerado majoritário é o γ -Curcumen-15-al (17,05%), este também foi relatado como um dos compostos majoritários da espécie *Pulicaria gnaphalodes*, com atividade antibacteriana, onde este representou 5,64% da composição total do OE de folhas. Também entre os majoritários da última espécie citada destacou-se o composto óxido de cariofileno, com 4,20% (BASHI; GHANI; ASILI, 2013).

Tabela 1 – Composição química do óleo essencial de folhas de *Ocotea lancifolia*

Pico	Constituinte	IK Cal	IK Lit	%	Classe
1	Sabineno	951	955	0,09	HM
2	β - <i>E</i> -Ocimeno	1071	1062	0,23	HM
3	Acetato de 3-octanol	1126	1124	0,17	HC
4	Ascaridol	1239	1238	0,36	MO
5	Aromadendreno	1475	1470	0,48	SO
6	Ligulóxido	1536	1536	2,79	SO
7	Hidrato de <i>E</i> -Sesquisabineno	1579	1579	0,11	SO
8	Óxido de cariofileno	1591	1592	41,46	SO
9	Espatuleno	1622	1622	1,30	SO
10	Cedr-8(15)-en-10-ol	1651	1652	0,87	SO
11	Neointermedeol	1660	1660	1,36	SO
12	5-neo-Cedranol	1685	1685	1,22	SO
13	Acorenona	1691	1691	1,34	SO
14	Z- α -trans-Bergamotol	1705	1707	7,52	SO
15	Acetato de <i>E</i> -Nerolidila	1719	1717	6,33	SO
16	Criptomeriona	1726	1724	3,68	SO
17	γ -Curcumen-15-al	1768	1768	17,05	SO
18	Squamuloso	1771	1772	1,00	SO
19	Avocadinofurano	1826	1826	0,48	HO
20	Acetatoeudesm-7(11)-en-4-ol	1843	1840	1,67	SO
21	Cubiteno	1871	1878	1,69	HD
22	Metil 5,7-hexadecadinoato	1923	1913	0,76	HO
23	Oxacicloheptadecan-2-eno	1941	1934	2,42	HO
24	Benzoato degeranila	1959	1959	1,03	SO
25	Laurenan-2-eno	2112	2116	2,01	HO
Composição total identificada				97,42%	

Onde: IK Cal = Índice de Kovats calculado; IK Lit = Índice de Kovats encontrado na literatura; HM= Hidrocarbonetos Monoterpênicos; MO= Monoterpenoides oxigenados; HS= Hidrocarbonetos Sesquiterpênicos; SO= Sesquiterpenoides oxigenados. HC= Hidrocarbonetos não derivados do isopreno; HO= Hidrocarbonetos oxigenados não derivados do isopreno; HD: Hidrocarbonetos diterpênicos.

Fonte: Autor (2019).

O óxido de cariofileno já foi identificado em OEs de outras espécies de Lauraceae, tais como *Ocotea cujumary* representando 12,4% do OE de folhas, ao qual foi atribuída atividade antibacteriana e citotóxica *in vitro*. Ainda, no OE de galhos da espécie *Licaria rígida* foi identificado o composto óxido de cariofileno, na porcentagem de 29,88% e atividade antioxidante, antibacteriana e citotóxica. Além disso, a análise da composição química do OE da espécie *Beilschmiedia maingayi* detectou o composto entre os majoritários, com cerca de 11,0% e com atividades

anti-inflamatória, antioxidante, antibacteriana e antifúngica descritas para o extrativo (DAMASCENO et al., 2019).

Estudos sobre a composição química de óleos essenciais de outras espécies do gênero *Ocotea* demonstram que estas podem apresentar um espectro amplamente variável quimicamente, tanto de espécie para espécie, dentro da mesma espécie, até mesmo em órgãos vegetais distintos (TAKAKU; HABER; SETZER, 2007; SALLEH; AHMAD, 2017; SILVA et al., 2018; DAMASCENO et al., 2019). As variações de composição, tanto de compostos majoritários quanto dos minoritários, podem ser decorrentes de condições como, local e período de coleta, incidência solar, precipitação, período vegetativo da espécie coletada e até mesmo condições de armazenamento (GOBBO-NETO; LOPES, 2007). Existem relatos que fatores como a sazonalidade influem tanto no rendimento extrativo, quando na composição química de algumas espécies de Lauraceae (GOBBO-NETO; LOPES, 2007; SILVA et al., 2015; SILVA et al., 2018).

Para OEs de folhas da mesma espécie utilizado-a em estudo para verificação do efeito da sazonalidade nos extrativos obtidos de 12 indivíduos pelo período de 12 meses (2013-2014), Silva et al. (2018) observaram 26 substâncias em sua composição química, as quais foram em diferentes presenças e concentração, porém apresentou o mesmo composto majoritário que no presente estudo, o composto óxido de cariofileno, com 42,2% da composição do OE de folhas coletados no verão. Neste estudo os sesquiterpenoides foram à classe de composto predominante, representando cerca de 80% da composição do OE. Outro estudo utilizando a mesma espécie vegetal, também identificou o composto óxido de cariofileno como majoritário, representando cerca de 56,0 % do OE (SILVA et al., 2013). Apesar de as espécies de *Ocotea* variarem quimicamente, alguns autores consideram sua composição volátil formada principalmente por compostos monoterpenoides, sesquiterpenoides e fenilpropanoides (TAKAKU; HABER; SETZER, 2007; SILVA, J. K. et al., 2017; SALLEH; AHMAD, 2017; ALCOBA et al., 2018; SILVA et al., 2018).

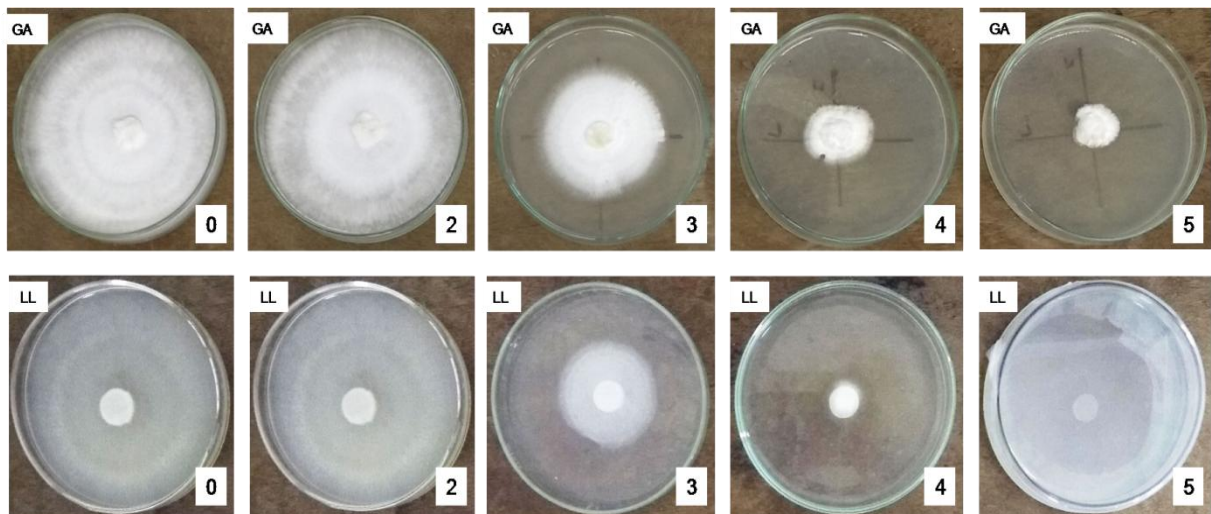
Os demais compostos, ditos minoritários, foram distintos em comparação aos encontrados para a espécie na literatura, esta variação na composição química pode ser atribuída às características citadas anteriormente ou até mesmo à degradação de alguns destes compostos que muitas vezes são mais sensíveis ao armazenamento. Pois o pool de OEs utilizado no presente estudo ficou armazenado

em freezer, à baixa temperatura, por um período de cerca de quatro anos, para utilização posterior, porém por mais que provável, não é possível afirmar que tal mudança foi decorrente do mesmo. Portanto, estudos para verificação da estabilidade química do OE de *Ocotea lancifolia* frente ao armazenamento seriam necessários e de importância relevante para possibilitar tais afirmações.

3.2 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA *IN VITRO*

O OE nas concentrações testadas demonstrou influência no crescimento dos micélios fúngicos assim como refletiu na porcentagem de inibição, enquanto que o etanol utilizado como diluente, na concentração testada, não interferiu no crescimento do micélio dos fungos (Figura 1).

Figura 1 – Experimento de inibição do crescimento micelial *in vitro* do óleo essencial de folhas de *Ocotea lancifolia* (OE) em *Ganoderma applanatum* (GA) e *Lentinus lepideus* (LL)



Onde: 0 corresponde ao controle negativo; 2 concentração 1,0 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de OE; 3 concentração 1,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ OE; 4 concentração 2,0 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de OE; 5 concentração 5,0 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de OE.
Fonte: autor (2019).

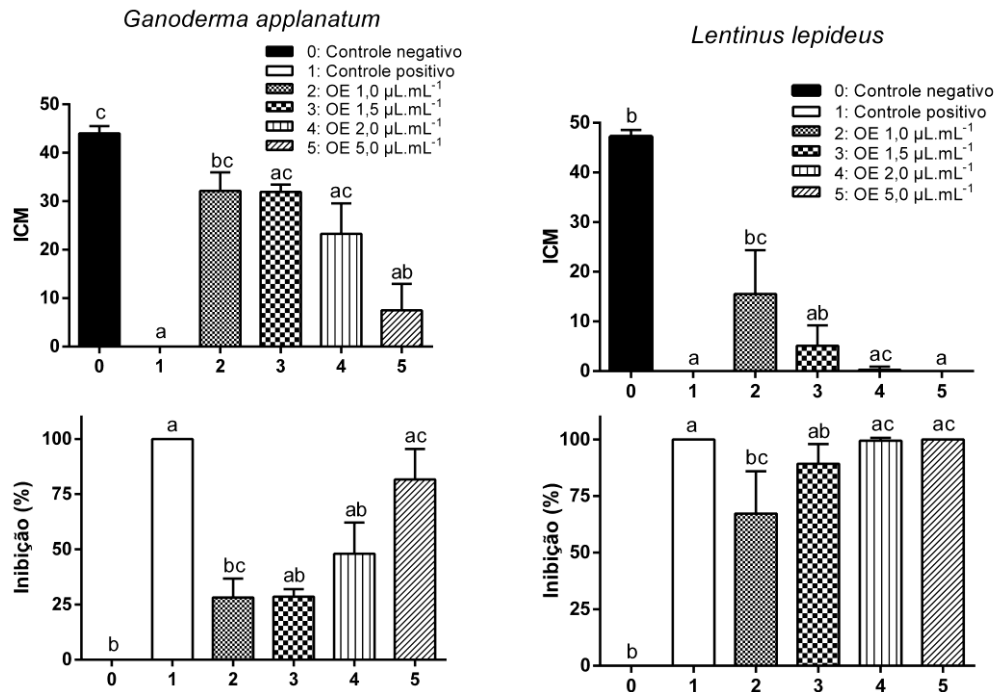
Para a espécie de podridão branca *G. applanatum*, a análise dos dados demonstrou que o OE inibiu o crescimento da espécie fúngica refletindo no ICM a partir da concentração intermediária de 1,5 $\mu\text{L}.\text{mL}^{-1}$, e ainda que as concentrações de 1,5; 2,0 e 5,0 $\mu\text{L}.\text{mL}^{-1}$ do OE foram estatisticamente iguais entre si e ao controle positivo, o fungicida comercial Propiconazol (Figura 2). Estes resultados demonstram o alto potencial do OE já na segunda menor concentração testada, sendo igual

estatisticamente ao que se pode considerar a inibição desejável, ou seja, aquela ocasionada pelo fungicida comercial. Os resultados para a percentagem de inibição demonstraram que as concentrações de 1,0; 1,5 e 2,0 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ semelhante estatisticamente apresentando valores de inibição de $28,16 \pm 3,50$; $28,58 \pm 1,92$; $47,98 \pm 5,75$; respectivamente. Enquanto o maior percentual de inibição na maior concentração do OE testada (5,0 $\mu\text{L.mL}^{-1}$) foi observada inibição de $81,62 \pm 5,66$, sendo igual estatisticamente ao do controle positivo, que teve 100% de inibição (Figura 2).

Os resultados para os valores do ICM obtidos para espécie *L. lepidus*, causadora de podridão parda, demonstraram a mesma tendência do que no caso da espécie de podridão branca, sendo que concentrações de 1,5; 2,0 e 5,0 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ também foram significativamente iguais ao controle positivo e entre si. Para a percentagem de inibição do crescimento, as concentrações, da mesma forma, não diferiram entre si e do controle positivo (Figura 2). Esta espécie demonstrou-se mais suscetível ao extrativo, sendo observados os percentuais de inibição $67,28 \pm 7,61$ na concentração de 1,0 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, seguida de $89,23 \pm 3,56$ para 1,5 $\mu\text{L.mL}^{-1}$. Ainda, o OE na concentração de 5,0 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ inibiu o crescimento micelial em 100% ($100,00 \pm 0,00$) o qual foi igual estatisticamente a concentração de 2,0 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ ($99,42 \pm 0,58$) sendo que a maior concentração apresentou atividade fungicida frente à espécie *L. lepidus*. Esta atividade foi verificada através de procedimento em que o disco contendo o micélio fúngico exposto ao extrativo, sem apresentar crescimento, foi transferido assepticamente para um meio de cultura fresco, no qual possuía plenas condições de desenvolvimento, porém este não ocorreu, caracterizando a morte do fungo.

Não foram encontrados na literatura relatos da atividade do OE da espécie *O. lancifolia* frente as espécies fúngicas causadoras de podridão da madeira. Silva et al. (2018) observou inibição do crescimento micelial *in vitro* da espécie *Fusarium moniliforme*, um dos principais agentes de podridão de sementes, pelo OE dessa espécie obtido de folhas, frutos e inflorescências, onde foi constatado que o OE do pool de folhas coletadas ao longe de um ano, na concentração de 1,0 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ causou inibição do crescimento de 67,5% de *F. moniliforme*.

Figura 2 – Índice de crescimento micelial *in vitro* (ICM) e inibição do crescimento micelial *in vitro* (%) com aplicação do óleo essencial de folhas de *Ocotea lancifolia* (OE) de *Ganoderma applanatum* e *Lentinus lepideus*



O propiconazol foi usado como controle positivo. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média.

Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste de Kruskal-Wallis ($P < 0,005$).

Fonte: autor (2019).

Entretanto, existem relatos da capacidade antioxidante e antifúngica do extrato bruto de folhas obtidos da mesma espécie, *O. lancifolia*, frente às espécies fúngicas *Trametes versicolor* e *Gloeophyllum trabeum*, causadoras de podridão parda da madeira (SILVA et al., 2017a). Estudo da atividade antifúngica do OE de *Hesperozygis ringens* frente às mesmas espécies de fungos apodrecedores da madeira avaliadas nesse estudo, demonstrou inibição do crescimento na concentração de 1,5 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ para as espécies *G. applanatum* e *L. lepideus* em comparação com o controle negativo e diferindo do controle positivo (PINHEIRO, 2018).

O OE de folhas da espécie *Nectandra grandiflora*, pertencente à família Lauraceae, causou a inibição do crescimento micelial de outras espécies de fungos apodrecedores da madeira, *Pycnoporus sanguineus* (fungos de podridão branca) e *Gloeophyllum trabeum* (fungos de podridão parda). Neste caso foi observada inibição do crescimento significativa na concentração de 5,0 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, sendo

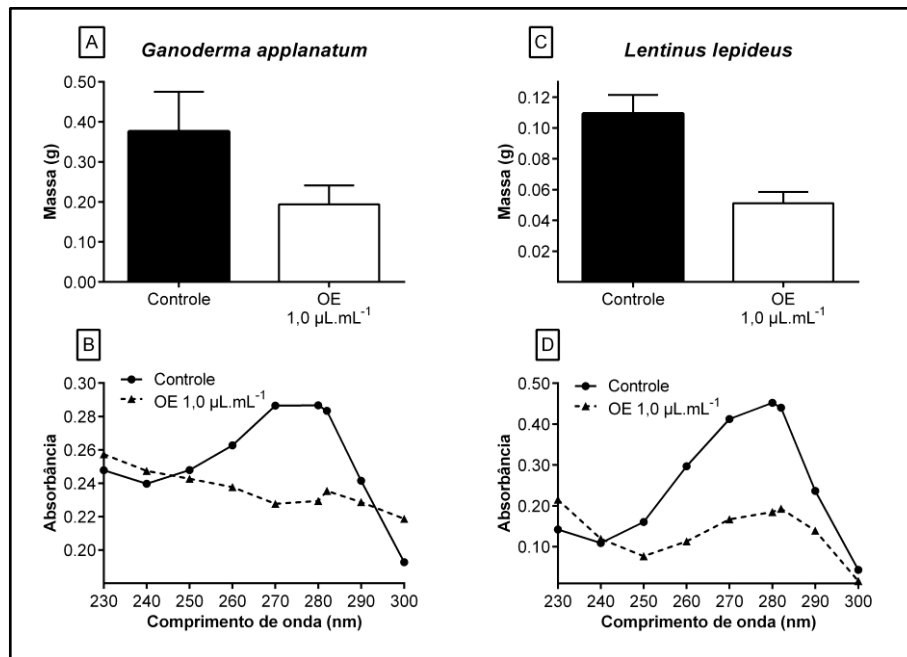
detectada inibição de 79,03% para a espécie de podridão branca e 94,76% do crescimento do fungo de podridão parda (SILVA et al., 2016). O OE de folhas de outra espécie de Lauraceae, *Cinnamomum zeylanicum*, foi testado a fim de inibir o crescimento micelial das espécies fúngicas *Trametes hirsuta*, fungo de podridão branca da madeira, e *Laetiporus sulphureus*, fungo de podridão marrom. Esse OE inibiu 100% do crescimento micelial das espécies fúngicas na concentração de 400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (XIE et al., 2017). Os resultados demonstram que a atividade antifúngica, observada pela inibição do crescimento micelial é dependente principalmente da concentração de extrativo utilizado e ainda, da espécie fúngica e da composição química do extrativo.

3.3 EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL NO TEOR DE ERGOSTEROL NA MEMBRANA PLASMÁTICA DOS FUNGOS APODRECEDORES

Para o teste foi utilizada a concentração de 1,0 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ que ocasionou a inibição do crescimento parcial nos testes de atividade antifúngica *in vitro*. Desta forma, foi possível a avaliação do efeito do extrativo no conteúdo de ergosterol nas membranas fúngicas de *G. applanatum* e *L. lepideus*. A partir da concentração de 1,5 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ o crescimento do micélio fúngico foi significativamente afetado, o que poderia inviabilizar a análise do conteúdo do ergosterol, pois para os processos decorrentes de tal análise experimental, é necessário efeito parcial no crescimento da espécie fúngica.

A massa úmida do micélio fúngico para a espécie de fungo *G. applanatum* exposta ao OE, em comparação como controle, não teve diferença estatisticamente significativa (Figura 3A). Para o conteúdo de ergosterol, as médias das absorbâncias na faixa de 282 nm, referentes aos derivados do ergosterol, indicam que a presença do OE gerou uma redução de 48,24% do conteúdo do esterol quando comparado ao controle (Figura 3B). Os resultados para a espécie fúngica *L. lepideus* revelaram que a massa úmida do micélio não foi estatisticamente diferente do controle (Figura 3C), porém neste tratamento houve uma maior redução no teor do ergosterol, de 61,68% em comparação ao controle (Figura 3D).

Figura 3 – Massa úmida micelial (g) e valores de absorvância de esteróis extraídos do micélio de *Ganoderma applanatum* (A, B) e *Lentinus lepideus* (C, D) em meio contendo $1,0 \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ de óleo essencial de *Ocotea lancifolia*



Fonte: Autor (2019).

O efeito das atividades antifúngicas de extrativos vegetais já é bastante descrito na literatura, esta bioatividade pode estar relacionada a diversos mecanismos de ação, como na eliminação de radicais livres, interação com enzimas e principalmente perturbação e interrupção da integridade da membrana celular fúngica (VALETTE et al., 2017). Muitos dos agentes antifúngicos produzidos pelas indústrias farmacêuticas e de agroquímicos têm como principal ação a interferência na biossíntese ou na função de esteróis, com o resultado de inibição do crescimento e morte dos fungos (SHREAZ et al., 2016).

As espécies de canelas são ricas fontes de inúmeros compostos químicos, existe relato do composto cinamaldeído, identificado principalmente em OEs de espécies do gênero *Cinnamomum*, da mesma família botânica da espécie *O. lancifolia*, como principal agente de alteração e dano à parede celular e a membrana plasmática fúngica. Este composto teve sua atividade refletida na diminuição do conteúdo de ergosterol contra fungos de podridão branca (*Trametes versicolor* e *Lenzites betulina*) e fungo de podridão parda (*Laetiporus sulphureus*) (SHREAZ et al., 2016).

Ao testar o OE de *Cinnamomum jensenianum*, espécie da família Lauraceae, Tian et al. (2012) observaram a diminuição do teor de ergosterol na membrana plasmática de *Aspergillus flavus*, pelo efeito das diferentes concentrações testadas. Estudo realizado por Pinheiro (2018), sobre a influência do OE de *Hesperozygis ringense* do seu composto majoritário (pulegona) frente às espécies *G. applanatum* e *L. lepideus*, porém não detectou diferenças no conteúdo de ergosterol das membranas em relação ao controle.

Desta forma o estudo sobre a interação de óleos essenciais e sua influência no conteúdo do ergosterol na membrana plasmática de espécies fúngicas representam um dos principais alvos de investigação de sobre a atividade dos componentes extrativos. Frente a isto, sabe-se que a atividade geralmente é dependente da concentração do OE testada, podendo também se dar através de compostos isolados dos mesmos (PINTO et al., 2006; KEDIA et al., 2014; BIANCHINI, 2017; PINHEIRO, 2018). Ao causar a inibição do crescimento fúngico, os compostos podem causar a interrupção das vias biossintéticas normais do ergosterol, resultando na diminuição da biossíntese deste composto, podendo assim causar uma redução considerável na quantidade de ergosterol, até a morte do fungo (PINTO et al., 2006; TIAN et al., 2012; KEDIA et al., 2014).

4 CONCLUSÃO

O óleo essencial de folhas de *Ocotea lancifolia* é majoritariamente composto por sesquiterpenoides e o composto majoritário identificado foi o óxido de cariofileno. Tanto o fungo de podridão branca (*Ganoderma applanatum*) quanto o fungo de podridão parda (*Lentinus lepideus*) foram suscetíveis ao extrativo, sendo a atividade antifúngica dependente de concentração. A atividade fungicida foi verificada apenas na maior concentração do OE para o fungo de podridão parda *L. lepideus*. Foi observada uma tendência à redução do teor de ergosterol no micélio em decorrência da atividade antifúngica do óleo essencial de *O. lancifolia*.

REFEÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, R. P. Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy. **Illinois**: Allured Publishing Corporation, 2009. 804 p.
- ALCOBA, A. E. T. et al. Chemical composition and *in vitro* antileishmanial and cytotoxic activities of the essential oils of *Ocotea dispersa* (Nees) Mez and *Ocotea odorifera* (Vell) Rohwer (Lauraceae). **Natural Product Research**, v. 32, n. 23, p. 2865-2868, 2018.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopéia Brasileira**. 5. ed. Brasília: ANVISA, 2010.
- BASHI, D. S., GHANI, A.; ASILI, J. Essential oil composition of *Pulicaria gnaphalodes* (Vent.) Boiss. Growing in Iran. **Journal of Essential oil Bearing Plants**, v. 16, n. 2, p. 252-256, 2013.
- BALLABENI, V. et al. Antiplatelet and antithrombotic activities of essential oil from wild *Ocoteaquixos* (Lam.) Kosterm. (Lauraceae) calices from Amazonian Ecuador. **Pharmacological Research**, v. 55, p. 23-30, 2007.
- BIANCHINI, N. H. **Óleos essencial de *Nectandra grandiflora* Nees & Mart. ex Nees: efeito antifúngico e bioestimulante em cultivos *in vitro***. 2017. 97f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal)–Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2017.
- CAMARGO, M. J. **Estudo químico de plantas do cerrado: *Ocotea lancifolia* (Schott) MEZ- Lauraceae**. 2011.203f. Tese (Doutorado em Química)–Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 2011.
- CARVALHO, W. et al. Uma visão sobre a estrutura, composição e biodegradação da madeira. **Química Nova**, v. 32, p. 2191-2195, 2009.
- DAMASCENO, C. S. B. et al. Chemical composition and biological activities of essential oils in the family Lauraceae: a systematic review of the literature. **Journal of Medicinal Plant and Natural Product Research**, 2019.<https://doi.org/10.1055/a-0943>
- FOURNET, A. et al. Phytochemical and antiprotozoal activity of *Ocotea lancifolia*. **Fitoterapia**, v. 78, p. 382-382, 2007.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, p. 374-381, 2007.
- 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.

KEDIA, A. et al. Antifungal, antiaflatoxicogenic, and insecticidal efficacy of pearmint (*Mentha spicata* L.) essential oil. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 89, p.29-36, 2014.

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

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

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.

PINHEIRO, C. G. **Óleo essencial de *Hesperozygis ringens* (BENTH.) Epling: variabilidade do rendimento, composição química e atividades biológicas**. 2014. 91f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal)–Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2014.

PINHEIRO, C. G. ***Hesperozygis ringens* (BENTH.) Epling: Caracterização dos órgãos vegetativos, análise histoquímica e atividade antifúngica do óleo essencial**. 2018. 124f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal)–Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2018.

PINTO, E. et al. Antifungal activity of the essential oil of *Thymuspulegioides* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, p. 1397-1373, 2006.

SALLEH, W. M. N. H. W.; AHMAD, F. Phytochemistry and Biological Activities of the Genus *Ocotea* (Lauraceae): A Review on Recent Research Results (2000-2016), **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 7, n. 5, p. 204-218, 2017.

SHREAZ, S. et al. Cinnamaldehyde and its derivatives, a novel class of antifungal agents. **Fitoterapia**, v. 31, p. 112-116, 2016.

SILVA, C. M. et al. Sesquiterpenóids of *Senecio bonariensis* Hook. & Arn., Asteraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n.1, 2010.

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. et al. Chemical composition and inhibitory effects of *Nectandra grandiflora* leaves essential oil against wood decay fungi. **Drewno**, v. 16, n. 197, p. 189-198, 2016.

SILVA, D. T. et al. Physicochemical characterization of leaf extracts from *Ocotea lancifolia* and its effect against wood-rot fungi, **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 117, p. 158-170, 2017.

SILVA, D. T., et al. Microbiological damage influences the content, chemical composition and the antifungal activity of essential oils in a wild-growing population of *Ocotea lancifolia*. **Journal of Essential Oil Research**, v. 30, p. 265-277, 2018.

SILVA, J. K. et al. Chemical diversity, biological activity, and genetic spectra of three *Ocotea* Species from the Amazon. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 1081, 2017.

SILVA, L. L. et al. Anesthetic activity of Brazilian native plants in silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Neotropical Ichthyology**, v. 11, n. 2, p. 442-451, 2013.

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

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

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.

VALETTE, N. et al. Antifungal activities of wood extractives. **Fungal Biology Reviews**, v. 31, p. 113-123, 2017.

XIE, Y. et al. Antifungal activity of several essential oils and major components against wood-rot fungi. **Industrial Crops and Products**, v. 108, p. 278-285, 2017.

3 ARTIGO 2 –EFEITO DE DIFERENTES MÉTODOS DE SECAGEM SOBRE RENDIMENTO, DENSIDADE, COR E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS DE *OCOTEA LANCIFOLIA* (SCHOTT) MEZ

Bibiana Fontana Batista^a, Nadia Helena Bianchini^a, Alana Silveira Pavlackb, Guilherme Elias Andrade^b, Marlove Fátima Birão de Muniz^c, Berta Maria Heinzmann^{a,d*}

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

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

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

^dDepartamento 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.

RESUMO

EFEITO DE DIFERENTES MÉTODOS DE SECAGEM SOBRE RENDIMENTO, DENSIDADE, COR E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS DE *OCOTEÁ LANCIFOLIA* (SCHOTT) MEZ

Os compostos que estão presentes nos óleos essenciais (OEs) estão diretamente ligados as suas atividades biológicas e a sua utilização. Visando o processamento de grande quantidade de material vegetal e para a manutenção e até a maximização dos requisitos de qualidade, são empregados métodos de secagem. Desta forma o estudo objetivou observar a influência e a relação de diferentes métodos de secagem sobre o rendimento, densidade, propriedades organolépticas e compostos químicos do óleo essencial (OE) de folhas de *O. lancifolia*, comparando-os com as características do óleos essenciais de folhas frescas. O material vegetal fresco foi submetido à hidrodestilação, método de extração também utilizado para folhas após à secagem ao ar, por liofilização, em micro-ondas, em estufa a 45 ou 60 °C, estes processos foram realizados no laboratório de extrativos vegetais, no ano de 2019. A secagem e extração foram realizadas em triplicata, sendo utilizados 350 g para folhas frescas e 250 g para as demais. O rendimento foi calculado em percentagem. As composições foram analisadas por cromatografia gasosa (CG) acoplada à espectrometria de massas e CG com detector por ionização de chama. Os rendimentos (% m/m) dos óleos essenciais foram de: 0,4863%; 0,7400%; 1,050%; 1,1167%; 0,5867% e 0,7487%, respectivamente. Os métodos de secagem por micro-ondas e liofilização forneceram os maiores teores de óleo essencial. Não foi observada diferença nas densidades. Houve mudança drástica de cor dos óleos essenciais, obtidos de folhas secas em estufa, em ambas as temperaturas. O composto majoritário identificado em todos os óleos essenciais foi o óxido de cariofileno, variando sua percentagem entre os tratamentos. Os demais componentes apresentaram diferenças significativas por vezes em sua estrutura e/ou na percentagem presente. Tempo e temperatura de secagem foram relacionados às modificações e processos de degradação de algumas das substâncias químicas presentes no extrativo, resultando por vezes em mudança na cor e na composição do OE.

Palavras-chave: Lauraceae. Extrativo vegetal. Processamento pós colheita. Mudança de cor. Óxido de cariofileno.

ABSTRACT

The compounds that are present in essential oils (OEs) are directly linked to their biological activities and their use. In order to process large amounts of plant material and to maintain and even maximize quality requirements, drying methods are employed. Thus, the study aimed to observe the influence and relationship of different drying methods on yield, density, organoleptic properties and chemical compounds of the essential oil (OE) of *O. lancifolia* leaves, comparing them with the characteristics of the essential oils of Fresh leaves. The fresh plant material was submitted to hydrodistillation, extraction method also used for leaves after air drying, freeze drying, in a microwave oven, in an oven at 45 or 60 °C, these processes were carried out in the plant extraction laboratory in 2019. Drying and extraction were performed in triplicate, using 350 g for fresh leaves and 250 g for the others. The yield was calculated as a percentage. The compositions were analyzed by gas chromatography (GC) coupled to the mass spectrometry and flame ionization detector GC. Yields (% w / w) of essential oils were: 0.4863%; 0.7400%; 1.050%; 1.1167%; 0.5867% and 0.7487%, respectively. Microwave drying and lyophilization methods provided the highest levels of essential oil. No difference in densities was observed. There was a drastic change in the color of the essential oils obtained from oven dried leaves at 45 and 60°C. The major compound identified in all essential oils was caryophyllene oxide, varying its percentage between treatments. The other components showed significant differences sometimes in their structure and / or percentage. Time and drying temperature were related to the modifications and degradation processes of some of the chemical present in the extractives, sometimes resulting in changes in the color and composition of the essential oil.

Keywords: Lauraceae. Plant extractive. Post harvest processing. Color change. Caryophyllene oxide.

1 INTRODUÇÃO

Muitas vezes aliado aos métodos de secagem é interessante realizar estudos sobre as características bioativas dos extrativos de materiais vegetais, pois através da secagem também podem ocorrer interferências qualitativas e quantitativas em sua composição química e, conseqüentemente, na atividade biológica dos seus extrativos. Os materiais vegetais com alto potencial de utilização para fins condimentares e medicinais, além de seus extrativos e outros produtos gerados a partir de matérias primas vegetais com finalidade de comercialização, necessitam preencher alguns requisitos de qualidade, como características sensoriais e organolépticas, propriedades e conteúdo de seus compostos bioativos, carga microbiana, teor, rendimento e composição química (CHUA et al., 2019; TAIZ, et al., 2017; CORRÊA et al., 2004). Além destes requisitos, a observação da estabilidade dos mesmos é de suma importância para a conservação destes produtos, sendo a secagem do material vegetal considerada um dos processamentos pós-colheita relacionada à manutenção destas características desejáveis (CHUA et al., 2019; DÍAZ-MAROTO et al., 2003; FERREIRA; AQUILA, 2000; ISMAN; MACHIAL, 2006).

Os óleos essenciais (OEs) são consumidos no mundo todo, e o Brasil possui destaque no mercado destes produtos no que se refere a sua produção e exportação, principalmente devido ao óleo essencial (OE) de frutos cítricos. Estes extrativos são um conjunto complexo de diferentes compostos, entre eles hidrocarbonetos de cadeia simples e ramificada, destacando-se os monoterpenos e sesquiterpenos, que também podem encontrar-se oxigenados. Os componentes dos OE são produtos do metabolismo secundário das plantas, que estão presentes não só nos frutos, mas nas flores, folhas, cascas, madeira, sementes, raízes e rizomas (VITTI; BRITO, 2003; MORAIS, 2009). Os compostos que estão presentes nos OE geralmente estão ligados à ação e aos fins de utilização atribuídos aos mesmos, desta forma a análise da composição química dos OE torna-se fundamental para se relacionar suas bioatividades aos componentes do extrativo (FERREIRA; AQUILA, 2000; ISMAN; MACHIAL, 2006; GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

A espécie *Ocotea lancifolia* (Schott) Mez é nativa no Rio Grande do Sul, com ocorrência no Brasil e no Paraguai (SILVA et al., 2018). As espécies do gênero são expressivas representantes da família Lauraceae, as quais se desenvolvem em climas tropicais e subtropicais. Estas possuem grande importância econômica com uso na indústria de móveis, indústria de alimentos, perfumaria e medicamentos

(SALLEH; AHMAD, 2017; BALLABEN et al., 2007; QUINET et al., 2015; FOURNET et al., 2007; MARQUES, 2001). Para a espécie *O. lancifolia* já foram descritos estudos na literatura relativos a sua atividade antioxidante, antifúngica, sedativa e anestésica em peixes, e ainda atividade antiparasitária (CAMARGO, 2011; SILVA et al., 2013; SALLEH; AHMAD, 2017; SILVA et al., 2017a; SILVA et al., 2018).

Para a manutenção e até a maximização dos requisitos de qualidade, existem diversos estudos sobre o emprego de métodos de secagem, a fim de garantir a estabilidade bioquímica e microbiológica da matéria prima, principalmente nos casos do processamento industrial de grande quantidade de material vegetal. Alguns autores relacionam à secagem a ação benéfica e outros a maléfica, sendo dependente da espécie e da técnica utilizada. Destacam ainda a importância de identificar técnicas de secagem adequadas para as características específicas e finalidades de uso do material (CHUA et al., 2019, SELLAMI et al., 2011; GONELI et al., 2014). Tendo em vista o acima exposto, o estudo objetivou avaliar a influência de diferentes métodos de secagem sobre o rendimento, densidade, aparência, cor e composição química do OE de folhas de *O. lancifolia*.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

Folhas de *O. lancifolia* foram coletadas em uma população nativa no distrito de Santo Antão, na cidade de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil, sob as coordenadas 29° 37' Sul e 53° 52' Oeste. Foram realizadas duas coletas em dezembro de 2018, na primavera, em um intervalo de menos de uma semana, sendo feitas coletas no período da manhã. O material vegetal da área de coleta já havia sido identificado por João Batista Baitello, para o estudo realizado por Silva et al. (2018). Um exemplar do mesmo foi arquivado no Herbário do Departamento de Ciências Florestais, Universidade Federal de Santa Maria (HDCF / UFSM) sob o número 6399.

2.2 MÉTODOS DE SECAGEM DO MATERIAL VEGETAL

As folhas coletadas foram divididas em seis lotes para utilização no presente estudo. Foram considerados, para fins de comparação e análise do OE, um lote de

(1) folhas frescas e os outros seis submetidos aos métodos de secagem, (2) folhas secas ao ar, (3) folhas secas por liofilização, (4) folhas secas em micro-ondas, (5) folhas secas em estufa a 45 °C e (6) folhas secas em estufa a 60 °C. A secagem em cada um dos métodos foi feita em triplicata. As condições e métodos de secagem empregados foram selecionados considerando os estudos de Sellami et al. (2011) e Rahimmalek e Goli (2013), com adaptações. Os diferentes métodos utilizados necessitaram de diferentes períodos de tempo até as folhas atingirem o ponto de secagem. As folhas secas ao ar necessitaram de 14 dias, folhas secas por liofilização 120 horas, 2 minutos para folhas secas em micro-ondas na potência de 500W, folhas secas em estufa a 45 °C necessitaram de 5 dias e 7 dias para folhas secas em estufa a 60 °C.

2.3 EQUIPAMENTOS DE SECAGEM

Para a secagem ao ar, as folhas foram expostas a ambiente climatizado à temperatura de 22 ± 2 °C em sala fechada, com luz fluorescente de aproximadamente 8 horas claro/ 16 horas escuro. Na secagem por liofilização, primeiramente as amostras de folhas foram congeladas a -30 °C por um período de 48 horas, em seguida estas foram transferidas para Liofilizador de bancada modelo L101 (Liobras) por um período de 120 horas a uma temperatura de -45 °C e pressão de 200 μ Hg. A secagem por micro-ondas foi realizada em forno digital doméstico (Panasonic NN-ST369WRUK) com as seguintes características: 220 V-60Hz, ajuste de tempo com o auxílio do relógio digital do próprio forno e potência de 500W. A secagem em estufa foi realizada em estufa de circulação de ar forçada (J Prolab) com termômetro digital nas temperaturas de 45 e 60 °C.

2.4 EXTRAÇÃO E ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL

Foram utilizados 350 g para cada extração de folhas frescas e 250 g de folhas secas, para os diferentes métodos de secagem. As folhas foram moídas em multiprocessador doméstico modelo All in one Citrus (Philco). Posteriormente os lotes dos diferentes tratamentos foram submetidos à hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger por 3 horas (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010), em triplicata. Após este período o OE de cada tratamento foi coletado, observando-se sua coloração e

posteriormente foi calculado o rendimento em relação ao peso seco de material vegetal extraído (% m.m⁻¹) e a densidade do OE (g.mL⁻¹).

As análises das composições químicas dos OE foram realizadas, quantitativamente, através de cromatografia gasosa (CG) em cromatógrafo gasoso 7890A (Agilent) equipado com detector por ionização de chama (DIC). Para a análise foi utilizada coluna capilar de sílica HP-5 (5% fenil, 95% metilsiloxano; 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm de espessura de fase), com o gás de arraste Hélio (1 mL/min) e volume de injeção das amostras de 2,0 µL (2:1000 em hexano; v/v). A temperatura inicial do forno foi de 40 °C, mantida isotermicamente por 4 min sendo, gradualmente, elevada até 320 °C à 4 °C/min. O tempo total de cada análise foi de 76 min, onde injetor e detector foram operados à 300 °C (AMARAL et al., 2015).

As análises qualitativas das amostras foram realizadas em um cromatógrafo gasoso 7890A acoplado a um detector de espectrometria de massas Agilent modelo 5975C, com ionização por impacto de elétrons a 70 eV, utilizando coluna capilar HP5-MS (5% fenil, 95% metilsiloxano; 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm de espessura de fase). As temperaturas do injetor, interface, fonte de íons e detector foram mantidas a 250, 280, 230 e 150 °C, respectivamente. Os demais parâmetros foram os mesmos descritos anteriormente. A identificação dos constituintes dos OE foi feita por comparação dos índices de retenção de Kovats (IR), os quais foram calculados através de uma curva obtida com uma mistura padrão de *n*-alcanos (C8-C32), injetados nas mesmas condições descritas anteriormente e pela fragmentação dos espectros de massas com os dados documentados nas espectrotecas (ADAMS, 2009; NIST, 2009). As análises foram realizadas através do *software* MS Chemstation Data Analysis (Agilent Technologies, versão 2.0).

2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados de rendimento e densidade foram testados para verificar a normalidade e homogeneidade de variâncias, aos quais não se adequaram, portanto foi utilizado teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis para as análises. Os mesmos estão apresentados relativos à média ± desvio padrão, com diferença significativa ao nível de $P < 0,05$. As análises foram realizadas com o auxílio do *software* GraphPad Prism. As relações das análises da composição e os métodos de secagem foram realizadas por Análises de Agrupamento Hierárquico (AAH), usando o método de

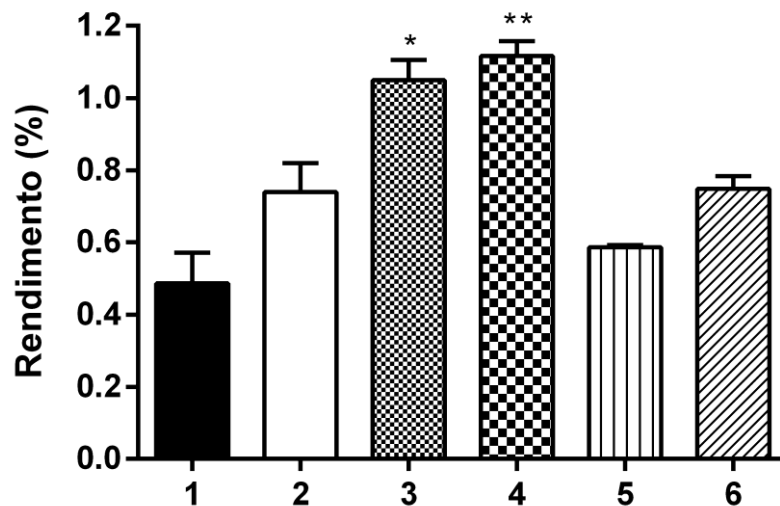
Ward com distância euclidiana como medida de dissimilaridade. Os resultados obtidos a partir da análise AAH foram complementados por Análise de Componentes Principais (ACP). Desta forma, foram construídas duas matrizes de dados usando valores médios das integrações de pico obtidas a partir da análise de GC-FID, onde os constituintes $\geq 1,0\%$, pelo menos em uma amostra, e os métodos de secagem foram considerados como casos. Para análise multivariada, os dados foram submetidos ao software PAST-Paleontological Statistics, Versão 3.25.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 EFEITO DOS MÉTODOS DE SECAGEM NO RENDIMENTO E DENSIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL

O resultado percentual do rendimento obtido para o OE de folhas frescas que foi de 0,4863% (Figura 1). Para os demais métodos de secagem, o maior rendimento foi observado para o OE extraído de folhas secas por micro-ondas, sendo este de 1,1167%, seguido de folhas secas por liofilização 1,050%. As secagens em estufa a 45 °C e 60 °C tiveram rendimentos de 0,5867 e 0,7487% respectivamente, e secagem ao ar 0,7400%. Através da análise estatística dos resultados de rendimento do OE para folhas secas, considerando cada método de secagem em comparação com o de folhas frescas (Figura 1) foi evidenciado que os métodos de secagem por liofilização e em micro-ondas propiciaram um maior rendimento extrativo, as quais foram estatisticamente diferentes do de folhas frescas e dos demais tratamentos de secagem. Os métodos que demonstraram maior rendimento no presente estudo são considerados tecnologias de secagem inovadoras, utilizados no processamento pós colheita de plantas utilizadas como condimentos e para a obtenção de extrativos, desta forma, a aplicação destas tecnologias alternativas emergentes é de interesse crescente, a fim de melhorar o rendimento extrativo (CHUA et al., 2019).

Figura 1 – Rendimento do óleo essencial de *Ocotea lancifolia* em comparação com (1) folhas frescas quanto aos métodos de secagem, (2) folhas secas ao ar, (3) folhas secas por liofilização, (4) folhas secas em micro-ondas, (5) folhas secas em estufa a 45 °C e (6) folhas secas em estufa a 60 °C



*Médias com diferença significativa ($P < 0,005$). ** Médias com diferença significativa ($P < 0,001$) pelo teste de Kruskal-Wallis.

Fonte: Autor (2019).

Silva et al. (2018), ao analisarem o OE de *O. lancifolia* extraído de folhas frescas, coletadas nas quatro estações do ano e na mesma área de estudo, relataram os maiores teores de OE em coletas realizadas na primavera e verão, com rendimentos médios de 1,03 e 0,96%, respectivamente. O material vegetal utilizado para o presente estudo foi coletado na primavera, uma das estações que forneceu alto rendimento extrativo para o OE da espécie. Porém o período de coleta foi marcado por temperaturas mais amenas para a região de sua realização, que geralmente é de temperaturas mais elevadas e intensa incidência solar no mês de dezembro. Estes fatores podem levar tanto ao aumento quanto a diminuição do rendimento dos extrativos na dependência da espécie, já havendo relatos destas relações para outros representantes da família Lauraceae (SILVA et al., 2015; AMARAL et al., 2015). Desta forma, as condições climáticas podem ter influenciado negativamente o rendimento de OE obtido de folhas frescas da mesma população.

Alguns autores propõem que a secagem do material vegetal antes do processo de hidrodestilação pode resultar em aumento do rendimento extrativo (CHUA et al., 2019; SELLAMI et al., 2011). O teor de OE de folhas secas pode estar

ligado ao efeito causado pela remoção de umidade das folhas. Braga, Cremasco e Valle (2005) relatam que, na secagem de algumas plantas aromáticas, o movimento de difusão da umidade na superfície das folhas pode carrear compostos do OE em direção ao exterior, podendo estar relacionado ao rendimento do extrativo. Além desse aspecto, fatores como estruturas secretoras e sua localização na planta podem influenciar na liberação do OE e de determinados compostos voláteis (SELLAMI et al., 2011).

Comparando-se o tempo necessário para a secagem do material vegetal pelos dois métodos modernos, que propiciaram rendimentos significativamente maiores que o obtido de folhas frescas, observou-se que a secagem através de micro-ondas apresenta mais uma vantagem. Enquanto a liofilização demorou cinco dias além do período de congelamento que precedeu a secagem propriamente dita, no caso da utilização das micro-ondas foram necessários apenas dois minutos. Portanto, o método que forneceu o maior rendimento em óleo essencial também foi o mais rápido.

A densidade dos OE não teve diferença estatística significativa entre todos os extrativos obtidos pela hidrodestilação das folhas após a secagem, sendo de 1,0738 para folhas frescas, 0,8755 para folhas secas ao ar, 0,9009 folhas secas por liofilização, 0,9559 para folhas secas em micro-ondas, 0,9209 folhas secas em estufa a 45 °C e 0,9571 folhas secas em estufa a 60 °C.

3.2 EFEITO DOS MÉTODOS DE SECAGEM NOS COMPONENTES DO ÓLEO ESSENCIAL

Através da análise da composição química dos compostos presentes nos OE, considerando aqueles com percentual maior que um em pelo menos um dos tratamentos, foi possível identificar 46 constituintes químicos distintos. Para o OE extraído de folhas frescas nove picos foram identificados, perfazendo 92,95% do total, para o OE de folhas secas ao ar foram observados e identificados 12 picos, representando 91,81%. No caso do OE de folhas secas por liofilização, 13 picos foram identificados, totalizando 97,79% da composição, enquanto para o OE de folhas secas em micro-ondas foi possível identificar 10 picos, correspondendo a um total de 87,93% da composição química. Já para o extrativo obtido após secagem

em estufa a 45 °C foram identificados 13 picos e 92,78% da composição, enquanto que para o OE obtido de folhas secas em estufa a 60 °C foram observados 10 picos, totalizando 93,29% da composição identificada (Tabela 1).

Para o OE de folhas frescas, a análise da composição indicou como compostos majoritários óxido de cariofileno (57,43%), elixeno (11,44%), cedraneno (5,34%) e nootkatona (4,72%). O extrativo de folhas secas ao ar teve como composição química majoritária óxido de cariofileno (37,41%), tiglato de geranila (16,27%), Z- α -trans-bergamotol (9,66%) e gimnomitrol (6,68%). No OE de folhas secas por liofilização foi identificada a presença dos compostos majoritários óxido de cariofileno (41,52%), longifolol (18,53%), 8-cedren-13-ol (8,98%) e γ -gurjuneno (7,14%). A composição do óleo de folhas secas por micro-ondas foi caracterizada pela presença do composto óxido de cariofileno, representando 43,81% do extrativo, seguido de 2Z,6E-farnesol, com 11,38%, γ -gurjuneno, com 8,74% e pelo 8-cedren-13-ol, com 7,59%. Na secagem em estufa à temperatura de 45 °C o extrativo teve como compostos majoritários óxido de cariofileno (31,87%), 8-cedren-13-ol (12,51%), 2Z,6E-farnesol (9,00%) e cedr-8(15)-en-10-ol (8,17%). Já em folhas submetidas à secagem a 60 °C, forneceram OE contendo óxido de cariofileno (47,31%), Z- α -trans-bergamotol (14,57%), acetato de E-nerolidila (11,48%) e β -costol (7,54%) (Tabela 1).

Tabela 1 – Composição química dos óleos essenciais obtidos de folhas de *Ocotea lancifolia*, frescas e secas por diferentes métodos de secagem

Pico	Constituinte	Classe	IK calc.	IK lit.	Porcentagem da composição					
					FF	AR	LL	MO	EST 45°C	EST 60°C
1	β -Ocimeno	HM	1040	1043 ⁿ	3,02	1,43	-	1,85	1,36	-
2	β -Z-Ocimeno	HM	1047	1047 ⁿ	-	-	1,76	-	-	-
3	Aromadendreno	HS	1425	1429 ⁿ	3,25	1,95	-	-	-	-
4	α -Guaieno	HS	1425	1424 ⁿ	-	-	3,40	3,88	5,13	-
5	γ -Gurjuneno	HS	1475	1475 ⁿ	-	-	7,14	8,74	-	2,34
6	γ -Elemeno	HS	1484	1482 ⁿ	-	4,61	-	-	-	-
7	Elixeno	HS	1485	1482 ⁿ	11,44	-	-	-	-	-
8	Z- α -Bisaboleno	HS	1485	1495 ⁿ	-	-	-	-	6,16	-
9	Óxido deCariofileno	SO	1534	1541 ⁿ	57,43	37,41	41,52	43,81	31,87	47,31
10	α -Selineno	SO	1536	1530 ⁿ	-	-	-	-	-	2,40
11	β -Nerolidol	SO	1565	1565 ⁿ	-	1,28	-	-	-	-
12	Espatuleno	SO	1565	1569 ⁿ	-	-	-	-	4,05	-
	6,8,8-Trimetil-triciclo- [5.2.2.0(1,6)]-undecan-3-ol, 2- metileno	SO	1600	1599 ⁿ	-	-	-	-	2,01	-
13	β -Atlantol	SO	1610	1608a	-	-	1,01	-	-	-
14	Z-Asarona	FP	1612	1617a	-	-	-	-	1,24	-
15	Cedraneno	SO	1613	1600 ⁿ	5,34	-	-	-	-	-
16	E-cadinol	SO	1627	1628 ⁿ	-	-	-	2,06	-	-
17	Eremoligenol	SO	1630	1630 ⁿ	-	1,46	-	-	-	-
18	τ -Cadinol	SO	1636	1636 ⁿ	-	-	1,75	-	-	-
19	8-Cedren-13-ol	SO	1644	1657 ⁿ	3,70	-	8,98	7,59	12,51	1,89
20	Z- α -trans-Bergamotol	SO	1644	1654 ⁿ	-	9,66	-	-	-	14,57
21	Alohimachalol	SO	1655	1662 ^a	-	-	-	5,26	-	-
22	Gimnomitrol	SO	1656	1660 ^a	-	6,68	-	-	-	-
23	E-Bisabol-11-ol	SO	1657	1667 ^a	2,58	-	5,42	-	-	-
24	Cedr-8(15)-en-10-ol	SO	1657	1652 ^a	-	-	-	-	8,17	-
25	E-10,11-Di-hidroatlantona	SO	1666	1669 ⁿ	-	5,29	-	-	-	-
26	Acetato de Z-nerolidila	SO	1677	1677 ⁿ	-	-	4,03	-	-	-
27	(2Z,6E)-Farnesol	SO	1702	1701a	-	-	-	11,38	9,00	-

Tabela 1 – Composição química dos óleos essenciais obtidos de folhas de *Ocotea lancifolia*, frescas e secas por diferentes métodos de secagem

(continuação)

29	Tiglato de geranila	SO	1703	1703 ⁿ	-	16,27	-	-	-	-	
30	Longifolol	SO	1714	1714 ^a	-	-	18,53	-	-	-	
31	Acetato de <i>E</i> -nerolidol	SO	1719	1717 ^a	-	-	-	-	-	11,48	
32	Criptomeriona	SO	1729	1724 ^a	-	-	-	-	-	3,13	
33	β -Costol	SO	1767	1767 ^a	-	-	-	-	-	7,54	
34	Nootkatona	SO	1771	1775 ⁿ	4,72	-	-	-	-	-	
35	α -Costol	SO	1772	1774 ^a	-	3,71	-	-	1,56	-	
36	14-Hidroxi- δ -cadineno	SO	1772	1780 ^a	-	-	-	1,49	-	-	
37	Acetato de γ -eudesmol	SO	1784	1784 ^a	-	-	1,36	-	-	-	
38	α -Muuroleno-14-ol	SO	1788	1780 ^a	-	-	-	1,87	-	-	
	2-(4a,8-Dimetil-6-oxo-1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahidro-naftalen-2-il)-propionaldeído	SO	1799	1803 ⁿ	-	-	-	-	6,50	-	
39											
40	β -bisabolenol	SO	1800	1790 ^a	1,48	-	-	-	-	-	
41	<i>E</i> -Isovalencenol	SO	1800	1793 ⁿ	-	2,08	-	-	-	-	
42	Ácido vativênico	SO	1812	1811 ^a	-	-	1,50	-	-	-	
43	α -Vetivona	SO	1839	1843 ^a	-	-	-	-	-	1,03	
44	Cubiteno	HD	1871	1878 ^a	-	-	-	-	-	1,60	
45	Kaur-16-eno	HD	2029	2032 ⁿ	-	-	-	-	3,22	-	
46	Kaureno	HD	2042	2043 ^a	-	-	1,40	-	-	-	
TOTAL IDENTIFICADO						92,95	91,81	97,79	87,93	92,78	93,29

IK cal.: Índice de kovats calculado; IK lit.: Índice de kovats encontrado na literatura. ⁿ NIST, 2009. ^aAdans,2009.

Onde: FF:folhas frescas; AR: folhas secas ao ar; LL: folhas secas por liofilização; MO: folhas secas em micro-ondas; EST 45: folhas secas em estufa a 45°C; EST 60: folhas secas em estufa a 60°C; HM= Hidrocarbonetos Monoterpênicos; MO= Monoterpenoides oxigenados; HS= Hidrocarbonetos Sesquiterpênicos; SO= Sesquiterpenoides oxigenados. FP= Fenilpropanoides;HD: Hidrocarbonetos diterpênicos.

Fonte: Autor (2019).

Em estudo realizado em OE de folhas frescas da mesma espécie, coletadas no mesmo local e na mesma época do ano, da mesma população, foram identificadas 26 substâncias, onde o composto óxido de cariofileno também foi o majoritário, seguido de biciclogermacreno, bulnesol, epóxido de calareno e acetato de *E-nerolidila*. O estudo também revelou diferenças nos teores e composição química de OE de folhas, frutos e inflorescências (SILVA et al., 2018). A comparação da composição do OE de folhas frescas deste estudo, coletado em 2018, com o analisado por Silva et al. (2018) e coletado em 2013, evidenciou a presença do mesmo composto majoritário. No entanto, os demais componentes, foram pouco semelhantes, assim como as concentrações dos compostos reportados quando em comparação aos identificados no presente estudo.

Entre as análises das composições dos OEs extraídos de folhas frescas e de folhas secas, submetidas aos diferentes métodos de secagem, o único constituinte que foi comum a todos os OE extraídos foi o óxido de cariofileno, o qual foi também o constituinte majoritário em todos os extrativos analisados, independente do tratamento. Além deste, o composto 8-cedren-13-ol foi identificado em cinco dos seis OEs analisados, não estando presente apenas no extrativo obtido de folhas secas ao ar. Esta ausência pode estar ligada ao fato do período de secagem ao ar ser mais longo que os demais, aliado a características voláteis do composto, uma vez que após 14 dias de secagem pode ocorrer a perda de alguns compostos os quais por ter afinidade com a umidade das folhas acabam por ser carregados ao longo do processo de secagem (ASEKUN; GRIERSON; AFOLAYAN; 2007; CHUA et al., 2019; SELLAMI et al., 2011).

Análises por GC-MS de OE de 10 espécies de *Ocotea*, coletadas em maio na Costa Rica, tido como o período de chuvas, sendo *O. floribunda*, *O. holdridgeana*, *O. meziana*, *O. sinuata*, *O. tonduzii*, *O. valeriana*, *O. veraguensis*, *O. whitei*, e outras duas descritas como “novas espécies”, identificaram ao todo 91 compostos diferentes, destes apenas nove foram comuns às 10 espécies. Estes resultados demonstram o amplo espectro de substâncias presentes em espécies do gênero *Ocotea* e a singularidade de cada OE, quanto aos compostos químicos presentes no extrativo de cada espécie (TAKAKU; HABER; SETZER, 2007).

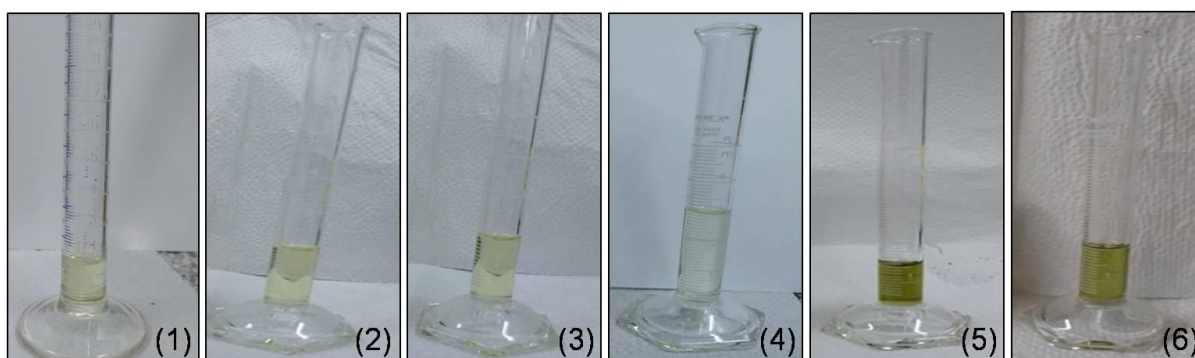
Em estudo sobre a influência dos métodos de secagem no teor e composição química do OE de *Chamaemelum nobile*, conhecida popularmente como camomila, amplamente utilizada como planta medicinal, os métodos de secagem afetaram não

apenas o número de compostos químicos presentes nos extrativos, mas também refletiram significativamente na proporção dos compostos (OMIDBAIGI; SEFIDKON; KAZEMI, 2004). No presente estudo, ao verificar a somatória percentual dos compostos diferentes identificados em cada tratamento de secagem, em relação à composição do extrativo de folhas frescas, para secagem por micro-ondas 34,68% da composição total foi diferente da composição da amostra de OE de folhas frescas, na secagem por liofilização foi de 41,88%, a secagem em estufa à temperatura de 60 °C, a composição diferiu em 44,09%, seguido de estufa a 45 °C, com 47,04% de diferentes compostos identificados e secagem ao ar com 51,03% da composição total distinta.

O processo de secagem pode gerar o aparecimento de alguns compostos que não estiveram presentes no extrativo de material vegetal fresco, por exemplo. A ocorrência de diferentes substâncias químicas nos OE pode estar correlacionada a fatores como o tempo e as temperaturas de secagem, podendo causar processos de oxidação das substâncias assim como rearranjos químicos, ocasionando as diferenças nas composições químicas pelo aparecimento e desaparecimento de compostos do extrativo de uma mesma espécie e órgão vegetal (SELLAMI et al., 2011; CHUA et al., 2019).

Os OEs obtidos por hidrodestilação de folhas de espécies de *Ocotea* são geralmente transparentes claros a amarelados (TAKAKU; HABER; SETZER, 2007). No presente estudo foi observada mudança drástica de cor dos óleos essenciais obtidos após os processos de secagem em estufa a 45 °C e a 65 °C, sendo que o extrativo submetido à temperatura de 45 °C foi o que apresentou a maior intensificação de coloração, verde escuro, em tom mais fechado em comparação àquele obtido de folhas secas à 60 °C. Os OEs extraídos após os demais métodos de secagem e o obtido de folhas frescas tiveram aspecto levemente amarelado, sendo desta forma não observada mudança nas características visuais dos mesmos (Figura 2).

Figura 2 – Imagens com a coloração dos óleos essenciais de folhas de *Ocotea lancifolia*, obtidos após diferentes processos pós-colheita



Onde: (1): folhas frescas; (2): folhas secas ao ar; (3): folhas secas por liofilização; (4): folhas secas em micro-ondas; (5): folhas secas em estufa a 45 °C; (6): folhas secas em estufa a 60°C.

Fonte: Autor (2019).

A cor de produtos pós-colheita e processamento é uma importante característica organoléptica, que está diretamente ligada à aceitação no mercado de produtos de origem natural. Este tipo de mudança geralmente é atribuído a possível degradação de compostos pela imposição de tratamentos térmicos utilizando calor. Estudos anteriores considerando diferentes métodos de secagem também observaram mudanças sensoriais nos extrativos vegetais obtidos de material vegetal submetido à secagem em estufa sob influência do calor a temperaturas na faixa de 50 °C até 80 °C (RAHIMMALEK; GOLI, 2013; WEEMAES et al., 1999).

Outro aspecto que pode ser considerado neste tipo de alteração é a composição química. Ao observar os compostos presentes apenas na composição das amostras de OE que apresentaram mudanças na coloração, foram encontrados na composição do OE obtido após a secagem em estufa a 45 °C, *Z*- α -Bisaboleno (6,16%), Epatulenol (4,05%), 6,8,8-Trimetil-triciclo-[5.2.2.0(1,6)]-undecan-3-ol, 2-metileno (2,01%), *Z*-Asarona (1,24%), Cedr-8(15)-en-10-ol (8,17%), 2-(4a,8-Dimetil-6-oxo-1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahidro-naftalen-2-il)-propionaldeído (6,50%) e Kaur-16-eno (3,22%). Já na composição do OE obtido após a secagem em estufa a 60°C, foram detectados α -Selineno (4,05%), Acetato de *E*-nerolidol (11,48%), Criptomeronina (3,13%), β -Costol (7,54%), α -Vetivona (1,03%) e Cubiteno (1,60%).

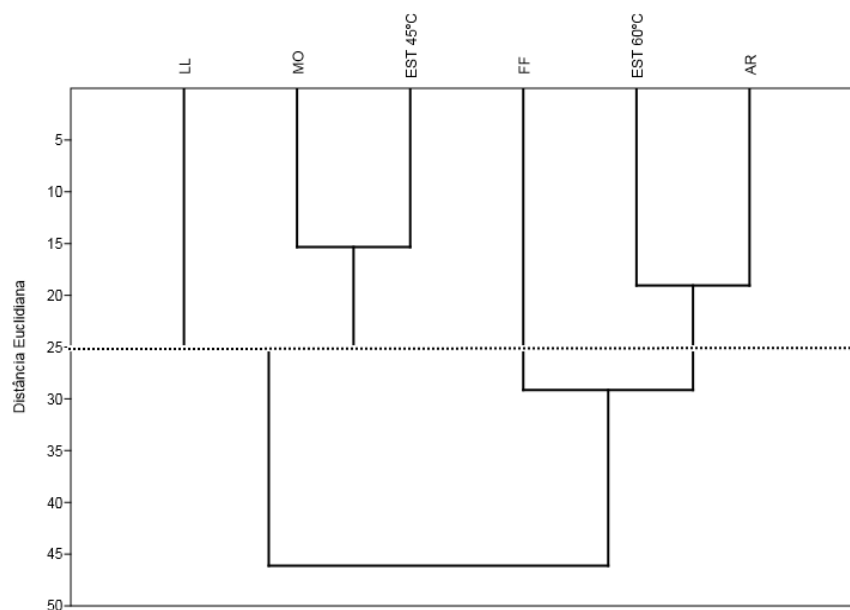
A presença exclusiva de certos compostos pode estar ligada a diferenciação de cor do extrativo, uma vez que podem ser fruto da degradação dos demais compostos. Geralmente as relações e avaliações de estabilidade são realizadas considerando principalmente os compostos diferentes e com maior percentual

(GUIMARÃES et al., 2008). No entanto no presente estudo, dos compostos presentes exclusivamente na composição das amostras de OE secas em estufa a 45 °C e a 60 °C, aos quais pode ser atribuída a variação da coloração, nenhum foi comum às duas composições, impossibilitando a atribuição da mudança de cor observada nas duas amostras a um único composto, mas sugerindo a possível degradação do conjunto de substâncias.

A presença de alguns compostos nos extrativos pode estar relacionada às suas bioatividades, desta forma a secagem pode influir também na adição de compostos com importância nos seus posteriores usos, o que pode acarretar em atividades biológicas desejáveis ou indesejadas, de acordo com a finalidade de utilização (CHUA et al., 2019). O composto Z-Asarona, presente na composição do OE obtido após a secagem em estufa a 45 °C, já foi identificado em outras espécies de Lauraceae com atividades biológicas como inseticida, porém este composto também já foi relacionado à ação carcinogênica, demonstrando que a presença ou o surgimento deste, no caso do presente estudo, não é desejável em extrativos para fins de utilização, pois sua presença confere toxicidade ao OE (ROMOFF et al., 2010; PRINSLOO; NOGEMANE; STREET, 2018). Portanto, esse método de secagem não pode ser recomendado para folhas de *O. lancifolia*.

Para relacionar as composições químicas dos OE e os métodos de secagem empregados, foram realizadas Análises de Agrupamento Hierárquico AAH e Análise de Componentes Principais ACP. A aplicação da AAH resultou em dois grandes grupos distintos (Figura 3), que após o corte (linha tracejada) na distância euclidiana de 25 unidades, deram origem a quatro grupos, havendo a clara separação das amostras de folhas frescas (FF) e secas por liofilização (LL), os quais tiveram poucos compostos semelhantes nas análises da composição. No grupo formado pelo OE obtido de folhas submetidas à secagem em micro-ondas (MO) e o secagem em estufa a 45 °C (EST 45 °C) os compostos presentes nas duas composições e que provavelmente estão envolvidos neste agrupamento são o óxido de cariofileno (valor médio 37,84%), 2Z,6E-farnesol (valor médio 10,19%), 8-cedren-13-ol (valor médio 10,05%), α -guaieno (valor médio 4,51%) e β -ocimeno (valor médio 1,60%). Já o agrupamento formado por secagem em estufa a 60 °C (EST 60 °C) e secagem ao ar (AR) pode estar relacionado à presença dos compostos óxido de cariofileno (valor médio 42,36%) e Z- α -trans-bergamotol (valor médio 12,12%).

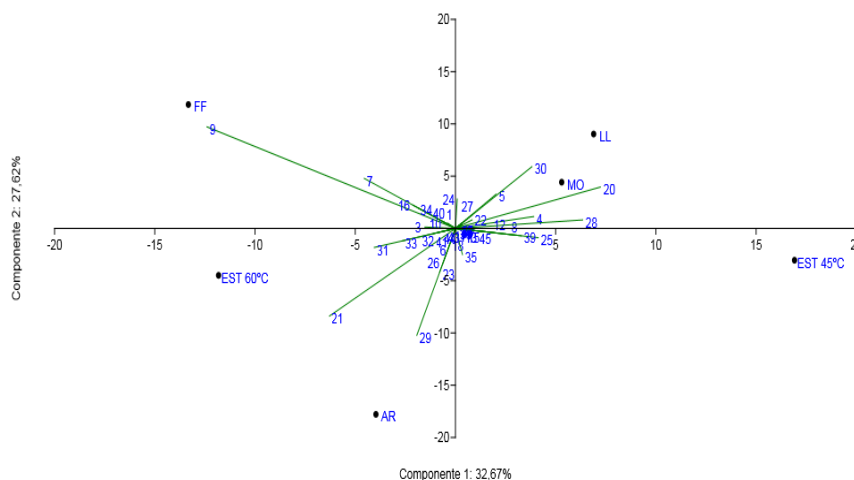
Figura 3 – Análises de Agrupamento Hierárquico pelo método de Ward da composição química dos óleos essenciais de folhas de *Ocotea lancifolia* submetidas a diferentes métodos de secagem



Onde: FF:folhas frescas; AR: folhas secas ao ar; LL: folhas secas por liofilização; MO: folhas secas em micro-ondas; EST 45: folhas secas em estufa a 45°C; EST 60: folhas secas em estufa a 60°C.
Fonte: Autor (2019).

A análise por ACP demonstrou que os dois primeiros componentes representaram cerca de 60% da variância total, CP1 32,67% e CP2 27,62%, na qual os compostos mais envolvidos foram os constituintes correspondentes aos números 20 e 9, 8-cedren-13-ol e óxido de cariofileno, respectivamente (Figura 4). É possível observar que os compostos 20 e 28 localizam-se entre os tratamentos MO e EST 45 °C, correspondendo às substâncias 8-cedren-13-ol e 2Z,6E-farnesol comuns às duas composições, e ainda à proximidade do composto 21 aos métodos agrupados EST 60 °C e AR, correspondente ao Z- α -trans-bergamotol. Portanto, a ACP confirmou os achados do AAH e demonstrou que as composições de óleo essencial foram principalmente influenciadas pela presença de certos compostos químicos, os quais foram determinantes para a separação dos OE de *O. lancifolia* nos diferentes grupos.

Figura 4 – Gráfico de dispersão dos Componentes Principais considerando os componentes majoritários dos óleos essenciais de *Ocotea lancifolia* e sua correlação dos diferentes tratamentos



Onde: Os números referentes aos compostos estão relacionados na tabela 1, sendo destacados: 9 = Óxido de cariofileno, 20 = 8-Cedren-13-ol, 21 = Z- α -trans-Bergamotol e 28 = 2Z,6E-Farnesol. FF:folhas frescas; AR: folhas secas ao ar; LL: folhas secas por liofilização; MO: folhas secas em micro-ondas; EST 45: folhas secas em estufa a 45 °C; EST 60: folhas secas em estufa a 60 °C. Fonte: Autor (2019).

4 CONCLUSÃO

O estudo demonstrou que na seleção do método de secagem de folhas de *O. lancifolia*, quanto a rendimento e composição química, é necessário observar uma série de critérios como tempo de secagem, temperatura, estabilidade das substâncias químicas e características organolépticas do extrativo. Os métodos de secagem por micro-ondas e liofilização se destacaram pelo maior rendimento e também devido ao tempo reduzido de secagem. Os métodos de secagem não afetaram o composto majoritário óxido de cariofileno, presente nos OEs da espécie *O. lancifolia*. O tempo e a temperatura de secagem provavelmente estão ligados às modificações e processos de possível degradação de um conjunto de substâncias químicas presentes no extrativo, resultando em mudanças na cor e na composição do OE. No entanto, estudos adicionais são necessários para observar as implicações destas modificações nas atividades biológicas atribuídas aos OEs obtidos de folhas após a secagem.

REFEÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

AMARAL, L. d. P. et al. *Seasonal* influence on the essential oil production of *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 58, p. 12-21, 2015.

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

ASEKUN, O. T.; GRIERSON, D. S.; AFOLAYAN, A.J. Effects of drying methods on the quality and quantity of the essential oil of *Mentha longifolia* L. subsp. *Capensis*. **Food Chemistry**, n. 101, p. 995-998, 2007.

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

BRAGA, N. P.; CREMASCO, M. A.; VALLE, R. C. C. R. The effects of fixed-bed drying on the yield and composition of essential oil from long pepper (*Piper hispidinervium* C. DC) leaves. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 22, p. 257-262, 2005.

CAMARGO, M. J. **Estudo químico de plantas do cerrado: *Ocotea lancifolia* (Schott) MEZ- Lauraceae**. 2011. 203f. Tese (Doutorado em Química)–Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 2011.

CHUA, L. Y. W. et al. Influence of Drying Methods on the Antibacterial, Antioxidant and Essential Oil Volatile Composition of Herbs: a Review. **Food and Bioprocess Technology**, 2019.

CORRÊA, R. M. et al. Rendimento de óleo essencial e caracterização organoléptica de folhas de assa-peixe submetidas a diferentes métodos de secagem. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 2, p. 339-344, 2004.

DÍAZ-MAROTO, M. C. et al. Influence of Drying on the Flavor Quality of Spearmint (*Mentha spicata* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 1265-1269, 2003.

FERREIRA, A. G.; AQUILA, M. E. A. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, p.175-204, 2000.

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

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

- GONELI, A. L. D. et al. Modelagem matemática e difusividade efetiva de folhas de aroeira durante a secagem. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 44, n. 1, p. 56-64, 2014.
- GUIMARÃES, L. G. de L. et al. Influência da luz e da temperatura sobre a oxidação do óleo essencial de campim-limão (*Cymbopogon citratus* (D.C.) STAPF). **Química Nova**, v. 31, n. 6, p.1476-1480, 2008.
- 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.
- LI, H. et al. Fundamentals and applications of microwave heating to chemicals separation processes. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 114, 2019.
- MARQUES, C. A. Importância Econômica da Família Lauraceae Lindl. **Floresta e Ambiente**, v.8, p.195-206, 2001.
- MORAIS, L. A. S. Óleos essenciais no controle fitossanitário. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. (Eds.). **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna, SP, Brasil, 2009. Cap. 9, p. 139-152.
- NIST. **NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library & Search Program**. Hoboken: John Wiley & Sons, 2009.
- OMIDBAIGI, R.; SEFIDKON, F.; KAZEMI, F. Influence of drying methods on the essential oil content and composition of Roman chamomile. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 19, p. 196-198, 2004.
- PRINSLOO, G.; NOGEMANE, N.; STREET, R. The use of plants containing genotoxic carcinogens as foods and medicine. **Food and Chemical Toxicology**, v. 116, p. 27-39, 2018.
- QUINET, A. et al. *Lauraceae. Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2015. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB8466>>. Acesso em: 10 out. 2018.
- RAHIMMALEK, M.; GOLI, S. A. H. Evaluation of six drying treatments with respect to essential oil yield, composition and color characteristics of *Thymys daenensis* subsp. *daenensis*. Celak leaves. **Industrial Crops and Products**, v. 42, p. 613-619, 2013.
- ROMOFF, P. et al. Chemical composition of volatile oils from leaves of nectandra megapotamica spreng. (lauraceae). **Química Nova**, v.33, n.5, p. 1119-1121, 2010.
- ROUTRAY, W.; ORSAT, V.; GARIEPY, Y. Effect of Different Drying Methods on the Microwave Extraction of Phenolic Components and Antioxidant Activity of Highbush Blueberry Leaves. **Drying Technology**, p.1-17, 2014.
- SALLEH, W. M. N. H. W.; AHMAD, F. Phytochemistry and Biological Activities of the Genus *Ocotea* (Lauraceae): A Review on Recent Research Results (2000-2016), **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 7, n.5, p. 204-218, 2017.

SELLAMI, I. H. et al. Qualitative and quantitative changes in the essential oil of *Laurus nobilis* L. leaves as affected by different drying methods. **Food Chemistry**, v. 126, p. 691-697, 2011.

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. et al. Physicochemical characterization of leaf extracts from *Ocotea lancifolia* and its effect against wood-rot fungi, **International biodeterioration & biodegradation**, v. 117, p. 158-170, 2017.

SILVA, D. T. et al. Microbiological damage influences the content, chemical composition and the antifungal activity of essential oils in a wild-growing population of *Ocotea lancifolia* (Schott) Mez. **Journal of essential oil research**, 2018.

SILVA, L. L. et al. Anesthetic activity of brazilian native plants in silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Neotropical Ichthyology**, v. 11, n. 2, p. 442-451, 2013.

TAIZ, L. et al. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, p. 888, 2017.

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

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

VITTI, A. M. S.; BRITO, J. O. Óleo essencial de eucalipto. **Documentos Florestais**, n. 17, 2003.

WEEMAES, C. A. et al. Kinetics of Chlorophyll Degradation and Color Loss in Heated Broccoli Juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 6, p. 2404-2409, 1999.

4 DISCUSSÃO

A família Lauraceae destaca-se pela ampla utilização, refletida em sua importância econômica. As espécies desta família são utilizadas na culinária, fornecimento de madeiras para uso em construção civil e marcenaria, usos medicinais e cosméticos. Os diferentes usos e as características das espécies do gênero *Ocotea* atribuem destaque a este, assim como o interesse por serem promissoras espécies de estudo (MARQUES, 2001; CAMARGO, 2011; GONÇALVES et al., 2018). A composição química dos OEs de espécies do gênero *Ocotea* é principalmente formada por compostos das classes dos monoterpenoides, sesquiterpenoides e fenilpropanoides, sendo que a predominância de uma classe ou outra é determinada geneticamente (FIGUEIREDO et al., 2008). Desta forma, a composição dos OEs encontrada para *O. lancifolia* está de acordo com informações da literatura. As análises da composição dos OEs descritas nos artigos 1 e 2, os quais utilizaram OEs de diferentes épocas de coleta porém de uma mesma população, detectaram a classe dos sesquiterpenoides oxigenados como predominante nos OEs de folhas de *O. lancifolia* com de cerca de 90% da composição química total.

No artigo 1 os compostos majoritários identificados foram óxido de cariofileno (41,46 %), γ -curcumen-15-al (17,05%), Z- α -trans-bergamotol (7,52%), acetato de *E*-Nerolidila (6,33%) e criptomeriona (3,68%). Já no artigo 2, o composto óxido de cariofileno também foi o constituinte majoritário em todos os OEs analisados após os tratamentos de secagem. A composição química de um determinado óleo essencial influencia diretamente suas atividades biológicas, a exemplo da atividade antifúngica. Segundo Saad, Muller e Lobstein (2013), a atividade fungistática é determinada pelos grupos funcionais presentes nos componentes dos óleos essenciais. Moléculas oxigenadas, a exemplo do constituinte majoritário do OE de folhas de *O. lancifolia* óxido de cariofileno, tem ação antifúngica maior do que hidrocarbonetos (SAAD; MULLER; LOBSTEIN, 2013).

Em estudo realizado por Silva et al. (2018) foi detectada atividade antifúngica dos OEs extraídos de frutos, inflorescências e folhas de *O. lancifolia* frente ao fungo *Fusarium moniliforme*, tido como patógeno de difícil controle relacionado principalmente a podridão de sementes, onde os OEs das diferentes partes da planta, na concentração de 1,0 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, considerada uma concentração baixa,

inibiram o crescimento do fungo. Este interessante resultado, obtido por outro membro do mesmo grupo de pesquisa, estimulou o interesse em maiores investigações sobre as bioatividades dos OEs da espécie. Desta forma, no artigo 1 foi observado que o *pool* de OEs de folhas de *O. lancifolia* inibiu o crescimento das espécies de fungos de podridão da madeira, *G. applanatum* e *L. lepideus* na concentração de $1,5 \mu\text{L.mL}^{-1}$. A diferença refletida nos resultados para o mesmo OE, com maior suscetibilidade de *L. lepideus*, demonstra a influência da espécies fúngica perante a bioatividade.

A atividade antifúngica através dos OEs pode se estabelecer de diferentes formas, atuando como agente fungistático, interrompendo o crescimento do fungo enquanto este está em contato com as substâncias bioativas, ou fungicida, na qual ocorre a morte do fungo determinada pelo não crescimento do mesmo em meio livre de óleo, após a exposição às substâncias do OE. Além de serem influenciadas pela composição do extrativo, estas atividades também são relacionadas às concentrações do extrativo testadas (DAMASCENO et al., 2019). No presente estudo a atividade fungicida foi observada na concentração de $5,0 \mu\text{L.mL}^{-1}$ para a espécie *L. lepideus*, enquanto que a mesma não foi verificada para a espécie *G. applanatum*, demonstrando que as respostas fungicida ou fungistática, também são dependentes da espécie fúngica, mesmo que na mesma concentração e mesmo extrativo testado. Desta forma, os resultados do artigo 1 corroboram a ideia de que a inibição do crescimento fúngico ou o efeito fungicida é dependente das espécies de micro-organismos, da composição química e concentração do OE utilizado.

Ao considerar o amplo número de extrativos e substâncias presentes na composição química dos OEs potencialmente envolvidas no estabelecimento das atividades antifúngicas, o estudo de possíveis mecanismos de ação destes é cada vez mais investigado, a fim de elucidar como se dá esta relação. Os OEs geralmente interagem com as estruturas lipídicas das células fúngicas, causando modificações na parede celular dos patógenos, desta forma atingindo os processos fundamentais para a sobrevivência celular do fungo, através do aumento da permeabilidade da membrana citoplasmática. O ergosterol é tido como um dos principais componentes lipídicos da membrana fúngica, este possui como função manter a integridade das células fúngicas, sendo encontrado quase que exclusivamente em fungos. Ainda, este esterol está ligado à permeabilidade e fluidez das atividades enzimáticas da parede celular, de tal forma a influir diretamente no crescimento fúngico, devido a

estas características é tido como indicador da biomassa fúngica (NIEMENMAA; GALKIN; HATAKKA, 2008; TIAN et al., 2012; VALETTE et al., 2017; DAMASCENO et al., 2019).

No presente estudo para o teste de verificação das alterações do teor de ergosterol na membrana plasmática dos fungos *G. applanatum* e *L. lepideus*, foi utilizado o OE na concentração de $1,0 \mu\text{L.mL}^{-1}$, a qual não provocou diferenças significativas na massa úmida do micélio fúngico para as espécies utilizadas. Porém a presença do extrativo gerou uma tendência a redução do conteúdo de ergosterol, demonstrando a potencial ação do OE através deste mecanismo, desta forma seria indicado realizar os testes com uma concentração um pouco maior, a fim de verificar possíveis diferenças significativas. Por exemplo, as espécies fúngicas poderiam ser cultivadas em presença da concentração de $1,5 \mu\text{L.mL}^{-1}$, na qual houve certo crescimento porém este foi significativamente afetado, o que poderia detectar modificações decorrentes no teor do ergosterol, devido ao crescimento influenciado pela presença do OE. No entanto, como existem diferentes compostos presentes nos óleos essenciais, os mecanismos de ação que explicam suas bioatividades também são diversos. De acordo com Kalemba e Kunicka (2003), a interferência dos OEs com a parede celular fúngica e/ou a membrana citoplasmática resulta em extravasamento do citoplasma e sua coagulação. Sinais visíveis de ação do óleo contra fungos podem ser observados como, por exemplo, suas alterações morfológicas, tanto sob o microscópio quanto as características do micélio. Por outro lado, os OEs também podem inibir a síntese de DNA, RNA, proteínas e polissacarídeos nas células fúngicas, bem como inibir a respiração (KALEMBA; KUNICKA, 2003; KUMAR; KUDACHIKAR, 2017).

A madeira é amplamente utilizada nos mais diversos âmbitos da sociedade, tanto no meio urbano quanto no meio rural, assim como em ambientes fechados e em ambientes suscetíveis às intempéries do tempo. Desta forma, a busca por sua resistência é constante, e dentre os maiores causadores de danos às suas estruturas, estão os fungos e as térmitas (PAES et al., 2007). A utilização de produtos de origem botânica como preservantes da madeira apresenta algumas barreiras como dificuldades na padronização e normatização dos extratos, quantificação de ingredientes ativos e a aprovação governamental, que exige avaliações detalhadas dos produtos (ISMAN; MACHIAL, 2006). Porém, tendo em vista os benefícios como baixa toxidez residual ao ambiente, por serem produzidos

por organismos vivos e de constantes variações entre as associações biológicas que fazem, os pesticidas botânicos demonstram ser promissores como alternativa aos produtos sintéticos de uso convencional (MORAIS, 2009). Considerando estes fatores, o uso integrado de OEs e antifúngicos comerciais poderia ser uma alternativa interessante.

Estudos sobre a combinação de OEs e fungicidas comerciais já foram realizados com o uso de espécies de *Nectandra*. Esta combinação pode gerar um efeito sinérgico e/ou aditivo quanto aos mecanismos de controle de fungos pelos dois agentes. Danielli et al. (2017) ao testar o efeito da combinação dos OEs de *N. lanceolata* e *N. megapotamica* com fungicida comercial frente a fungos dermatófitos, detectou ação aditiva dos extrativos, a qual foi relacionada à redução da concentração efetiva do agente antifúngico comercial, reduzindo assim o efeito da toxicidade geralmente causada por este. Da mesma forma foi observado efeito sinérgico dos OEs e dos antifúngicos, o qual foi determinado através do mecanismo de ação destes, onde a inibição do crescimento fúngico dos dois agentes teve efeito no bloqueio da biossíntese do ergosterol.

Para a obtenção de extrativos vegetais é de suma importância observações quanto ao processamento das plantas, o qual muitas vezes é influenciado por inúmeras características que podem ser determinantes para a estabilidade química de seus compostos, assim para o rendimento dos mesmos. Considerada um método clássico de conservação, a secagem é utilizada há séculos na preservação de alimentos, aumentando o tempo de conservação, diminuindo o volume para transporte e espaço de armazenamento, por ser um processo de remoção da umidade através das trocas de calor e massa (SELLAMI et al., 2011; EL-SEBAILI; SHALABY, 2012). Entre as principais finalidades dos processos de secagem estão reduzir os níveis de umidade do material vegetal a fim de inibir o crescimento microbiano e minimizar as alterações bioquímicas. Ainda, após estes processos, busca-se preservar as características organolépticas do material vegetal, principalmente cor e aroma, os quais são tidos como os principais atributos de qualidade e preferência relacionados ao consumo, seja dos materiais vegetais, seja dos subprodutos gerados a partir destes (ORPHANIDES; GOULAS; GEKAS, 2015).

Sabe-se que além da melhoria em inúmeras características, o processo de secagem pode da mesma forma, resultar em alterações indesejáveis tanto na aparência, textura, cor, aroma, valor nutricional, no caso de ervas condimentares, e

propriedades medicinais, e até na redução de suas bioatividades (ORPHANIDES; GOULAS; GEKAS, 2015). Portanto a escolha do método de secagem a ser utilizado no processamento de plantas aromáticas, deve ser criteriosa e levar em conta estas possíveis modificações e ainda a finalidade de uso do material vegetal, para as características específicas da espécie vegetal alvo. A escolha do método de secagem é especialmente importante no caso de plantas que contêm OEs, uma vez que seus componentes são voláteis e vários deles são instáveis a temperaturas elevadas. Um dos fatores relevantes a serem considerados no momento de decidir o método de secagem para materiais vegetais ricos em OEs é a localização das estruturas de secreção e estocagem desses extrativos. Uma vez que espécies de Lauraceae apresentam os idioblastos no interior das folhas, perdas devido à volatilização são menos frequentes do que no caso de espécies com estruturas de estocagem na superfície, a exemplo de plantas classificadas nas famílias Lamiaceae e Asteraceae (SILVA et al., 2015).

No artigo 2, gerado pela presente dissertação, foram observados os rendimentos dos OEs após as folhas serem submetidas aos métodos de secagem ao ar, por liofilização, micro-ondas, em estufa a 45 °C e a 60 °C. Através deste estudo, os processos de secagem por micro-ondas e liofilização, considerados inovadores na secagem de materiais vegetais ricos em extrativos, propiciaram os maiores rendimentos para os OEs extraídos de folhas por hidrodestilação. Estudos sobre a secagem de folhas por métodos, semelhantes aos utilizados no presente estudo, com outra espécie de Lauraceae, foi observado um aumento significativo do rendimento do extrativo após a secagem ao ar (SELLAMI et al., 2011). Desta forma este trabalho demonstra que o efeito de um método de secagem específico na conservação ou degradação dos compostos voláteis não pode ser prevista ou generalizada, sendo dependente da espécie e até dentro de grupos de mesma espécie (DÍAZ-MARATO et al., 2003; SILVA et al., 2018).

Os processos que fazem uso da secagem de plantas aromáticas por micro-ondas, pelo fato de ser uma tecnologia relativamente nova, têm sido mais amplamente estudados nas últimas décadas. Neste tipo de processamento, a secagem se dá através da irradiação pelas micro-ondas, que aquecem a água presente no material. O processo leva a uma distribuição de energia mais homogênea, o que acelera o rompimento das paredes celulares e, em consequência, a secagem, gerando uma pressão interna que mantém a abertura

dos poros, propiciando um movimento de vapor e água para a superfície. Este mecanismo de secagem de rápida evaporação da água dos tecidos da planta aumenta o rendimento do OE, reduz drasticamente o tempo de secagem e gera menor consumo de energia (CHANDRASEKARAN; RAMANATHAN; BASAK, 2013; ORPHANIDES; GOULAS; GEKAS, 2015).

Na secagem por liofilização ocorre o congelamento da água livre no material vegetal a qual é removida por sublimação, processo pelo qual é evitada a maioria dos processos de deterioração e reações microbiológicas, atribuindo a este processo a alta eficiência de extração, e as características mantidas, que estão mais próximas da aparência característica da planta fresca, como retenção da estrutura, forma primária e contração mínima, redução do volume e estabilidade da cor. Porém para este processo são tidas como desvantagens o alto consumo de energia e o alto investimento no equipamento utilizado (DÌAZ-MAROTO et al., 2003; SELLAMI et al., 2011; ORPHANIDES; GOULAS; GEKAS, 2015).

Em relação às características organolépticas as quais são relacionadas a qualidade destes produtos, foi observado que a imposição da secagem em forno de circulação forçada de ar nas temperaturas de 45 °C e 60 °C gerou drástica mudança de cor do extrativo, tornando-o verde escuro. Estas drásticas mudanças de cor possivelmente são geradas devido às temperaturas de secagem, aliadas ao longo tempo secagem (WEEMAES et al., 1999; RAHIMMALEK; GOLLI, 2013). Estas modificações de cor não eram esperadas, pois os relatos de alterações de cor descritos na literatura geralmente são observados em temperaturas mais elevadas, por exemplo, aos 70 °C, na qual já pôde ser observada a degradação da clorofila nas células foliares de tomilho, gerando alterações de cor (RAIMMALEK; GOLLI, 2013).

Os teores e as composições químicas dos óleos essenciais de plantas aromáticas estão diretamente relacionados aos métodos de secagem a que são submetidos, mudanças como aumento, diminuição ou formação de novos compostos químicos (SELLAMI et al., 2011; CHUA et al., 2019). Ao analisarmos a composição química do OE de folhas de *O. lancifolia*, submetidas aos métodos de secagem, observamos o composto óxido de cariofileno como majoritário para todos os OEs analisados e o restante da composição química com ampla diferença nos compostos.

A utilização de técnicas de secagem levou a algumas mudanças, como as observadas no rendimento e composições químicas dos OEs de folhas de *O. lancifolia* bem como nas características de cor. No entanto, essas mudanças ainda podem ocasionar alteração nas atividades bioativas dos compostos presentes no extrativo. Portanto, torna-se importante a avaliação de suas atividades, como antioxidante, antibacteriana e antifúngica após a realização destes processos de secagem, para possibilitar além da observação do teor, composição química e cor, que a melhor técnica de secagem seja identificada, para alcançar também a otimização de seu conteúdo bioativo (CHUA et al., 2019).

5 CONCLUSÃO

- O óleo essencial de folhas de *Ocotea lancifolia* foi composto majoritariamente por sesquiterpenoides;
- O uso do OE de folhas de *O. lancifolia* na concentração de $1,5 \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ inibiu o crescimento dos fungos podridão-branca *Ganoderma applanatum*, e podridão-parda *Lentinus lepideus*;
- O OE de *O. lancifolia* na maior concentração testada teve ação fungicida para o fungo de podridão-parda (*Lentinus lepideus*);
- Houve uma tendência à redução do teor de ergosterol no micélio, relacionada à atividade antifúngica do óleo essencial de *O. lancifolia*;
- Os métodos de secagem influenciam o rendimento e composição química do OE, através do tempo de secagem e temperatura, levando à degradação de substâncias químicas e mudanças nas características organolépticas do extrativo;
- Os métodos de secagem por micro-ondas e liofilização propiciaram o maior rendimento em tempo reduzido de secagem;
- Os seis métodos de secagem não afetaram a densidade dos OEs da espécie *O. lancifolia*;
- Os métodos de secagem não afetaram o composto majoritário óxido de cariofileno, porém alguns dos demais compostos foram diferentes dos anteriormente reportados para os OEs da espécie *O. lancifolia*.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy. **Illinois**: Allured Publishing Corporation, 2009. 804 p.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopéia Brasileira**. 5. ed. Brasília: ANVISA, 2010.
- BALLABENI, V. et al. Antiplatelet and antithrombotic activities of essential oil from wild *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. (Lauaceae) calices from Amazonian Ecuador. **Pharmacological Research**, v. 55, p. 23-30, 2007.
- BARBOSA, F. F. et al. Influência da temperatura do ar de secagem sobre o teor e a composição química do óleo essencial de *Lippia alba* (Mill) N.E. Brown. **Quimica Nova**, v. 29, p. 1221-1225, 2006.
- BAUMER, J. D. **Produção do antibiótico cinabarina pelo fungo *Pycnoporus sanguineus* utilizando resíduos lignocelulósicos como substrato**. 2009. 132f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)–Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2009.
- CAMARGO, M. J. **Estudo químico de plantas do cerrado: *Ocotea lancifolia* (Schott) MEZ- Lauraceae**. 2011.203f. Tese (Doutorado em Química)–Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 2011.
- CARVALHO, W. et al. Uma visão sobre a estrutura, composição e biodegradação da madeira. **Quimica Nova**, v. 32, p. 2191-2195, 2009.
- CHANDRASEKARAN, S.; RAMANATHAN, S.; BASAK, T. Microwave food processing- a review. **Food research international**, v. 52, p. 243-261, 2013.
- CHITTENDEN, C.; SINGH, T. Antifungal activity of essential oils against wood degrading fungi and their applications as wood preservatives. **International Wood Products Journal**, v. 2, n. 1, p. 44-48, 2011.
- CHUA, L. Y. W. et al. Influence of drying methods on the antibacterial, antioxidant and essential oil volatile composition of herbs: a review. **Food and Bioprocess Technology**, v.12, n.3, p.450-476, 2019.
- DAMASCENO, C. S. B. et al. Chemical composition and biological activities of essential oils in the family Lauraceae: a systematic review of the literature. **Journal of Medicinal Plant and Natural Product Research**, 2019. <https://doi.org/10.1055/a-0943>
- DANIELLI, L. D. 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.

- DÍAZ-MAROTO, M. C. et al. Influence of drying on the flavor quality of Spearmint (*Mentha spicata* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 1265-1269, 2003.
- EBADI, M. T. et al. Influence of different drying methods on drying period, essential oil content and composition of *Lippia citriodora* Kunth. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v.2, n.4, p.182-187, 2015.
- EL-SEBAIL, A. A.; SHALABY, S. M. Solar drying of agricultural products: A review. **Renewable and sustainable energy reviews**, v. 16, p. 37-43, 2012.
- FERREIRA, A. G.; AQUILA, M. E. A. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, p.175-204, 2000.
- FIGUEIREDO, A. C. et al. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 23, p. 213-226, 2008.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, p. 374-381, 2007.
- GONÇALVES, R. A. et al. Anatomical characters and chemical profile of leaves of three species in Lauraceae family. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 28, p. 1-8, 2018.
- ISMAN, M. B. Neem and other botanical insecticides: barriers to commercialization. **Phytoparasitica**, v. 25, p. 339-344, 1997.
- ISMAN, M. B.; MACHIAL, C. M. Pesticides based on plant essential oils: from traditional practice to commercialization. **Naturally Occurring Bioactive Compounds**, v. 3, p. 29-44, 2006.
- JOSHI, S. C.; VERMA, A. R.; MATHELA, C. S. Antioxidant and antibacterial activities of the leaf essential oils of *Himalayan* Lauraceae species. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 1, p. 37-40, 2010.
- KALEMBA, D.; KUNICKA, A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. **Current Medicinal chemistry**, v. 10, p. 813-829, 2003.
- KEDIA, A. et al. Antifungal, antiaflatoxicogenic, and insecticidal efficacy of pearmint (*Mentha spicata* L.) essential oil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 89, p.29-36, 2014.
- KELLY, S. L. et al. Mode of action and resistance to azole antifungals associated with the formation of 14amethylergosta- 8, 24(28)-dien-3b, 6a-diol. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.207, n.3, p.910-915, 1995.
- KIM, J. H.; SUTLEY, E. J.; MARTIN, F. Review of modern wood fungal decay research for implementation into a building standard of practice. **Journal of Materials in Civil Engineering**, v. 31, n.12, 2019.

- KUMAR, A.; KUDACHIKAR, V. B. Antifungal properties of essential oils against anthracnose disease: a critical appraisal. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v.125, p. 133-144, 2018.
- MARQUES, C. A. Importância econômica da família Lauraceae Lindl. **Floresta e Ambiente**, v.8, p.195-206, 2001.
- MORAIS, L. A. S. Óleos essenciais no controle fitossanitário. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. (Eds.). **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna, SP, Brasil, 2009. Cap. 9, p. 139-152.
- MORESCHI, J. C. Biodegradação e preservação da madeira. 4 ed. p.1-49, 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/EPA/NIH Mass Spectral Library & Search Program**. Hoboken: John Wiley & Sons, 2009.
- 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. S. et al. Influência dos extrativos na resistência ao apodrecimento de seis espécies de madeira. **Revista Árvore**, v. 29, p. 819-826, 2005.
- ORPHANIDES, A.; GOULAS, V.; GEKAS, V. Drying technologies: Vehicle to high-quality herbs. **Food Engineering Reviews**, v.8, p.164-180, 2015.
- PAES, J. B. et al. Avaliação do potencial tanífero de seis espécies florestais de ocorrência no semi-árido brasileiro. **Cerne**, v.13, n.2, p. 160-169, abr./jun. 2007.
- PINHEIRO, C. G. **Óleo essencial de *Hesperozygis ringens* (BENTH.) Epling: variabilidade do rendimento, composição química e atividades biológicas**. 2014. 91 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal)—Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2014.
- PINHEIRO, C. G. ***Hesperozygis ringens* (BENTH.) Epling: Caracterização dos órgãos vegetativos, análise histoquímica e atividade antifúngica do óleo essencial**. 2018. 124f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal)—Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2018.
- QUINET, A. et al. **Lauraceae. Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2015. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB8466>>. Acesso em: 10 out. 2017.
- RAHIMMALEK, M.; GOLI, S. A. H. Evaluation of six drying treatments with respect to essential oil yield, composition and color characteristics of *Thymys daenensis* subsp. *daenensis*. Celak leaves. **Industrial Crops and Products**, v. 42, p. 613-619, 2013.

- RAMBO, M. A. **Óleos voláteis de espécies de *Ocotea* nativas do Rio Grande do Sul: Composição química e atividade antioxidantes, anti-inflamatória e antifúngica.** 2014. 122f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)– Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.
- REIS-AVILA, G.; OLIVEIRA, J. M. Lauraceae: A promising family for the advance of neotropical dendrochronology. **Dendrochronologia**, v. 44, p. 103-116, 2017.
- ROHWER, J. G.; KUBITZKI, K. Ecogeographical differentiation in *Nectandra* (Lauraceae), and its historical implications. **Botanic Acta**, v.106, p.88-99, 1993.
- SAAD, N. Y.; MULLER, C. D.; LOBSTEIN, A. Major bioactivities and mechanism of action of essential oils and their components. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 28, p.269-279, 2013.
- SALLEH, W. M. N. H. W.; AHMAD, F. Phytochemistry and biological activities of the genus *Ocotea* (Lauraceae): A review on recent research results (2000-2016), **Journal of Applied Pharmaceutical Science**,v. 7, n.5, p. 204-218, 2017.
- SANTOS, Z. M. **Avaliação da durabilidade natural da madeira de *Eucalyptus grandis* W. Hill: Maiden em ensaios de laboratório.** 1992. 75f. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal)–Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1992.
- SCHULTZ, T. P.; NICHOLAS, D. D. Development of environmentally-benign wood preservatives based on the combination of organic biocides with antioxidants and methal chelators. **Phytochemistry**, v. 61, p. 555-560, 2002.
- SELLAMI, I. H. et al. Qualitative and quantitative changes in the essential oil of *Laurus nobilis*L. leaves as affected by different drying methods. **Food Chemistry**, v. 126, p. 691-697, 2011.
- SILVA, D. T. et al. Análise do efeito da sazonalidade sobre o rendimento do óleo essencial das folhas de *Nectandra grandiflora* Ness. **Revista Árvore**, v.39, p.1065-1072, 2015.
- SILVA, D. T. **Caracterização química e atividades biológicas de extrativos obtidos de *Nectandra grandiflora* Ness e *Ocotea lancifolia* (Shott) Mez.** 2016. 159f. Tese. (Doutorado em Engenharia Florestal)- Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2016.
- SILVA, D. T. et al. Microbiological damage influences the content, chemical composition and the antifungal activity of essential oils in a wild-growing population of *Ocotea lancifolia*, **Journal of Essential Oil Research**, v. 30, p.265-277, 2018.
- SOUZA FILHO, A. P. S. et al. Atividade potencialmente alelopática do óleo essencial de *Ocimum americanum*. **Plantas Daninhas**, v. 27, p. 499-505, 2009.
- TAIZ, L. et al. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal.** 6.ed. Porto Alegre: Artmed, p. 888, 2017.
- TAKAKU, S.; HABER, W. A.; SETZER, W. N. Leaf essential oil composition of 10 species of *Ocotea* (Lauraceae) from Monteverde, Costa Rica. **Biochemical Systematic and Ecology**, v. 35, p. 525-532, 2007.

TEACA, C. A. et al. Natural Bio-Based Products for Wood Coating and Protection against Degradation: A Review. **BioResources**, v. 14, n. 2, 2019.

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.

VALETTE, N. et al. Antifungal activities of wood extractives. **Fungal Biology Reviews**, v.31, p. 113-123, 2017.

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

VITTI, A. M. S.; BRITO, J. O. Óleo essencial de eucalipto. **Documentos Florestais**, n. 17, 2003.

WEEMAES, C. A. et al. Kinetics of Chlorophyll Degradation and Color Loss in Heated Broccoli Juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 6, p. 2404-2409, 1999.