

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

Nadia Helena Bianchini

**EXTRATIVOS DE *Piper gaudichaudianum* Kunth NO CONTROLE DE
FUNGOS APODRECEDORES DA MADEIRA**

Santa Maria, RS
2022

Nadia Helena Bianchini

**EXTRATIVOS DE *Piper gaudichaudianum* Kunth NO CONTROLE DE FUNGOS
APODRECEDORES DA MADEIRA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Área de Concentração – Tecnologia da Madeira, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutora em Engenharia Florestal**.

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

Santa Maria, RS
2022

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Bianchini , Nadia Helena
EXTRATIVOS DE Piper gaudichaudianum Kunth NO CONTROLE
DE FUNGOS APODRECEDORES DA MADEIRA / Nadia Helena
Bianchini .- 2022.
136 p.; 30 cm

Orientadora: Berta Maria Heinzmann
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós
Graduação em Engenharia Florestal, RS, 2022

1. Piperaceae. 2. Preservante da madeira. 3.
Ergosterol. 4. Nanotecnologia. 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.

Declaro, NADIA HELENA BIANCHINI , para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Tese) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Nadia Helena Bianchini

**EXTRATIVOS DE *Piper gaudichaudianum* Kunth NO CONTROLE DE FUNGOS
APODRECEDORES DA MADEIRA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Área de Concentração – Tecnologia da Madeira, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutora em Engenharia Florestal**.

Aprovado em 24 de fevereiro de 2022.

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

Denise Schmidt, Dra. (UFSM)
(por videoconferência)

Edy Eime Pereira Baraúna, Dr. (UFMG)
(por videoconferência)

Silviana Rosso, Dra. (UNIPAMPA)
(por videoconferência)

Talita Baldin, Dra. (UFMG)
(por videoconferência)

Santa Maria, RS
2022

AGRADECIMENTOS

Eu agradeço a Deus, Pai de infinita bondade, pela vida e pela oportunidade de concluir o doutorado, e também por manter a Centelha Divina sempre acesa no meu coração, iluminando os meus pensamentos, as minhas ações e o meu caminho.

Agradeço também à minha família amada, por todo amor, carinho e incentivo. Aos meus pais, Luís e Maria Iracema, por todo suporte para que eu pudesse realizar este sonho. A minha vó Maria, por ser este exemplo de força de fé. Às minhas irmãs Mônica e Elisa, e meus cunhados, obrigada pelos momentos leves e divertidos quando nos encontramos. Aos meus sobrinhos, Francisco, Santiago e Eduardo, obrigada por me trazerem tanta paz e me lembrarem o significado do amor genuíno. Ao meu noivo Daniel, agradeço por todas as palavras de incentivo e por toda a força durante esta caminhada.

Muito obrigada também a todos os professores que contribuíram para a minha formação. Especialmente à professora Berta, que me orienta desde a iniciação científica, gratidão pelas orientações e ensinamentos ao longo de todos estes anos de convivência. Agradeço também à professora Marlove, ao professor Santini e à professora Aline e aos seus alunos, por me receberem em seus laboratórios para que eu pudesse desenvolver as minhas pesquisas. Aos professores que aceitaram o convite para avaliar esta tese, agradeço pela disponibilidade e pela atenção.

A todos os meus amigos, muito obrigada pelo apoio, incentivo e compreensão pelos momentos de ausência. Um agradecimento especial a todos os colegas e amigos do Laboratório de Extrativos Vegetais, pela ajuda e parceria durante os experimentos. Agradeço também às minhas amigas Maiara e Débora, pela amizade sincera e de longa data. Às minhas colegas de apartamento, Vitória, Dani e Rafa, muito obrigada pela parceria durante todos estes anos. Foi muito bom dividir a rotina com vocês.

E finalmente, agradeço a Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) por estes 11 anos de estudo gratuito e de qualidade. Muito obrigada à Capes pelo apoio financeiro para a elaboração deste trabalho e pela bolsa de pesquisa. Agradeço também a todos os funcionários da UFSM que de alguma forma contribuíram para a realização desta tese.

RESUMO

EXTRATIVOS DE *Piper gaudichaudianum* Kunth NO CONTROLE DE FUNGOS APODRECEDORES DA MADEIRA

AUTORA: Nadia Helena Bianchini
ORIENTADORA: Berta Maria Heinzmann

A busca por métodos alternativos para preservar a madeira tem sido estimulada, devido à toxicidade dos produtos de uso convencional. As pesquisas relacionadas ao uso de óleos essenciais (OEs) como tratamento alternativo aumentaram nos últimos anos, devido à sua ampla aplicabilidade. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antifúngica de extrativos vegetais obtidos a partir de diferentes partes (folhas, caules e raízes) de *Piper gaudichaudianum* Kunth (Piperaceae) para controlar o crescimento de fungos apodrecedores de madeira *in vitro*, além de elucidar um dos mecanismos de ação pelo qual o óleo essencial (OE) e o composto majoritário (dilapiol) atuam. Adicionalmente, buscou-se desenvolver uma nanoemulsão estável a partir do OE de folhas desta espécie e um estudo de estabilidade da formulação foi realizado, além de avaliar se o local de coleta influencia na composição química do OE. O OE foi obtido por hidrodestilação de diferentes partes de *P. gaudichaudianum*, com o auxílio do aparelho tipo Clevenger modificado. Em seguida, determinou-se o rendimento de extração, a densidade e a composição química por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-EM) e cromatografia gasosa com ionização de chama (GC-DIC). O dilapiol foi isolado do OE de folhas por meio de 2 colunas cromatográficas, realizadas em sequência. Os extratos foram obtidos por extração sob refluxo, com o aparelho Soxhlet. O potencial antifúngico dos extrativos vegetais foi verificado frente aos fungos *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat. (podridão-branca) e *Lentinus lepideus* (Fr.) (podridão-parda). Adicionalmente, avaliou-se o teor de ergosterol da membrana plasmática dos micélios sob efeito do dilapiol e do OE de folhas desta espécie. As nanoemulsões foram preparadas utilizando-se o método emulsificação sob alta energia. Os resultados evidenciaram que o OE de folhas de *P. gaudichaudianum* apresentou atividade antifúngica frente aos fungos apodrecedores avaliados, onde *L. lepideus* demonstrou maior susceptibilidade ao efeito dos extrativos, que apresentaram um efeito fungicida. Os resultados indicam também que o dilapiol apresentou maior inibição do crescimento micelial nos fungos em relação ao OE na concentração correspondente ($P < 0,05$). Adicionalmente, o OE e o dilapiol reduziram o teor de ergosterol no micélio das espécies fúngicas avaliadas. Em relação aos extratos, os rendimentos de extração são específicos para cada órgão da planta e dependem diretamente do solvente utilizado. Dentre os resultados da atividade antifúngica, destacam-se os obtidos com o extrato hexânico de raízes na maior concentração avaliada, que inibiu $73,90 \pm 0,182\%$ do crescimento micelial de *G. applanatum* e $91,44 \pm 5,416\%$ para *L. lepideus*. Quanto a composição química do OE, de acordo com a análise de agrupamento hierárquico e a análise de componentes principais, não houve diferença entre os constituintes do OE de folhas e caules coletados no mesmo local. No entanto, a densidade do OE de caules apresentou valores inferiores ao OE de folhas ($P = 0,0011$). Adicionalmente, houve diferença entre a composição química do OE de folhas coletadas em diferentes regiões, enquanto os componentes do OE de raízes não diferiram. A partir do OE de folhas de *P. gaudichaudianum*, desenvolveu-se uma nanoemulsão estável e com os parâmetros nanoemétricos adequados quando armazenada à temperatura ambiente ou sob refrigeração.

Palavras-chave: Piperaceae. Preservante da madeira. Ergosterol. Nanotecnologia.

ABSTRACT

EXTRACTIVES FROM *Piper gaudichaudianum* Kunth IN WOOD DECAY FUNGI CONTROL

AUTHOR: NADIA HELENA BIANCHINI
ADVISOR: BERTA MARIA HEINZMANN

The search for alternative methods to preserve wood has been stimulated due to the high toxicity of conventional products. Research related to the use of essential oils (EOs) as an alternative treatment has increased in recent years due to their wide applicability. The aim of this study was to evaluate the antifungal activity of plant extractives obtained from different parts (leaves, stems and roots) of *Piper gaudichaudianum* Kunth (Piperaceae) to control the growth of wood-rotting fungi *in vitro*, and to elucidate one of the action mechanisms of the essential (EO) and its major compound (dillapiole). Additionally, a stable nanoemulsion was developed from the EO of leaves of this species and a stability study was performed, in addition to evaluating whether the collection site influences the chemical composition of the EO. The EO was obtained by hydrodistillation of different parts of *P. gaudichaudianum*, with a modified Clevenger-type apparatus. Then, extraction yield, density and chemical composition were determined, by gas chromatography coupled to mass spectrometry (CG-MS) and gas chromatography with flame ionization detection (CG-FID). Dillapiole was isolated from the leaves EO by 2 chromatographic columns, performed in sequence. The extracts were obtained by extraction under reflux, with Soxhlet apparatus. The antifungal potential of plant extracts was verified against *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat. (white-rot) and *Lentinus lepideus* (Fr.) (brown-rot). Additionally, the content of ergosterol in the mycelia plasma membrane was evaluated under the effect of dillapiole and leaves EO of this species. The nanoemulsions were prepared using the high energy emulsification method. The results showed that the EO of *P. gaudichaudianum* leaves showed antifungal activity against the rotting fungi evaluated, where *L. lepideus* showed greater susceptibility to the effect of extractives, which showed a fungicidal effect. The results also indicate that dillapiole showed greater inhibition of mycelial growth in fungi compared to EO at the corresponding concentration ($P < 0.05$). Additionally, EO and dillapiole reduced the content of ergosterol in the fungal mycelium of the species evaluated. Regarding the extracts, the extraction yields are specific for each organ of the plant and depend directly on the solvent used. Among the results of antifungal activity, those obtained with roots hexane extract at the highest concentration evaluated inhibited $73.90 \pm 0.182\%$ of the mycelial growth of *G. applanatum* and $91.44 \pm 5.416\%$ of *L. lepideus* mycelial growth. Regarding the chemical composition of the EO, according to the hierarchical cluster analysis and the analysis of principal components, there was no difference between the EO constituents of leaves and branches collected at the same location. However, the EO density of branches was lower than for the EO of leaves ($P = 0.0011$). Additionally, there was a difference between the chemical composition of EO from leaves collected in different regions, while the components of EO from roots did not differ. A stable nanoemulsion was developed from the EO of *P. gaudichaudianum* leaves, with the appropriate nanometric parameters when stored at room temperature or under refrigeration.

Keywords: Piperaceae. Wood Preservative. Ergosterol. Nanotechnology.

LISTA DE ABREVIATURAS

BDA	Batata, Dextrose, Agar
BOD	<i>Biochemical Oxygen Demand</i>
CC	Coluna cromatográfica
CCD	Cromatografia em camada delgada
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
CG-DIC	Cromatografia gasosa com ionização de chama
OE	Óleo essencial
OEs	Óleos essenciais
EHR	Extrato hexânico de raízes
EER	Extrato etanólico de raízes
EHC	Extrato hexânico de caules
EEC	Extrato etanólico de caules

SUMÁRIO

1	APRESENTAÇÃO.....	10
1.1	INTRODUÇÃO	10
1.2	REFERENCIAL TEÓRICO	13
1.2.1	A preservação da madeira	13
1.2.2	Fungos apodrecedores da madeira	14
1.2.3	Produtos naturais	17
1.2.4	<i>Piper gaudichaudianum</i> Kunth.....	18
1.2.5	Óleos essenciais.....	20
1.2.6	Extratos	22
1.2.7	Nanoemulsões	23
1.2.8	Ergosterol.....	25
1.2.9	Dilapiol	27
1.3	HIPÓTESE.....	28
1.4	PROPOSIÇÃO.....	28
1.5	MATERIAL E MÉTODOS	29
1.5.1	Obtenção dos extrativos vegetais	29
1.5.1.1	<i>Coleta do material vegetal</i>	29
1.5.1.2	<i>Processamento do material vegetal.....</i>	31
1.5.1.3	<i>Obtenção dos extratos vegetais</i>	31
1.5.1.4	<i>Extração de óleos essenciais</i>	32
1.5.1.5	<i>Fracionamento do óleo essencial.....</i>	33
1.5.2	Análise da composição química	34
1.5.2.1	<i>Cromatografia gasosa</i>	34
1.5.2.2	<i>Cromatografia líquida.....</i>	35
1.5.3	Nanoemulsões	36
1.5.3.1	<i>Preparo das nanoemulsões.....</i>	36
1.5.3.3	<i>Análise da estabilidade da nanoemulsão</i>	39
1.5.3.4	<i>Análise do óleo essencial da nanoemulsão</i>	39
1.5.4	Avaliação da atividade antifúngica <i>in vitro</i>	40
1.5.4.1	<i>Atividade antifúngica <i>in vitro</i> do óleo essencial e substância isolada.....</i>	40
1.5.4.2	<i>Atividade antifúngica <i>in vitro</i> dos extratos vegetais</i>	41
1.5.4.3	<i>Determinação do conteúdo de ergosterol</i>	41
1.5.5	Análise estatística	45
2	MANUSCRITO 1 Antifungal activity of <i>Piper gaudichaudianum</i> Kunth essential oil and ergosterol content of wood rot fungi	48
3	MANUSCRITO 2 The use of <i>Piper gaudichaudianum</i> Kunth extracts to control wood decayfungi growth.....	68
4	MANUSCRITO 3 Development of nanoemulsions containing <i>Piper gaudichaudianum</i> Kunth essential oil and influence of collection site on its chemical composition	86
5	DISCUSSÃO.....	112
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	120
	REFERÊNCIAS.....	122

1 APRESENTAÇÃO

1.1 INTRODUÇÃO

A madeira é um material natural amplamente utilizado para diversos fins, principalmente na construção civil, bem como em indústrias de móveis e esquadrias, na elaboração de paletes, produção de celulose etc. Entretanto, por ser um material orgânico, heterogêneo e biodegradável, possui grande susceptibilidade ao ataque de organismos xilófagos, como fungos apodrecedores da madeira e cupins, que causam perdas econômicas consideráveis na indústria de madeira serrada (STANGERLIN et al., 2013). Dentre os diversos agentes xilófagos existentes, destacam-se os fungos apodrecedores, causadores de podridão-branca e podridão-parda na madeira (BENTO et al., 2014).

A madeira de diversas espécies arbóreas nativas apresenta elevada durabilidade natural frente aos organismos xilófagos supracitados, devido a presença de extrativos depositados no cerne (KIRKER et al., 2013). Devido a isto, nas últimas décadas houve um consumo desordenado dessas matas, que associado à falta de preocupação com o manejo florestal, acarretou a escassez de diversas espécies. Para atender a essa demanda por madeira, houve um estímulo para o desenvolvimento de florestas plantadas de rápido crescimento, a exemplo de espécies dos gêneros *Pinus* e *Eucalyptus* (TAYLOR; GARTNER; MORRELL, 2002).

De acordo com a Indústria Brasileira de Árvores (IBA, 2022), o Brasil possui 9 milhões de hectares de florestas de eucalipto, pinus e demais arbóreas exóticas plantadas. Essas são responsáveis por 91% de toda a madeira produzida para fins industriais no Brasil, enquanto os 9% residuais são oriundos de florestas nativas legalmente manejadas. Ainda de acordo com essa Associação, o setor de florestas plantadas é responsável pela geração de R\$ 13 bilhões em tributos federais, estaduais e municipais, representando 0,9% da arrecadação nacional.

Apesar de apresentar um crescimento e desenvolvimento consideravelmente mais acelerado, a madeira das espécies exóticas apresenta menor durabilidade natural em relação à algumas espécies nativas (SANTOS et al., 2019). Desta maneira, para que a madeira oriunda de florestas plantadas não perdesse a competitividade frente a outros produtos, tornou-se necessária a realização dos tratamentos preservantes, com o intuito de otimizar o seu uso a campo e aumentar sua vida-útil (TEOH; DON; UJANG, 2011). Assim, com o aumento da durabilidade da madeira, há uma redução no consumo das madeiras nativas, diminuindo o impacto sobre essas florestas (ABRUZZI et al., 2012).

Atualmente, existem diversos produtos químicos disponíveis no mercado que são eficazes para proteger a madeira do ataque de organismos xilófagos. Entretanto, grande parte desses produtos são constituídos por metais pesados como cobre, chumbo e arsênio (CHITTENDEN; SINGH, 2011). Esses compostos são altamente tóxicos tanto para o ambiente quanto para os seres humanos e animais, o que levou à proibição do uso dessa classe de preservantes da madeira em diversos países (XIE et al., 2017). A toxicidade desses produtos químicos industrializados estimulou a busca por substâncias preservantes de menor impacto ambiental (PÁNEK; REINPRECHT; HULLA, 2014).

Nos últimos anos houve um aumento na busca por substâncias obtidas a partir de produtos naturais que sejam ativas frente aos organismos degradadores da madeira, ao mesmo tempo em que não apresentem toxicidade aos usuários e ao ambiente, nas concentrações utilizadas para a conservação da madeira (TCHINDA et al., 2018). Com base no exposto, os extrativos vegetais destacam-se como uma alternativa potencialmente eficaz e ambientalmente segura para atuar no controle desses agentes xilófagos (PÁNEK; REINPRECHT; HULLA, 2014). Existem diversos estudos na literatura que relatam a atividade de extrativos vegetais, como óleos essenciais (OEs) e extratos, obtidos a partir de diferentes partes de plantas de diversas espécies, frente a microrganismos deterioradores da madeira (SILVA et al., 2016; XIE et al., 2017).

Dentre os compostos naturais potencialmente ativos, estão os extrativos vegetais obtidos a partir de *Piper gaudichaudianum* Kunth. Esta espécie arbustiva pertence à família Piperaceae e possui ampla distribuição no Brasil, Paraguai e Argentina. A espécie *P. gaudichaudianum* é descrita como uma planta rústica, sendo indicada para projetos de restauração ambiental por propiciar uma cobertura arbustiva em solos pobres (GUIMARÃES et al., 2015). Adicionalmente, o óleo essencial (OE) de folhas e raízes dessa espécie possui atividade antifúngica *in vitro* frente a alguns fungos apodrecedores da madeira, como *Pycnoporus sanguineus* (L.) Murril, *Gloeophyllum trabeum* (Persoon ex Fries) Murril e *Trametes versicolor* (L. ex Fr.) (SCHINDLER, 2015; TRES, 2017). Entretanto, ainda não foram encontrados relatos de atividade antifúngica de extratos vegetais obtidos de raízes e caules desta espécie frente a fungos apodrecedores da madeira, e o mecanismo de ação antifúngico destes extrativos vegetais ainda é desconhecido.

O rendimento e a densidade do OE de folhas desta espécie nativa são fatores que também estimulam a investigação do uso deste extrativo como preservante da madeira (SCHINDLER; HEINZMANN, 2017). Estas características devem ser consideradas quando se pretende estabelecer um produto baseado em OEs, uma vez que é necessário obter grandes

volumes, além de desenvolver uma mistura com outros produtos e solventes, como a água (ELLER et al., 2018). Desta maneira, como o OE de folhas de *P. gaudichaudianum* apresenta densidade semelhante à da água, possivelmente facilitará o preparo de uma solução preservante (SCHINDLER; HEINZMANN, 2017).

As composições químicas dos extrativos vegetais obtidos de diferentes partes de uma mesma planta podem apresentar distinções. No caso da espécie em estudo, as composições dos OEs de folhas e de órgãos reprodutivos diferenciam-se em cerca de 50% (SCHINDLER; HEINZMANN, 2017). No entanto, a comparação entre os extrativos obtidos de folhas, raízes e caules ainda não foi realizada. Por esse motivo, é necessário realizar um pré-processamento do material vegetal antes de iniciar a hidrodestilação de folhas, separando-as dos caules, que são descartados. Essa etapa adicional demanda tempo e mão de obra, o que acarreta um aumento no custo de produção, principalmente no que se refere à extração de OE em escala industrial. Com isso, por meio de um estudo comparativo, será possível recomendar se a extração de OE de toda a parte aérea pode ser realizada, otimizando o processo de extração e, mais uma vez, favorecendo o desenvolvimento de um produto comercial.

Este trabalho está organizado na forma de três manuscritos, que estão formatados de acordo com as normas da Universidade Federal de Santa Maria. Após a Introdução, apresenta-se o Referencial Teórico, que contextualiza brevemente os principais temas relacionados a este estudo. Após, no item Proposição, são descritos os objetivos deste trabalho. A seguir, com o intuito de facilitar a compreensão de como os experimentos foram realizados, no item Materiais e Métodos estão descritos detalhadamente os métodos utilizados para a obtenção dos resultados descritos nos manuscritos. Na sequência, os resultados deste trabalho são apresentados na forma de manuscritos científicos.

O Manuscrito 1 descreve a atividade antifúngica *in vitro* do OE de folhas de *P. gaudichaudianum* e de seu composto majoritário frente a fungos causadores de podridão-branca e parda na madeira, bem como o seu efeito sobre a concentração de ergosterol na membrana celular fúngica. O Manuscrito 2 apresenta os resultados relacionados aos extratos de raízes e caules de *P. gaudichaudianum* e sua atividade antifúngica *in vitro* frente a fungos apodrecedores da madeira. Na sequência, o terceiro manuscrito apresenta um estudo comparativo entre a composição química de OEs de *P. gaudichaudianum* obtidos a partir de diferentes partes da planta, além de analisar se o local de coleta influencia na composição química do OE. Este trabalho aborda também o desenvolvimento da nanoemulsão do OE de *P. gaudichaudianum* e o estudo de estabilidade desta formulação. No tópico Discussão, buscou-se realizar uma interpretação geral dos resultados, concatenando-os entre si e com os dados

disponíveis na literatura. O item Considerações Finais apresenta uma conclusão dos resultados encontrados. Por fim, apresenta-se o item Referências Bibliográficas.

1.2 REFERENCIAL TEÓRICO

1.2.1 A preservação da madeira

O uso de madeira como matéria-prima contribui positivamente com o ambiente, sendo uma alternativa ao uso de outros materiais menos sustentáveis (WERNER; RICHTER, 2007). Entretanto, a impregnação com produtos preservantes que contém em sua formulação sais metálicos como arsênico, cromo, cobre e boro fornecem a toxicidade da madeira tratada (COGGINS, 2008). O uso dessas substâncias torna o processo caro e prejudicial ao homem e ao ambiente, além de exigir cuidados especiais durante e após a sua vida útil (WANG et al., 2016). Adicionalmente, deve-se considerar que a madeira preservada com produtos químicos de toxicidade reconhecida deve ser descartada de maneira semelhante a qualquer outro resíduo perigoso (AUGUSTSSON et al., 2017). Contudo, nem toda madeira preservada é corretamente encaminhada para o sistema de gerenciamento de resíduos após o seu uso. Na maioria das vezes, este resíduo é indevidamente reutilizado ou queimado, liberando as substâncias preservantes ao ambiente. Com base no exposto, atualmente acredita-se que os preservantes de madeira de base biológica tenham menores impactos ambientais negativos em relação aos produtos que contém metais pesados (DING et al., 2017).

Nos últimos anos, a geração de novos preservantes de madeira sem metais pesados foi identificada como uma possível solução para reduzir os impactos ambientais negativos da indústria de preservação da madeira. Nesse sentido, os produtos preservantes livres de metais pesados, fungicidas e inseticidas orgânicos em microemulsões e os preservantes à base de água são listados como os preservantes da madeira mais comuns em uso industrial ou emergentes em pesquisas como possíveis substitutos de menor impacto ambiental, denominados verdes (BARBERO-LÓPEZ et al., 2019). Os produtos químicos verdes protegem a madeira e prolongam a sua vida útil, além de reduzir o impacto negativo do tratamento da madeira, facilitando sua reciclagem e possibilitando sua reutilização como fonte de energia (COGGINS, 2008).

O grande fomento às pesquisas que visam o desenvolvimento de produtos químicos verdes, visa estimular a busca por alternativas mais limpas e sustentáveis aos produtos químicos sintéticos de uso convencional (BARBERO-LÓPEZ et al., 2019). Em muitos países, o uso

destes preservantes da madeira à base de metais pesados já é proibido em diversas aplicações comerciais, devido sua elevada toxicidade e persistência no ambiente (PÁNEK; REINPRECHT; HULLA, 2014). Os produtos naturais obtidos a partir de plantas são alternativas mundialmente conhecidas para os fins pretendidos pela indústria de preservação de madeira e tem despertado o interesse em diversos pesquisadores (HARJU et al., 2003). Nesse sentido, os extrativos vegetais obtidos a partir de espécies naturalmente duráveis ou de plantas que produzem substâncias biologicamente ativas possuem um grande potencial para ser utilizados no desenvolvimento de produtos preservantes da madeira (TASCIOGLU et al., 2013).

1.2.2 Fungos apodrecedores da madeira

A madeira é um material amplamente utilizado que apresenta como vantagens a disponibilidade, durabilidade, cor natural e alta relação resistência/peso, o que favorece seu uso nas indústrias de móveis e na construção civil (BROCCO et al., 2017). Adicionalmente, por ser um material biológico, está sujeita à variabilidade nas propriedades físicas, mecânicas, químicas e na resistência natural à deterioração. Geralmente, a quantidade e o tipo de extrativos na madeira vai definir o seu nível de susceptibilidade ao ataque de organismos deterioradores como fungos, cupins, besouros e brocas marinhas (BI et al., 2019). Os fungos apodrecedores da madeira são considerados um dos responsáveis por danos significativos tanto às árvores vivas quanto aos produtos de madeira maciça, por meio da deterioração das propriedades mecânicas e da aparência (DEFLORIO et al., 2008).

Para diminuir estes danos, a indústria de preservação da madeira tem utilizado produtos químicos que são tóxicos aos fungos apodrecedores. Entretanto, o uso destas substâncias causa riscos potenciais ao ambiente e à saúde humana (BARBERO-LÓPEZ et al., 2019). Devido a isso, em muitos países existem regulamentações cada vez mais rigorosas em relação ao uso destes biocidas, além de haver um estímulo para o desenvolvimento de métodos alternativos de preservação da madeira (GERENGI et al., 2014). O tratamento preservante se faz necessário porque a madeira possui uma tendência natural à degradação, devido a diferentes fatores bióticos e abióticos, que limitam sua durabilidade principalmente quando utilizada em ambientes externos (BROCCO et al., 2017).

Os fitopatógenos atuam em conjunto com agentes físicos e químicos que aceleram o processo de degradação (FRITSCHI; LIN; WALKER, 2008). Desta maneira, estes organismos utilizam a madeira como fonte de energia, extraindo dela os nutrientes necessários a partir da

celulose, hemiceluloses e lignina (SHIGO, 1984). Em várias espécies lenhosas, a distribuição e o conteúdo das células parenquimáticas no alburno são os principais fatores que influenciam o grau da deterioração da madeira por fungos Basidiomicetos e Ascomicetos (GONZÁLEZ-LAREDO et al., 2015). Adicionalmente, a degradação pode depender de barreiras físicas relacionadas à anatomia da madeira ou da capacidade dos fitopatógenos de provocar alterações anatômicas na madeira (VIVIAN et al., 2014).

O processo de deterioração da madeira inicia com a penetração da hifa pelo lúmen da célula vegetal, por meio de uma intensa secreção de metabólitos extracelulares desenvolvidos pelos fungos, principalmente enzimas (CARVALHO et al., 2009). Estas trabalham sinergicamente, clivando as pontes de hidrogênio e as ligações covalentes dos polímeros vegetais de sustentação. Os produtos dessa clivagem são os monômeros de glicose, que podem ser digeridos pelas hifas (OLIVEIRA et al., 2005). Desta maneira, os componentes da parede celular, hemicelulose, celulose e lignina, são esgotados e metabolizados pelos fungos (DEFLORIO et al., 2008). Com isto, as hifas obtêm energia para penetrar na membrana plasmática e finalmente adentrar no metabolismo intracelular. Dentre as espécies fúngicas que desencadeiam este processo, destacam-se os Basidiomicetos, causadores das podridões branca, parda e mole na madeira (OLIVEIRA et al., 2005). Estas classes de fitopatógenos possuem características enzimáticas específicas em relação à deterioração dos constituintes primários da madeira (STANGERLIN et al., 2013).

Os fungos apodrecedores causadores de podridão-parda deterioram os polissacarídeos da parede celular e mantêm a lignina residual intacta, preservando a estrutura original enquanto a madeira se encontra no estado úmido (OLIVEIRA et al., 1986). Entretanto, quando a madeira seca, a estrutura que antes era mantida pela lamela média, rica em lignina, sofre colapso com muita facilidade, aparecendo fissuras paralelas e perpendiculares à direção da grã, separando-se em blocos (MORESCHI, 2011). Quando estes fungos atacam a madeira de coníferas, nos estágios iniciais de ataque, as hifas concentram-se nos raios (OLIVEIRA et al., 1986). Contudo, nas madeiras de folhosas as hifas colonizam os tecidos lenhosos mais uniformemente, sendo que em algumas espécies a distribuição pelos vasos é maior em relação aos raios (ARANTES; MILAGRES, 2009). Como representante desse grupo, destaca-se a espécie *Lentinus lepideus* (Fr.) Fr.

Os fungos causadores de podridão-branca afetam as propriedades da madeira e acarretam redução progressiva no peso e no volume (ROWELL et al., 2005). Estes fitopatógenos atacam tanto os polissacarídeos quanto a lignina, proporcionando à madeira atacada um aspecto mais claro (ZABEL; MORRELL, 1992). Desta maneira, as madeiras que

são degradadas por fungos de podridão-branca perdem o aspecto lustroso e a coloração natural. Com isso, a madeira atacada apresenta uma coloração esbranquiçada, que está associada à destruição dos pigmentos (SANTINI, 1988). Como representante dos fungos causadores de podridão-branca, destaca-se a espécie *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat.

Conforme mencionado anteriormente, durante a colonização da madeira por fungos, diversas enzimas são produzidas, sendo que os complexos enzimáticos basicamente constituem-se dos sistemas hidrolítico e oxidativo (ARANTES; MILAGRES, 2009). A degradação da celulose é feita pelas hidrolases, enquanto as enzimas responsáveis pela degradação da lignina são as oxidases. As espécies causadoras de podridão-branca produzem todas as enzimas extracelulares necessárias para a hidrólise completa da celulose (endo-1,4- β -glicanase, exo-1,4- β -glicanase e 1,4- β -glicosidase), e não são boas produtoras de celulases (ENOKI; ITAKURA; TANAKA, 1997). Por outro lado, as espécies causadoras de podridão-parda produzem endo-1,4- β -glicanase e 1,4- β -glicosidase, e não produzem a exo-1,4- β -glicanase, que atua nas regiões cristalinas da celulose (ENOKI; ITAKURA; TANAKA, 1997). Neste caso, a degradação da celulose não pode ser explicada apenas pela ação enzimática, havendo também a presença de outros fatores.

A enzima celobiose-desidrogenase também participa do complexo celulolítico de alguns fungos. Contudo, possui atividade oxidativa e atua na oxidação da celobiose, de oligômeros de glicose e até mesmo da celulose (ARANTES; MILAGRES, 2009). A biodegradação efetiva da lignina é observada somente com fungos causadores de podridão-branca, onde atua um grupo de enzimas oxidativas compostas por duas peroxidases (ligninaperoxidase e peroxidase dependente de manganês) e uma oxidase (lacase) (ARANTES; MILAGRES, 2009). Entretanto, a produção dessas enzimas varia dentre os fungos causadores de podridão-branca. Considerando a grande complexidade química das moléculas de lignina, existem estudos relatando que este composto não pode ser biodegradado eficientemente apenas pela ação de enzimas ligninolíticas, havendo a participação de outro sistema oxidativo para degradá-la completamente na ausência de uma das enzimas supracitadas (HENRIKSSON; JOHANSSON; PETTERSSON, 2000).

Com relação à membrana plasmática fúngica, esta é responsável pela manutenção de um ambiente homeostático, troca de materiais e transferência de energia e informações nas células (BOMFIM et al., 2020). Desta maneira, desempenha um papel vital, sendo responsável por manter as células vivas e saudáveis. Devido a essa grande importância, destruir a membrana plasmática dos fungos é um dos principais alvos antifúngicos à base de OEs (HU et al., 2017). O principal componente esteroideal da membrana celular fúngica, o ergosterol, é um dos

principais compostos responsáveis pelo bom funcionamento e pela integridade das células (GUTAROWSKA; ŻAKOWSKA, 2010).

Existem diversos estudos relatando a interrupção das vias biossintéticas de esteróis em fungos, tanto por substâncias naturais quanto sintéticas, inibindo o crescimento de fungos do gênero *Candida* spp. (PINTO et al., 2009), *Aspergillus* spp. (BOMFIM et al., 2020; HU et al., 2017), *Alternaria* spp., *Fusarium* spp. e *Penicillium* spp. (GUTAROWSKA; ŻAKOWSKA, 2010), além de fungos Basidiomicetos que degradam a madeira (NIEMENMAA; GALKIN; HATAKKA, 2008) e espécies de dermatófitos (PINTO et al., 2009).

1.2.3 Produtos naturais

Tendo em vista a sua ampla biodiversidade, o Brasil possui um grande potencial para o estudo e o desenvolvimento de produtos à base de produtos naturais, com uma biota estimada entre 170 e 210 mil espécies, o que corresponde a aproximadamente 13,1% da riqueza mundial conhecida (STEHMANN; SOBRAL, 2017). Embora parte das espécies que compõe a biodiversidade de nosso país ainda não esteja completamente descrita, no Brasil, o grupo das plantas está entre os mais estudados, com 34.916 espécies catalogadas, incluindo briófitas, samambaias, licófitas, gimnospermas e angiospermas, das quais 55% são endêmicas do território nacional (BIODIVERSIDADE, 2022).

A área do Brasil é de 8,5 milhões km² que abrange diversas zonas climáticas, resultando em grandes variações ecológicas com diferentes biomas, como a Floresta Amazônica, Pantanal, Cerrado, Caatinga, Mata Atlântica e Pampa. A grande variedade desses biomas se deve à riqueza da flora e da fauna, que abriga aproximadamente 20% do número total de espécies do planeta (STEHMANN; SOBRAL, 2017).

Ao longo do processo de evolução, as plantas desenvolveram um metabolismo capaz de produzir diversos compostos naturais de grande complexidade química, com estruturas altamente diversas (SPRINGOB; KUTCHAN, 2009). Os metabólitos primários estão diretamente relacionados às atividades essenciais de sobrevivência, crescimento e desenvolvimento das plantas (FESTER; KUTCHAN, 2009).

Já os compostos químicos naturais que são biossintetizados para beneficiar espécies produtoras, sendo elementos de diferenciação, são denominados metabólitos secundários. Esta classe de compostos possui importantes funções ecológicas e é responsável por melhorar a adaptação e a sobrevivência das espécies em seu ecossistema (MOORE et al., 2014). Desta maneira, os metabólitos secundários fazem parte de todas as espécies vegetais. Mesmo

apresentando frequentemente estruturas diferenciadas na dependência da espécie produtora, estes metabólitos exercem funções ecológicas distintas e fundamentais para as plantas (SHARIFI-RAD et al., 2017).

Os metabólitos secundários fazem parte do sistema de defesa químico das plantas, permitindo que elas se defendam de predadores herbívoros e de microrganismos patogênicos (HE et al., 2018). A biossíntese destes metabólitos é influenciada por fatores bióticos e abióticos. Adicionalmente, atuam na atração de polinizadores e agentes dispersores de sementes, bem como na supressão do crescimento de espécies vegetais vizinhas (CHOUHAN; SHARMA; GULERIA, 2017).

1.2.4 *Piper gaudichaudianum* Kunth

Piper gaudichaudianum (Figura 2) pertence à família Piperaceae, que possui mais de 2000 espécies distribuídas em ambos os hemisférios, sendo consideradas plantas de alta importância ecológica, comercial, econômica e medicinal (PARMAR et al., 1997; SILVA et al., 2017). No Brasil, o gênero *Piper* possui 290 espécies, das quais 179 são endêmicas (JARAMILLO; MANOS, 2001). No Rio Grande do Sul existem 12 espécies nativas registradas (RUSCHEL, 2004). As espécies de Piperaceae são economicamente importantes no mercado mundial de especiarias, bem como na geração de compostos bioativos, desempenhando um papel fundamental como agentes terapêuticos na descoberta de novos medicamentos (BARH et al., 2013; THIN et al., 2018).

Os padrões de distribuição das representantes de *Piper* variam de localmente endêmica a generalizada (JARAMILLO; MANOS, 2001). As plantas do gênero são dominantes no sub-bosque das florestas tropicais e são de grande importância ecológica, sendo essenciais com base em sua associação com morcegos frugívoros (DYER; PALMER, 2004). As espécies de *Piper* foram amplamente utilizadas empiricamente na medicina tradicional no tratamento de tosse, doenças intestinais, bronquite, doenças venéreas, resfriados e reumatismo (AGBOR et al., 2012; ZAKARIA et al., 2010). Os produtos naturais obtidos a partir destas plantas podem apresentar em sua composição várias classes de metabólitos secundários, como fenilpropanoides, amidas, imidas, lignanas, neolignanas, terpenoides, pironas e flavonoides (DYER; PALMER, 2004; JEFFREY et al., 2014).

Os metabólitos secundários de *Piper* podem apresentar diversos benefícios para a saúde humana (SAHA; VERMA, 2015). As representantes deste gênero são ricas em OEs, que podem ser encontrados em diversas partes da planta, como folha, caules, raízes, frutos e sementes

(SALEHI et al., 2019). Existem relatos na literatura sobre as atividades biológicas dos extrativos e de compostos biologicamente ativos isolados a partir de espécies de *Piper* (SILVA et al., 2017; MGBEAHURUIKE et al., 2017). Dentre estas, experimentalmente observadas, estão os efeitos anestésico, anti-inflamatório (ZAKARIA et al., 2010), analgésico (TASLEEM et al., 2014), antioxidante (SAHA; VERMA, 2015) e anticâncer (EE et al., 2010).

Figura 2 – Indivíduos adultos de *Piper gaudichaudianum* Kunth.



Fonte: o autor (2022).

A espécie *P. gaudichaudianum* é latino-americana, com ocorrência no Paraguai, Argentina e Brasil, onde possui uma ampla distribuição geográfica. Neste último, a planta ocorre no Norte, Nordeste, Sudeste, Centro-Oeste e Sul, sendo que no Rio Grande do Sul, esta é nativa e ocorre ao longo da Floresta Atlântica (SOBRAL et al., 2013). Conhecida popularmente como pariparoba ou jaborandi, sua altura varia de 1 a 3 m e seu caule é provido de entrenós, variando de 4 a 6 cm (GUIMARÃES; VALENTE, 2001). Suas folhas possuem lâmina assimétrica-aguda na base e suas flores são sésseis, dispostas em espigas e sustentadas por um pedúnculo piloso (GUIMARÃES et al., 2015).

As folhas frescas de *P. gaudichaudianum* são utilizadas na medicina popular em infusões para o efeito analgésico, enquanto as raízes frescas são utilizadas como anti-inflamatórias e para doenças no fígado (ZAKARIA et al., 2010). Quanto às atividades

biológicas já descritas, destacam-se o efeito fungicida (extrato de diclorometano-metanol) (LAGO et al., 2004), antimicrobiano (extrato etanólico) (PUHL et al., 2011), antibacteriano (SILVA et al., 2019), inseticida (OE) (SOUZA et al., 2020), anti-inflamatório (extrato etanólico) (FINATO et al., 2018), anti-esquistossomose (extrato metanólico) (RAPADO et al., 2014), tripanocida (composto isolado a partir do extrato acetato de etila) (BATISTA et al., 2011) e larvicida (OE) (MORAIS et al., 2007). Adicionalmente, já foi relatada a atividade antifúngica de OEs de folhas e raízes desta espécie frente a fungos causadores de podridão-parda (*G. trabeum*) e podridão-branca (*P. sanguineus* e *T. versicolor*) na madeira (SCHINDLER, 2015; TRÉS, 2017).

1.2.5 Óleos essenciais

Os OEs são caracterizados como misturas complexas de compostos voláteis de baixo peso molecular, principalmente mono e sesquiterpenoides, além de álcoois e aldeídos de cadeia curta, fenóis simples, ésteres e cetonas (CHOUHAN; SHARMA; GULERIA, 2017). Estes extrativos podem ser produzidos e secretados por tricomas glandulares, tecidos secretores especializados difundidos na superfície de diferentes partes das plantas, como folhas, flores, brotos, sementes, galhos, casca, madeira, frutas e raízes. Contudo, algumas famílias botânicas são caracterizadas por apresentarem estruturas secretoras e de estocagem localizadas no interior dos tecidos vegetais, como células oleíferas, bolsas lisígenas e esquizógenas (IRITI et al., 2006; SHARIFI-RAD et al., 2017). Adicionalmente, os componentes dos OEs são frequentemente provenientes das vias isoprenoides e geralmente apresentam valores de densidade inferior em relação à da água (HEINZMANN; SPITZER; SIMÕES, 2017).

Os OEs são descritos como líquidos voláteis, raramente coloridos, límpidos e solúveis em solventes orgânicos, compostos por misturas de natureza muito complexa, sendo que as concentrações de componentes químicos variam inter e intraespecificamente (CHOUHAN; SHARMA; GULERIA, 2017). Estas diferenças podem estar relacionadas a fatores como polimorfismo, parte da planta utilizada durante a extração, método de extração, diferenças geográficas, condições ambientais como solo, clima e relevo, além da ocorrência de quimiotipos (AMARAL et al., 2015). Adicionalmente, os OEs são conhecidos por estarem envolvidos na resistência de plantas contra pragas, herbívoros, fungos e bactérias (HARKAT-MADOURI et al., 2015).

Dentre as classes de compostos mais importantes encontradas nos OEs estão: hidrocarbonetos monoterpênicos, entre os quais são detectados o α -pineno, limoneno, α -

terpineno, *p*-cimeno, β -pineno e α -felandreno; monoterpênóides oxigenados, onde podem ser encontrados o 1,8 cineol, linalol e terpinen-4-ol; hidrocarbonetos sesquiterpênicos, cujos representantes podem ser β -elemeno, δ -cadineno, β -cariofileno, α -humuleno, germacreno D e biciclogermacreno; sesquiterpenóides oxigenados, onde podem ser encontrados o espatulenol, (*E*)-nerolidol, óxido de cariofileno e o α -cadinol. No entanto, o grupo dos fenilpropanóides é formado através de rota biossintética distinta dos terpenóides acima citados, pois enquanto esses últimos são produtos de condensação do isopreno, os fenilpropanóides são derivados do ácido chiquímico. Como exemplos podem ser citados os compostos safrol, dilapiol, miristicina, elemicina, (*Z*)-asarona e apiol (SIMÕES et al., 2000; SILVA et al., 2017).

As principais técnicas descritas para obtenção de OEs são arraste por vapor d'água, extração com solventes orgânicos, prensagem ou espremedura e extração por CO₂ supercrítico (WONGKITTIPONG et al., 2004). Com relação ao rendimento de extração, além das características inerentes à planta e ao método escolhido, esta variável também é influenciada pelas condições em que o processo de extração é realizado, como tamanho da partícula do material vegetal, temperatura e solvente utilizado, entre outros. Adicionalmente, a realização do pré-processamento do material vegetal, como a secagem, também influencia no rendimento de extração (CHOUHAN; SHARMA; GULERIA, 2017)

Devido às inúmeras bioatividades possíveis, os OEs são utilizados em diversas áreas como medicina, aromaterapia, fabricação de cosméticos, em indústrias de alimentos, de pesticidas, farmacêutica e de perfumaria, bem como na fabricação de produtos de higiene e de limpeza (KNAAK; FIUZA, 2010). Esta ampla faixa de aplicabilidades dos extrativos deve-se às suas propriedades aromáticas e flavorizantes, além das atividades inseticidas, antimicrobianas, antioxidantes, antifúngicas e anestésicas (SAKAI; YOSHIMURA, 2012). Destaca-se ainda que os OEs são classificados como um produto renovável, sendo que a matéria-prima utilizada para a sua obtenção pode ser produzida em grande quantidade, como produtos agrícolas/ florestais. Adicionalmente, esta classe de extrativos é menos tóxica ao ambiente e menos perigosa aos seres humanos e animais em comparação a diversos produtos sintéticos (PARK et al., 2006).

Devido aos efeitos tóxicos, frequentes nos produtos sintéticos, houve um grande estímulo às pesquisas relacionadas ao uso de OEs como substâncias bioativas para atuar em diversas áreas como antioxidante, conservante natural, inseticida, na produção de suplementos alimentares e na indústria farmacêutica (WEI; SHIBAMOTO, 2007). Os OEs têm sido amplamente estudados como fontes potenciais de novos compostos antimicrobianos,

demonstrando o potencial destes extrativos para atuar benéficamente nas mais diversas áreas de conhecimento (ASTANI; REICHLING; SCHNITZLER, 2010;).

Considerando que os OEs são misturas complexas de compostos de baixo peso molecular, frequentemente observa-se que o extrativo bruto é mais ativo em comparação a qualquer um de seus constituintes isolados (PANDEY; TRIPATHI; SINGH, 2018; TAK; JOVEL; ISMAN, 2016). Existem diversos estudos que relatam interações aditivas, de potenciação e/ou sinérgicas entre os constituintes dos OEs, sendo que as combinações entre os compostos produziram frequentemente resultados comparáveis ou superiores à atividade somatória esperada (AKHTAR et al., 2012; SCALERANDI et al., 2018). Adicionalmente, por se tratarem de misturas complexas, os OEs agem por múltiplos mecanismos de ação, o que reduz a tendência ao desenvolvimento da resistência frente à atividade avaliada (FENG et al., 2020).

1.2.6 Extratos

As propriedades biológicas de extratos vegetais obtidos de plantas têm recebido grande interesse por sua baixa toxicidade aos animais e ao ambiente em comparação aos produtos sintéticos, juntamente com as diversas atividades biológicas e farmacológicas já descritas, e sua viabilidade econômica (SILVA et al., 2020). Os produtos naturais como os extratos vegetais e os OEs possuem diversas e importantes atividades biológicas, como antifúngica, antibacteriana, inseticida e antiviral, sendo que a bioatividade dos extrativos varia com a oscilação qualitativa e quantitativa dos seus componentes químicos (ASTANI; REICHLING; SCHNITZLER, 2010).

Outra característica interessante dos metabólitos secundários que merece ser ressaltada é a sua grande complexidade química, uma vez que normalmente ocorrem nas plantas em forma de misturas com grande número de compostos. Por esse motivo, estas misturas complexas apresentam múltiplos mecanismos de ação (PANDEY; TRIPATHI; SINGH, 2018).

Devido às vantagens supracitadas, diversos extrativos vegetais já participam da formulação de inseticidas, medicamentos e cosméticos. Entretanto, nos últimos anos, um esforço considerável tem sido feito pela indústria e pelas universidades para dar continuidade à descoberta de recursos naturais com bioatividades efetivas visando a geração de produtos de interesse da sociedade (VICIOLLE; CASTILHO; ROSADO, 2012). Com base no exposto, as atividades biológicas dos produtos naturais despertam o interesse nos pesquisadores e estão sendo analisadas em escala global, como fontes potenciais para a geração de novos produtos bioativos (SCALERANDI et al., 2018).

1.2.7 Nanoemulsões

A nanotecnologia pode proporcionar diversas vantagens por meio da elaboração de formulações com compostos bioativos obtidos a partir de plantas, como o aumento da solubilidade, biodisponibilidade e biocompatibilidade, além do potencial de proteger os princípios bioativos da degradação física e química (SARAF, 2010). Dentre os sistemas nanoestruturados estão as nanoemulsões, que são sistemas compostos por duas fases imiscíveis estabilizadas com auxílio de tensoativos (SOLIMAN, 2017), evitando que a fase dispersa coalesça numa fase macroscópica (FIGUEIRAS; COIMBRA; VEIGA, 2014). De acordo com Galvão (2015), as nanoemulsões geralmente apresentam baixa viscosidade e os compostos bioativos encontram-se dissolvidos no núcleo oleoso do sistema nanoestruturado.

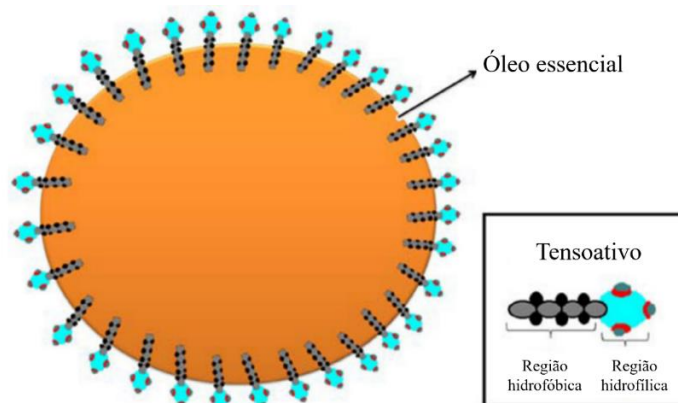
Conforme mencionado anteriormente, os OEs são constituídos por compostos voláteis e, portanto, podem evaporar e /ou degradar quando expostos ao calor, pressão, luz ou oxigênio. A emergente nanotecnologia pode possibilitar o aumento da estabilidade dos compostos bioativos de OEs, por meio da formação de sistemas em escala nanométrica. Estas formulações possuem grande área de superfície e devido a isto, são altamente eficientes para a aplicação de substâncias lipofílicas, como os OEs. Dessa forma, um nanopreparado pode potencializar as atividades biológicas e promover a liberação dos compostos ativos emulsionados de forma sustentada (BACCEGA et al., 2021; HOSSEINI et al., 2013).

Para o desenvolvimento de uma nanoemulsão necessita-se do emprego de energia, que na maioria das vezes é oriunda de dispositivos mecânicos ou do potencial químico dos próprios componentes. No primeiro caso, é necessário o uso de alta energia para alcançar uma taxa de cisalhamento capaz de deformar a partícula. Dentre os dispositivos mecânicos mais utilizados para esta finalidade, estão os homogeneizadores de alta pressão e geradores de ultrassom. Os métodos que utilizam alta energia destacam-se por fornecer menor tamanho de gotícula devido ao fluxo homogêneo de energia em menor tempo.

Dessa forma, os nanossistemas obtidos possuem capacidade de dissolver grandes quantidades de compostos hidrofóbicos, além de possuir a compatibilidade e a habilidade para proteger as moléculas bioativas de hidrólise e degradação enzimática (FIGUEIRAS; COIMBRA; VEIGA, 2014; KOURNIATIS et al., 2010; SOLANS et al., 2005). A Figura 1 ilustra uma partícula de nanoemulsão onde moléculas do tensoativo estão organizadas na interface óleo/água por meio de interações entre as regiões hidrofóbica (apolar) com o óleo (apolar) e hidrofílicas (polar) com a água (polar) (PIRES; MOURA, 2017).

Este tipo de sistema nanoestruturado possui diversas aplicações tecnológicas em relação às emulsões convencionais decorrentes de suas vantagens, como o pequeno tamanho das gotas, a alta estabilidade cinética e a transparência óptica (SOLANS et al., 2005). As nanoemulsões aumentam a biodisponibilidade dos componentes químicos e facilitam a permeação através das barreiras biológicas, mantendo a entrega controlada ao mesmo tempo em que reduzem a degradação dos compostos (DEVALAPALLY; CHAKILAM; AMIJI, 2007; SADURNÍ et al., 2005). Estas formulações são estáveis e transparentes ou translúcidas a olho nu, não formam sedimentos ou cremes, que são características interessantes para a aplicabilidade em diversas áreas (SOLANS et al., 2005).

Figura 1 – Ilustração de uma partícula de nanoemulsão e a interação entre as regiões hidrofóbica e hidrofílica.



Fonte: Pires; Moura, (adaptado) 2017.

Com relação à estabilidade das formulações, Solans et al. (2005) e Kourniatis et al. (2010) relatam que nanoemulsões com menor tamanho de gotícula possuem maior estabilidade contra sedimentação e/ ou formação de cremes, porque a taxa de difusão é maior em relação à taxa de sedimentação, induzida pela força da gravidade. As nanoemulsões devem apresentar um tamanho de gotícula entre 20 a 500 nm (SOLIMAN, 2017) ou entre 20 e 200 nm, conforme proposto por Jahromi et al. (2018). De acordo com pesquisas realizadas na literatura, não há uma convergência entre os pesquisadores sobre o tamanho de gotículas ideal, havendo uma pequena variação entre o tamanho ideal preconizado.

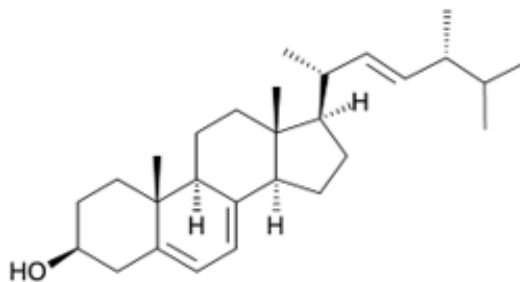
A verificação do índice de polidispersão é fundamental para analisar a estabilidade das formulações, uma vez que este parâmetro indica o comportamento monomodal do sistema (GALVÃO, 2015). De acordo com Gündel et al. (2019), um índice de polidispersão inferior a 0,3 indica uniformidade de tamanho de gotícula da nanoemulsão. O potencial zeta é outro

parâmetro importante na caracterização de nanogotículas, onde valores diferentes de zero indicam uma maior estabilidade do sistema (FLORES et al., 2011).

1.2.8 Ergosterol

O ergosterol ($C_{28}H_{44}O$) é um componente de membranas fúngicas, enquanto as células bacterianas, vegetais e animais são desprovidas deste composto (Figura 3) (TIAN et al., 2012; WEETE; ABRIL; BLACKWELL, 2010). Esta molécula é essencial para o crescimento e funcionamento normal das células fúngicas, atuando como um biorregulador de fluidez e na integridade da membrana celular, proporcionando a estabilidade de enzimas ligadas a ela, além de atuar na biogênese e na homeostase da membrana (BOMFIM et al., 2020; YANG et al., 2015). É um componente muito importante por ser o principal e único esteroide da membrana celular fúngica. Portanto, qualquer comprometimento no conteúdo de ergosterol pode alterar a homeostase e a integridade da membrana celular, que são fundamentais para o crescimento e funcionamento celular (CHELLAPPANDIAN et al., 2018).

Figura 3 - Fórmula estrutural do ergosterol.



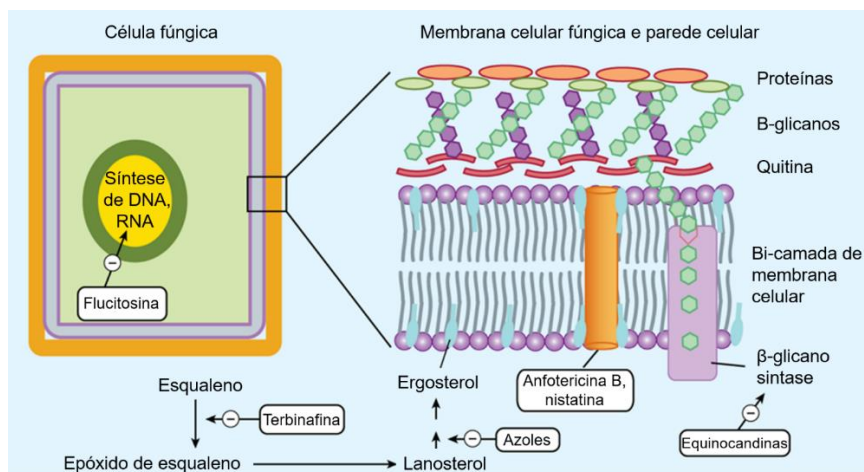
Fonte: o autor (2022).

O ergosterol é considerado um marcador adequado para estimar a biomassa fúngica em diferentes matrizes, como material vegetal (GUTAROWSKA; ŻAKOWSKA, 2010; POREP et al., 2014). O uso de substâncias químicas, sejam elas produzidas sinteticamente ou oriundas de plantas, para controlar o crescimento de fungos, pode acarretar alterações no conteúdo de ergosterol presente na membrana celular fúngica (DAS et al., 2019). Estas substâncias podem atuar ativamente na redução da atividade da lanosterol alfa desmetilase, que é uma enzima chave envolvida na biossíntese do ergosterol (WILLIAMS; LEWIS, 2011). A Figura 4 ilustra os alvos de medicamentos antifúngicos destinados a seres humanos, em que todos os

antifúngicos atualmente disponíveis têm como alvo a membrana celular fúngica ou a parede celular, exceto a flucitosina (KALAGATUR; MASTERS; TREVOR, 2012;).

Existem diversos estudos relatando que o uso de OEs inibe o crescimento de espécies fúngicas como *Fusarium* spp. (KALAGATUR et al., 2015), *Candida* spp. (YANG et al., 2015), *Aspergillus* spp. (BOMFIM et al., 2020; DAS et al., 2019) e fungos apodrecedores da madeira (PINHEIRO et al., 2021), por meio da perturbação do teor de ergosterol na membrana celular. Também existem relatos sobre o potencial dos OEs no controle do crescimento de fungos apodrecedores da madeira (LIN et al., 2020; MOUTAOUAFIQ et al., 2019). Entretanto, o mecanismo de ação antifúngico do OE de folhas de *P. gaudichaudianum* em fungos apodrecedores da madeira ainda não foi esclarecido.

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



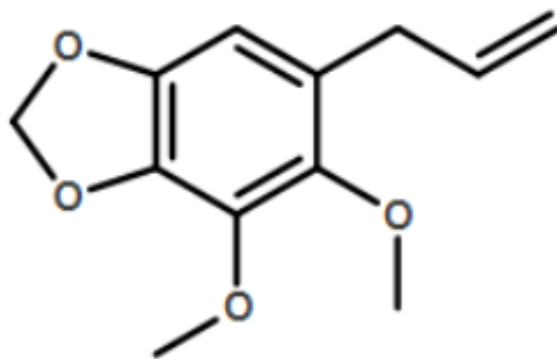
Fonte: Basic and Clinical Pharmacology, adaptado (2012).

Os compostos antifúngicos, incluindo EOs, podem inibir o crescimento celular de fungos, interrompendo a biossíntese de ergosterol, que afeta o crescimento e a proliferação celular (AHMAD et al., 2011). Os componentes dos OEs também podem atuar por solubilização dos componentes lipídicos das membranas fúngicas, ocasionando a formação de poros e interferindo assim com a permeabilidade seletiva da membrana (PARVEEN et al., 2004). Uma explicação para a ação de OEs frente a qualquer classe de espécies fúngicas é a sua natureza lipofílica e baixo peso molecular (PRAKASH et al., 2015). Graças a essas características, estes extrativos são capazes de causar danos estruturais e funcionais às células, interrompendo a permeabilidade da membrana e o equilíbrio osmótico das células (KALAGATUR et al., 2015).

1.2.9 Dilapiol

O constituinte químico majoritário do OE de folhas de *P. gaudichaudianum* avaliado nesta tese, o dilapiol ($C_{12}H_{14}O_4$), pertence a classe dos fenilpropanoides, e sua fórmula estrutural está ilustrada na Figura 5. A ocorrência concomitante dos compostos dilapiol e miristicina em alguns OEs é frequente porque o dilapiol resulta da metoxilação enzimática da miristicina (MAXIA et al., 2012). O dilapiol possui um anel aromático em sua estrutura, contendo uma porção metilenodioxibenzeno ou ortodiidroxibenzeno (BARROS et al., 2021).

Figura 5 - Fórmula estrutural do dilapiol.



Fonte: Schindler; Heinzmann, 2017.

De acordo com Fazolin et al. (2007), o dilapiol é um composto economicamente vantajoso para a indústria, por atuar como sinérgico em formulações agroquímicas. Adicionalmente, este composto é utilizado como matéria-prima para a preparação de derivados semissintéticos com ação frente a larvas adultas de *Aedes aegypti*, mosquito que transmite a dengue hemorrágica, além de possuir potencial larvicida (POHLIT et al., 2006).

Gomes et al. (2016) também relataram que este composto apresenta potencial sinérgico frente a mosquitos *A. aegypti* e *Anopheles albiparvus*, quando combinado com piretróides (GOMES et al., 2016). Adicionalmente, já foi relatada sua atividade inseticida frente ao besouro da batata (*Leptinotarsa decemlineata*) (LIU et al., 2014), além da ação como sinérgico de inseticidas naturais (TOMAR; MAHESHWARI; MUKERJEE, 1979). O dilapiol apresenta também atividade antifúngica frente ao fungo *Clinipellis perniciosus* (ALMEIDA et al., 2009), além de fungos filamentosos dermatófitos (MAXIA et al., 2012), *Aspergillus fumigatus* (FERREIRA et al., 2016) e também frente a alguns fungos apodrecedores da madeira (SCHINDLER, 2015).

Este composto também inibiu a biossíntese de aflotoxina em *Aspergillus parasiticus* (RAZZAGUI-ABYANEH et al., 2007), e possui ação antiparasitária (GAÍNZA et al., 2016) e antiprotozoária (PARISE-FILHO et al., 2012). De acordo com Barros et al. (2021), o dilapiol possui uma base estrutural química de origem natural que permite diversas alterações por meio de semissíntese, possibilitando a obtenção de novos compostos análogos ativos, com a possibilidade de apresentar uma maior eficácia em relação ao seu precursor.

1.3 HIPÓTESE

Sabendo-se da necessidade do desenvolvimento de preservantes da madeira de baixa toxicidade e a capacidade dos extrativos vegetais de controlar o crescimento de fungos apodrecedores da madeira, o potencial antifúngico e o modo de ação de compostos bioativos extraídos de plantas necessitam ser elucidados. Desta forma, a hipótese deste trabalho é que os extrativos vegetais obtidos a partir da espécie *P. gaudichaudianum* inibam satisfatoriamente o desenvolvimento dos fungos apodrecedores da madeira avaliados e que um de seus mecanismos de ação antifúngico seja esclarecido, para que se possa sugerir o desenvolvimento de um biopreservante da madeira como tratamento alternativo à indústria de preservação da madeira.

1.4 PROPOSIÇÃO

Este trabalho tem o objetivo de avaliar a atividade antifúngica de extrativos obtidos a partir de *P. gaudichaudianum* para controlar o crescimento de fungos apodrecedores da madeira.

Para isso, elencou-se os seguintes objetivos específicos:

- Coletar plantas adultas de *P. gaudichaudianum* em Santa Maria, separar as diferentes partes da planta (folhas e caules) e realizar o processamento pós-colheita adequado para cada situação;
- Coletar plantas adultas de *P. gaudichaudianum* em Vale Vêneto, separar as diferentes partes da planta (folhas, caules e raízes) e realizar o processamento pós-colheita adequado para cada parte da planta;
- Extrair e analisar quimicamente os OEs de folhas, caules e raízes de *P. gaudichaudianum*;
- Isolar o constituinte majoritário do OE de folhas de *P. gaudichaudianum* coletadas em Santa Maria;

- Avaliar a atividade antifúngica *in vitro* do OE de folhas de *P. gaudichaudianum* coletadas em Santa Maria, e de seu constituinte isolado frente a fungo causador de podridão-branca (*G. applanatum*) e parda (*L. lepideus*) na madeira;
- Verificar se o OE de folhas de *P. gaudichaudianum* e seu constituinte majoritário interferem no conteúdo de ergosterol na membrana fúngica dos fungos supracitados;
- Obter os extratos hexânico e etanólico de caules e raízes de *P. gaudichaudianum* coletados em Vale Vêneto;
- Avaliar a atividade antifúngica *in vitro* de extratos hexânico e etanólico de caules de *P. gaudichaudianum* frente aos fungos *G. applanatum* e *L. lepideus*;
- Determinar a atividade antifúngica *in vitro* de extratos hexânico e etanólico de raízes de *P. gaudichaudianum* frente a fungos apodrecedores da madeira mencionados acima;
- Analisar a composição química do OE de folhas e de caules de *P. gaudichaudianum* coletados em Vale Vêneto, visando otimizar o processo de extração;
- Analisar a composição química do OE de folhas de *P. gaudichaudianum* coletadas em Santa Maria e Vale Vêneto, para verificar se o local de coleta influencia na composição química;
- Desenvolver uma nanoemulsão a partir do pool de OE de folhas de *P. gaudichaudianum* coletadas em Santa Maria e Vale Vêneto;
- Avaliar a estabilidade da nanoemulsão do OE de folhas de *P. gaudichaudianum*.

1.5 MATERIAL E MÉTODOS

1.5.1 Obtenção dos extrativos vegetais

1.5.1.1 Coleta do material vegetal

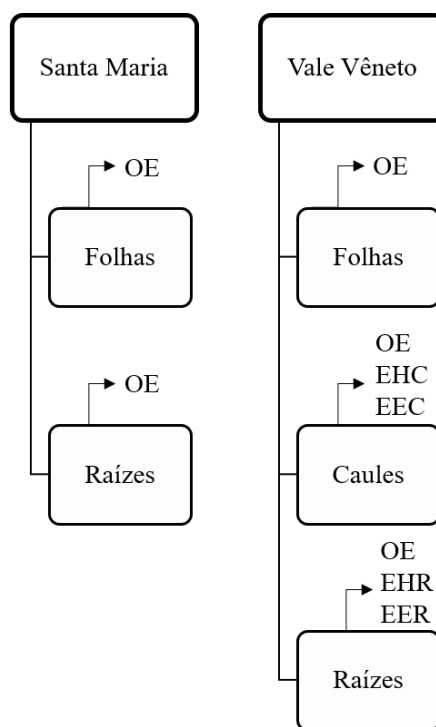
Para verificar se o local de coleta influencia na composição química do OE, o material vegetal de *P. gaudichaudianum* foi coletado em dois locais diferentes, sendo que todas as coletas ocorreram durante o verão. Em ambos os locais, foi coletado o material vegetal de plantas adultas. Dessa forma, as coletas foram efetuadas em Santa Maria e em São João do Polêsine, municípios do Rio Grande do Sul.

As primeiras coletas foram realizadas no município de Santa Maria – RS (29°40'11''S e 53°46'16''O), em uma área de floresta nativa, localizada nas proximidades da rodovia BR 158. Uma exsicata foi depositada no herbário do Departamento de Ciências Florestais da UFSM

(HDCF 7540). Neste caso, foram coletadas as folhas e raízes da planta (Fluxograma 1). Posteriormente, foi extraído o OE deste material vegetal, conforme descrito no item 1.5.1.4.

As coletas posteriores de *P. gaudichaudianum* aconteceram no distrito de Vale Vêneto (29°41'03''S e 53°31'37''O), pertencente ao município de São João do Polêsine – RS, a aproximadamente 48 km de distância de Santa Maria. Também foi produzido uma exsicata a qual foi depositada no herbário do Departamento de Ciências Florestais da UFSM (HDCF 7539). As coletas ocorreram em uma área de mata nativa, nas proximidades de um riacho. Neste caso, coletou-se folhas, caules e raízes de plantas adultas (Fluxograma 1). Este material vegetal foi utilizado para a obtenção de extratos hexânicos e etanólicos e de OE, conforme descrito nos itens 1.5.1.3 e 1.5.1.4, respectivamente.

Fluxograma 1 – Representação esquemática dos locais de coleta, das partes da planta coletadas em cada local e do extrativo vegetal obtido. Onde: OE: óleo essencial; EHC: extrato hexânico de caules; EEC: extrato etanólico de caules; EHR: extrato hexânico de raízes; EER: extrato etanólico de raízes.



Fonte: O autor (2022).

Em Vale Vêneto, coletou-se também os caules de *P. gaudichaudianum* para realizar um estudo comparativo entre a composição química do OE de folhas e caules da planta, visando otimizar o processo de extração. Dessa forma, se a composição química de folhas e caules da planta não diferir, será possível recomendar que seja feita a extração de toda a parte aérea da planta para o local estudado, acelerando o processo extrativo.

1.5.1.2 Processamento do material vegetal

O processamento do material vegetal foi realizado no Laboratório de Extrativos Vegetais (LABEVE), onde separou-se as folhas dos caules e das raízes, descartando-se as partes lesionadas ou atacadas por pragas. As folhas frescas foram acondicionadas em ambiente com temperatura controlada (aproximadamente 23°C) e submetidas a hidrodestilação imediatamente após a coleta.

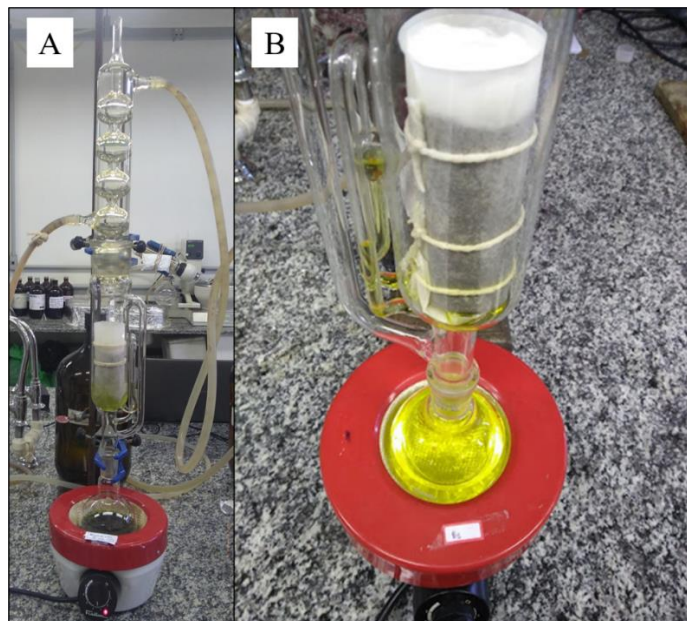
As raízes foram lavadas em água corrente, visando remover resíduos de solo e de matéria orgânica. Na sequência, foram secas em estufa com circulação e renovação de ar Marconi MAO35 a 45 °C durante 7 dias. Após este período, as raízes foram pulverizadas em moinho de facas tipo Willey Tecnal TE680, onde coletou-se o material que atravessou a peneira de 40 mesh. O material foi armazenado em ambiente refrigerado a aproximadamente 4 °C, até a obtenção dos extratos e do OE, de acordo com a metodologia descrita na sequência.

Com relação aos caules, estes permaneceram em ambiente com temperatura controlada (aproximadamente 23 °C) para que ocorresse a perda de umidade e estabilização, o que ocorreu com aproximadamente 15 dias. Após a moagem em moinho de facas tipo Willey Tecnal TE680, o pó que passou através da peneira de 40 mesh foi coletado e acondicionado em frascos vedados em ambiente refrigerado (aproximadamente 4 °C), até a obtenção dos extratos e do OE, de acordo com a metodologia descrita na sequência. A secagem em estufa e a moagem do material vegetal foi realizada no Laboratório de Produtos Florestais e Laboratório de Química da Madeira, ambos na UFSM.

1.5.1.3 Obtenção dos extratos vegetais

Para este procedimento, foram utilizados caules e raízes de *P. gaudichaudianum*. Realizou-se extração a quente por meio do aparelho tipo Soxhlet (Figura 6A). Para isso, o material vegetal seco e pulverizado foi acondicionado em cartuchos confeccionados com papel filtro (Figura 6B). Inicialmente, utilizou-se como solvente de extração o hexano, visando extrair os constituintes voláteis e mais apolares. Em seguida, após evaporar todo o solvente do cartucho em capela, foi feita a extração do mesmo material vegetal utilizando como solvente de extração o etanol, com o intuito de extrair as demais classes de substâncias. Em ambos os casos, os cartuchos foram extraídos sob refluxo até exaustão total do material vegetal (aproximadamente 12 horas de extração), e a proporção de solvente utilizada foi de 1:20 (material vegetal para solvente).

Figura 6 – Obtenção dos extratos com aparelho Soxhlet (A), com detalhe para cartucho contendo o material vegetal de *Piper gaudichaudianum* (B).



Fonte: o autor (2022).

Na sequência, as soluções extrativas foram filtradas em papel filtro e concentradas em evaporador rotatório Buchi R-210. O extrato obtido foi armazenado em dessecador até obter peso constante. Semanalmente, os balões foram pesados para verificar se a massa do extrato havia estabilizado. Para garantir que o dessecador estivesse livre de umidade, a sílica contida no fundo do recipiente foi seca em estufa a cada 30 dias, aproximadamente.

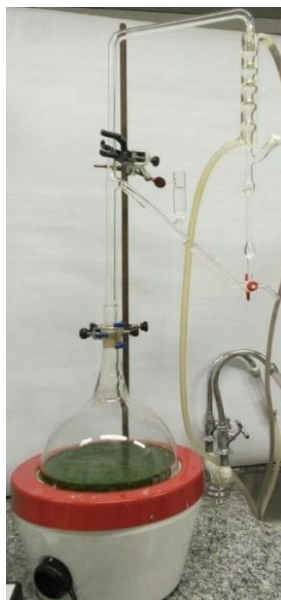
Após obter peso constante, os balões contendo os extratos hexânico e etanólico de caules e de raízes de *P. gaudichaudianum* foram raspados com o auxílio de espátulas, a fim de remover os extratos brutos secos. Estes foram transferidos para pequenos recipientes de vidro âmbar de massa conhecida, vedados e armazenados em dessecador até sua liofilização. Para assegurar que os extratos estivessem livres de solvente e umidade, estes foram liofilizados em um equipamento de bancada Terroni LS3000, no Núcleo Integrado de Desenvolvimento de Análises Laboratoriais - NIDAL, da UFSM.

1.5.1.4 Extração de óleos essenciais

Para a obtenção dos OEs, o material vegetal coletado foi moído em multiprocessador e submetido à hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger modificado (Figura 7), durante 3 horas (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2019). Todas as extrações foram realizadas em triplicata.

Como os OEs desta espécie apresentam densidade semelhante à da água, de aproximadamente $1,086 \text{ g mL}^{-1}$ (SCHINDLER, 2015), o extrativo se mistura ao hidrolato durante a extração.

Figura 7 – Hidrodestilação do óleo essencial de folhas de *Piper gaudichaudianum* utilizando o aparelho Clevenger.



Fonte: o autor (2022).

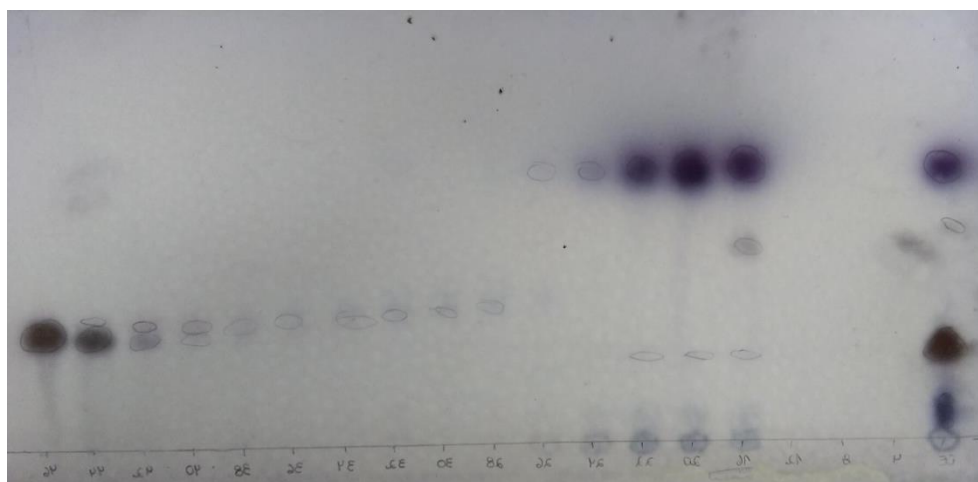
Portanto, para separar o OE da água, foi necessário realizar a extração líquido-líquido, com o auxílio de um funil de separação e hexano destilado como solvente. Em seguida, foi efetuada a secagem da fração hexânica com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) e enfim, o solvente foi evaporado em rotaevaporador Buchi R-210 a 30°C . Após a obtenção do OE, foi calculado seu rendimento de extração ($\% \text{ m mL}^{-1}$) e sua densidade (g mL^{-1}). Em seguida, o extrativo foi armazenado em frasco de vidro âmbar, vedado e conservado a -4°C , até a realização dos ensaios biológicos e análise química.

1.5.1.5 Fracionamento do óleo essencial

Para a obtenção do dilapiol, composto majoritário do OE de folhas de *P. gaudichaudianum*, realizou-se o fracionamento do extrativo por meio de duas colunas cromatográficas (CC), realizadas em sequência. Na primeira, 3,07 g do OE foram adicionados em CC (2,4 x 43 cm) contendo 308 g de gel de sílica 60 Macherey Nagel, 70-230 mesh e eluídos com hexano-acetato de etila (95:5 v/v), a um fluxo médio de 60 gotas min^{-1} ($1,4 \text{ mL min}^{-1}$). Cada fração coletada continha 15 mL e essas frações foram reunidas em cinco grupos

principais, com base no perfil em cromatografia em camada delgada (CCD) (Figura 8) e concentradas sob pressão reduzida em rotaevaporador Buchi R-210, a 30 °C. A CCD foi realizada em cromatofolhas de gel de sílica 60 F254 e as manchas foram detectadas por meio da vanilina sulfúrica - UV 365 nm.

Figura 8 – Ilustração do perfil em cromatografia em camada delgada do óleo essencial de *Piper gaudichaudianum*.



Fonte: o autor (2022).

Para a segunda CC, 1,7836 g de uma fração enriquecida com dilapiol, obtida na primeira CC, foi adicionada em CC (4,4 x 29 cm) contendo 179 g de sílica 60 e eluídos com hexano-acetona (97:3 v/v), a um fluxo médio de 34 gotas min^{-1} (0,9 mL min^{-1}). Foram coletadas frações de 20 mL, que foram agrupadas em cinco grupos principais, conforme descrito acima, sendo que a fração 2 (1,3973 g) correspondeu ao dilapiol.

1.5.2 Análise da composição química

1.5.2.1 Cromatografia gasosa

A composição química dos OEs e das frações voláteis dos extratos hexânicos foi determinada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM). Foi utilizado um sistema hifenado AGILENT 7890A, equipado com um detector seletivo de massas série 5075C (CG-EM). Para a análise de OE, uma alíquota de 2 μL de OE foi diluída em 1 mL de hexano (grau HPLC). No caso da análise de extrato hexânico, diluiu-se 1 mg do extrato em

1 mL de hexano (grau HPLC). Essa solução foi filtrada em um filtro PTFE (politetrafluoretileno) com o auxílio de uma seringa.

Para as análises, utilizou-se uma coluna capilar de sílica fundida DB5-MS (Hewlett Packard, 5% de fenil, 95% de metilsiloxano, 30 m x 0,25 mm, espessura de filme: 0,25 mm). Em relação aos parâmetros, a energia de ionização foi de 70 eV, a divisão de fluxo 1: 100 e o programa de temperatura foi o seguinte: 40 °C durante 4 min; 40 - 320 °C a 4 °C min⁻¹. O gás carreador foi o hélio, com taxa de fluxo de 1 mL min⁻¹. As temperaturas configuradas para injetor e detector foram de 150 °C e 280 °C, respectivamente. A identificação dos constituintes ocorreu por comparação dos seus índices de retenção, determinados por uma curva de calibração de n-alcenos injetados sob as mesmas condições cromatográficas das amostras, e dos padrões de fragmentação de massas com os mencionados na literatura (NIST, 2010; ADAMS, 2009).

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

1.5.2.2 Cromatografia líquida

As amostras dos extratos etanólicos foram analisadas em aparelho UPLC (*Ultra-Performance Liquid Chromatography*) acoplado a um detector DAD (*Diode Array Detector*) AGILENT 1200 infinity, equipado com bomba e injetor automático. Utilizou-se uma pré-coluna Poroshell 120 EC-C18 (3,0 x 5 mm; 2,7 nm) e uma coluna cromatográfica de fase reversa Poroshell 120 EC-C18 (4,6 x 50 mm; 2,7 µm). Os dados foram obtidos e analisados no *software* ChemStation (Hewlett Packard, Alemanha).

O método cromatográfico utilizado foi baseado na metodologia descrita na literatura (EVARISTO; LEITÃO, 2001), com algumas adaptações. A fase móvel consistiu em 1% (v/v) de ácido acético grau HPLC (Sigma-Aldrich®) em água ultrapura, com pH 4, ajustado com hidróxido de amônio (Fase A), e metanol grau HPLC Merck® (Fase B). As amostras foram diluídas na Fase A (1 mg mL⁻¹) e injetadas (5 µL) sob as seguintes condições cromatográficas: temperatura da coluna de 40 °C, fluxo de 1,2 mL min⁻¹, tempo total de análise de 45 min e pressão máxima de 400 bar. O gradiente de eluição dos solventes A e B está descrito na Tabela 1.

Tabela 1 – Gradiente de eluição dos solventes A e B nas análises dos extratos de *Piper gaudichaudianum* por UPLC.

Tempo (min)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0	100	0
5	90	10
10	80	20
15	70	30
20	50	50
25	30	70
30	20	80
35	10	90
40	0	100

Fonte: O autor (2022).

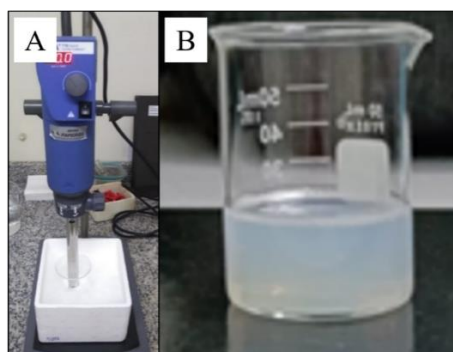
A identificação dos picos da amostra foi realizada utilizando os cromatogramas obtidos em cada injeção e comparados com os espectros de absorção e tempos de retenção dos padrões ou das substâncias de referência. A quantificação das substâncias identificadas foi realizada a partir de curvas analíticas, obtidas por meio de produtos comerciais ou compostos isolados por cromatografia em coluna, sob as mesmas condições cromatográficas. Os comprimentos de onda de detecção foram 250 e 280 nm.

1.5.3 Nanoemulsões

1.5.3.1 Preparo das nanoemulsões

As nanoemulsões foram preparadas no Laboratório de Nanotecnologia da Universidade Franciscana (UFN). As nanoemulsões contendo o OE de folhas de *P. gaudichaudianum* foram preparadas de acordo com metodologia proposta por Godoi et al. (2017), em colaboração com a Profa. Dra. Aline. Ferreira Ourique, da UFN. O método utilizado foi o de emulsificação sob alta energia, com o auxílio do equipamento Ultra-Turrax[®] (Figura 9). A concentração do OE na formulação foi de 0,75%, escolhida de acordo com o resultado dos testes de atividade antifúngica deste extrativo frente aos fungos apodrecedores da madeira avaliados neste estudo.

Figura 9 – Ilustração da nanoemulsão sendo preparada no equipamento Ultra-Turrax (A) e aspecto macroscópico da nanoemulsão contendo o óleo essencial de *Piper gaudichaudianum* após o preparo (B).



Fonte: o autor (2022).

A fase oleosa da formulação foi composta pelo OE de folhas de *P. gaudichaudianum* (0,75%) e monooleato de sorbitano (0,37%), e a fase aquosa foi composta por polissorbato 80 (0,37%) e água ultra-pura. As fases foram pesadas e homogeneizadas, separadamente, em um agitador magnético durante 10 min (Figura 10), sem aquecimento. A seguir, a fase aquosa foi submetida a alta agitação de 10.000 rpm em Ultra-Turrax durante 10 min. Após esse período, ainda sob agitação, a fase oleosa foi lentamente adicionada à fase aquosa e na sequência aumentou-se a agitação para 17.000 rpm, durante 1h15min.

Figura 10 – Homogeneização das fases aquosa (A) e orgânica (B), a serem usadas para a preparação da nanoemulsão do OE de *Piper gaudichaudianum*, em agitador magnético.



Fonte: o autor (2022).

O frasco onde a formulação estava acondicionada durante o preparo foi colocado em um banho com gelo, para evitar o aquecimento da formulação com a alta velocidade de agitação do sistema. O controle de temperatura durante o preparo do nanossistema é essencial para prevenir a degradação e/ ou volatilização dos compostos do OE das formulações. Após o preparo, as nanoemulsões foram submetidas à etapa de caracterização por meio da avaliação dos seguintes parâmetros: diâmetro médio de gotícula, índice de polidispersão, potencial zeta e pH, que serão apresentados a seguir. Para fins de análise comparativa, uma alíquota de OE de folhas de *P. gaudichaudianum* foi submetido às mesmas conduções de armazenamento que as nanoemulsões.

1.5.3.2 Caracterização das nanoemulsões

Para a caracterização das nanoemulsões, foram avaliados os parâmetros diâmetro médio de gotícula, índice de polidispersão, potencial zeta e o pH das formulações, de acordo com Godoi et al. (2017). A avaliação do diâmetro médio de gotícula e índice de polidispersão foi realizada utilizando a técnica de espalhamento de luz dinâmico, com o auxílio do aparelho Zetasizer (Zetasizer® nano-ZS modelo ZEN 3600, Malvern). Por meio desta técnica, foi possível aferir a difusão de partículas que se moviam sob movimento browniano e essa medida foi convertida tamanho e distribuição de tamanhos. Para a realização das leituras, as formulações foram diluídas 500x em água Milli-Q® previamente filtrada em membrana 0,45 µm. Na sequência, as soluções foram adicionadas em cubeta específica e as leituras foram realizadas em triplicata.

Para a determinação do potencial zeta, utilizou-se a técnica de Microeletroforese Doppler a laser por meio do equipamento Zetasizer (Zetasizer® nano-Zs modelo ZEN 3600, Malvern), que apresenta os resultados em milivolts (mV). Este equipamento aplica um campo elétrico a uma solução de moléculas ou a uma dispersão de partículas, que a partir de então irão se mover a uma velocidade relacionada ao seu potencial zeta. Por meio da técnica interferométrica a laser (espalhamento de luz com análise de fases), a leitura dessa velocidade é realizada. Dessa forma, é possível calcular a mobilidade eletroforética e, com este resultado, finalmente determinar o potencial zeta. Antes da realização das análises, as formulações foram diluídas 500x em uma solução de NaCl 10 mM previamente filtrada por membrana 0,45 µm. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Para a avaliação do pH das nanoemulsões, as leituras foram obtidas diretamente nas formulações com um potenciômetro previamente calibrado (DM-22, Digimed®). Todas as leituras foram realizadas em triplicata.

1.5.3.3 Análise da estabilidade da nanoemulsão

A estabilidade das formulações foi avaliada de acordo com preconizado por Godoi et al. (2017). Imediatamente após o preparo, as nanoemulsões foram caracterizadas e submetidas a diferentes condições de armazenamento: temperatura ambiente (25 °C), ambiente refrigerado (4 °C) e câmara climática (40 °C e 65% de umidade). Para fins de análise comparativa, o OE em uma diluição de 0,75% (OE livre) e alíquotas do OE de folhas de *P. gaudichaudianum* (OE puro) foram submetidas às mesmas condições de armazenamento que as nanoemulsões. O OE livre continha todos os reagentes utilizados para o desenvolvimento das nanoemulsões. Entretanto, não foram submetidos ao processo de nanoemulsão. As avaliações foram realizadas nos tempos 0, 7 e 15 dias após o preparo, e, em cada tempo, as nanoemulsões foram avaliadas quanto aos parâmetros de caracterização em cada condição de armazenamento, conforme descrito acima. As comparações para análise foram observadas com os dados obtidos no tempo zero.

1.5.3.4 Análise do óleo essencial da nanoemulsão

O OE de *P. gaudichaudianum* foi extraído das nanoemulsões e do grupo controle do OE diluído para a realização da análise química do extrativo incorporado na formulação, por CG (conforme descrito no item 1.5.2.1). Esta etapa foi desenvolvida a fim de verificar se houve alteração dos constituintes do OE. As extrações foram realizadas de acordo com metodologia proposta por Godoi et al. (2017). Dessa forma, foi realizada a extração das amostras concomitantemente à realização da avaliação de estabilidade, que estavam armazenadas nas 3 condições (temperatura ambiente, ambiente refrigerado e câmara climática) e em cada tempo de análise (0, 7 e 15 dias), em triplicata.

Para a extração do OE, uma alíquota de 100 µL de cada grupo foi transferida para frasco microvial e aquecidos a 50 °C por 15 min. A seguir, 1 mL de hexano foi adicionado e a solução foi submetida a vórtex por 1 min. Após, a solução foi centrifugada por 5 min a 10.000 rpm. As soluções foram analisadas por cromatografia gasosa, e comparadas à composição do OE puro utilizada para o desenvolvimento da formulação.

1.5.4 Avaliação da atividade antifúngica *in vitro*

1.5.4.1 Atividade antifúngica *in vitro* do óleo essencial e substância isolada

Os testes de inibição do crescimento micelial dos fungos apodrecedores da madeira foram realizados no Laboratório de Fitopatologia, do Departamento de Defesa Fitossanitária (CCR/UFSM). As cepas fúngicas foram fornecidas pelo Laboratório de Produtos Florestais, do Serviço Florestal Brasileiro. Todas as cepas foram depositadas no Herbário SMDB do Departamento de Biologia, UFSM.

A atividade antifúngica *in vitro* do OE de folhas de *P. gaudichaudianum* e do dilapiol foi avaliada frente aos fungos *Ganoderma applanatum* (SMDB 17.748) e *Lentinus lepideus* (SMDB 17.750). Utilizou-se a metodologia de diluição em meio BDA (batata-dextrose-ágar). As espécies fúngicas foram cultivadas em placas de Petri (9 cm de diâmetro) previamente esterilizadas com meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar). As placas permaneceram na câmara *Biochemical Oxygen Demand* (BOD) a 25 ± 1 °C em claro / escuro (12 h / 12 h) por aproximadamente 15 dias. Os fungos apodrecedores da madeira foram repicados 15 dias antes da realização de cada experimento, visando obter hifas em fase ativa de crescimento.

Para a avaliação da atividade antifúngica, em câmara de fluxo laminar, os extrativos foram previamente diluídos em etanol ($1,0 \mu\text{L mL}^{-1}$) e homogeneizados ao meio de cultura, que foi vertido para placas de Petri esterilizadas. Após a solidificação do meio, discos miceliais foram transferidos para centro de cada placa de Petri, que foram incubadas em estufa incubadora BOD Novatecnica NT 718, com temperatura de 25 ± 3 °C e fotoperíodo luz ajustado para 12 h / 12 h (claro/escuro) até o tratamento testemunha completar o crescimento nas placas (BADAWY; ABDELGALEIL, 2014).

O OE foi avaliado nas concentrações de 0,5, 1,0, 2,5, 5,0 e $7,5 \mu\text{L mL}^{-1}$, enquanto o dilapiol foi testado na concentração correspondente à porcentagem presente em $1,0 \mu\text{L mL}^{-1}$ ($0,7578 \mu\text{L mL}^{-1}$) e $2,0 \mu\text{L mL}^{-1}$ ($1,5156 \mu\text{L mL}^{-1}$) do extrativo. Avaliou-se também um tratamento testemunha (apenas BDA), um controle negativo ($1,0 \mu\text{L mL}^{-1}$ de etanol) e um controle positivo ($1,0 \mu\text{L mL}^{-1}$ de Propiconazole). Todos os tratamentos foram realizados em 3 repetições de 2 unidades experimentais cada (PINHEIRO et al., 2021). A avaliação foi realizada por meio de medições diametralmente opostas do micélio, realizadas a cada dois dias. A inibição do crescimento micelial causada pelo OE também foi analisada por análise probit (Finney, 1971) para cada espécie fúngica, visando obter os valores da concentração inibitória de 50% (IC50).

A porcentagem de inibição do crescimento micelial foi determinada por meio da fórmula % inibição = $[(C_T - C_t * 100) / C_T]$, onde C_T e C_t correspondem ao crescimento micelial no controle negativo e no tratamento, respectivamente (BADAWY; ABDELGALEIL, 2014). Também foi calculado o índice de crescimento micelial (ICM), determinado por meio da fórmula adaptado de Oliveira (1991): $ICM = [(C_1/N_1) + (C_2/N_2) + \dots + (C_n/N_n)]$, sendo C_1, C_2, C_n = crescimento micelial do fungo na 1^a, 2^a e última avaliação; N_1, N_2, N_n = número de dias após a inoculação.

1.5.4.2 Atividade antifúngica *in vitro* dos extratos vegetais

Para a avaliação da atividade antifúngica do extrato hexânico de raízes (EHR), extrato etanólico de raízes (EER), extrato hexânico de caules (EHC) e extrato etanólico de caules (EEC), utilizou-se o mesmo método descrito anteriormente. Os extratos foram diluídos em 5 mL de uma solução aquosa composta por etanol (12,0%), acetona (0,020%) e tween 20 (0,020%). Desta maneira, os extratos foram avaliados separadamente, nas concentrações de 1,25, 2,50 e 5,00 mg mL⁻¹. As soluções foram agitadas em vórtex por 5 min, para homogeneizar os extratos aos diluentes. Como controle negativo, utilizou-se a solução aquosa utilizada para diluir os extratos, enquanto que o controle positivo foi composto pelo fungicida Propiconazole a 1,4 mg mL⁻¹. A atividade antifúngica foi avaliada frente aos fungos *G. applanatum* e *L. lepideus*, conforme descrito no item anterior.

1.5.4.3 Determinação do conteúdo de ergosterol

Para a realização deste teste, os fungos foram cultivados em presença de OE e seu constituinte majoritário isolado em concentrações que afetaram seu crescimento apenas parcialmente. Portanto, o extrativo e o dilapiol foram diluídos em etanol (1,0 µL mL⁻¹) e testados após sua incorporação ao meio de cultura nas concentrações de 1,0 e 0,7578 µL mL⁻¹, respectivamente. O composto majoritário foi avaliado a uma concentração correspondente ao teor presente em 1,0 µL mL⁻¹ de OE. Um controle negativo contendo apenas etanol na concentração utilizada como diluente também foi avaliado.

Os tratamentos foram adicionados em meio BDA líquido e vertidos em placas de Petri. Após a solidificação do meio, membranas de celofane esterilizadas (Figura 11) foram transferidas para cada placa de Petri, segundo método adaptado de Bento et al. (2014). Sobre essas membranas, discos miceliais (11 mm de diâmetro) foram inoculados e o crescimento dos

fungos foi avaliado, em triplicata. As placas foram incubadas em câmara BOD Novatecnica NT 718 a 25 ± 3 °C nas mesmas condições mencionadas anteriormente, por aproximadamente 5 dias (PINHEIRO et al., 2020).

Figura 11 – Membrana de celofane disposta sobre o meio de cultura onde foi cultivado o fungo *Lentinus lepideus*.



Fonte: o autor (2022).

Na sequência, o micélio de cada placa foi coletado, transferido para tubos de ensaio e suas massas úmidas foram determinadas. Posteriormente, foi feita a avaliação dos efeitos dos extrativos sobre o conteúdo de ergosterol da espécie fúngica, segundo método adaptado de Bento et al. (2014), Tian et al. (2012) e Arthington-Skaggs et al. (1999) e recentemente descrito por Pinheiro et al. (2020). Para isso, 5 mL de solução hidróxido de potássio alcoólico a 25%, preparada no dia do experimento, foram transferidos para tubos de ensaio contendo o micélio. O conteúdo dos tubos foi agitado em vórtex (Fisatom 772, 60 Hz, 30 W) por 2 min (Figura 12). Em seguida, os tubos foram incubados a 85 °C pelo período de 4 h. Após, 2 mL de água destilada estéril e 5 mL de *n*-heptano foram adicionados a cada tubo, submetendo seu conteúdo ao ultrassom (Ultra Cleaner 1450A), onde permaneceram por 1 min, seguido de agitação em vórtex por mais 1 min.

Figura 12 – Agitação dos tubos contendo o micélio em vórtex.



Fonte: o autor (2022).

As camadas orgânicas (de *n*-heptano) e aquosa foram separadas em funis de separação, deixando as fases orgânica e aquosa em repouso por 1 h à temperatura ambiente, para sua completa separação (Figura 13). A camada de *n*-heptano foi coletada e analisada por espectrofotometria (Espectrofotômetro - UV 1100 Macy IL-593-S) entre os comprimentos de onda de 230 e 300 nm. Um tratamento branco contendo apenas *n*-heptano também foi considerado.

Figura 13 – Separação da camada de *n*-heptano, contendo o ergosterol da membrana do fungo, da camada aquosa em funil de separação.

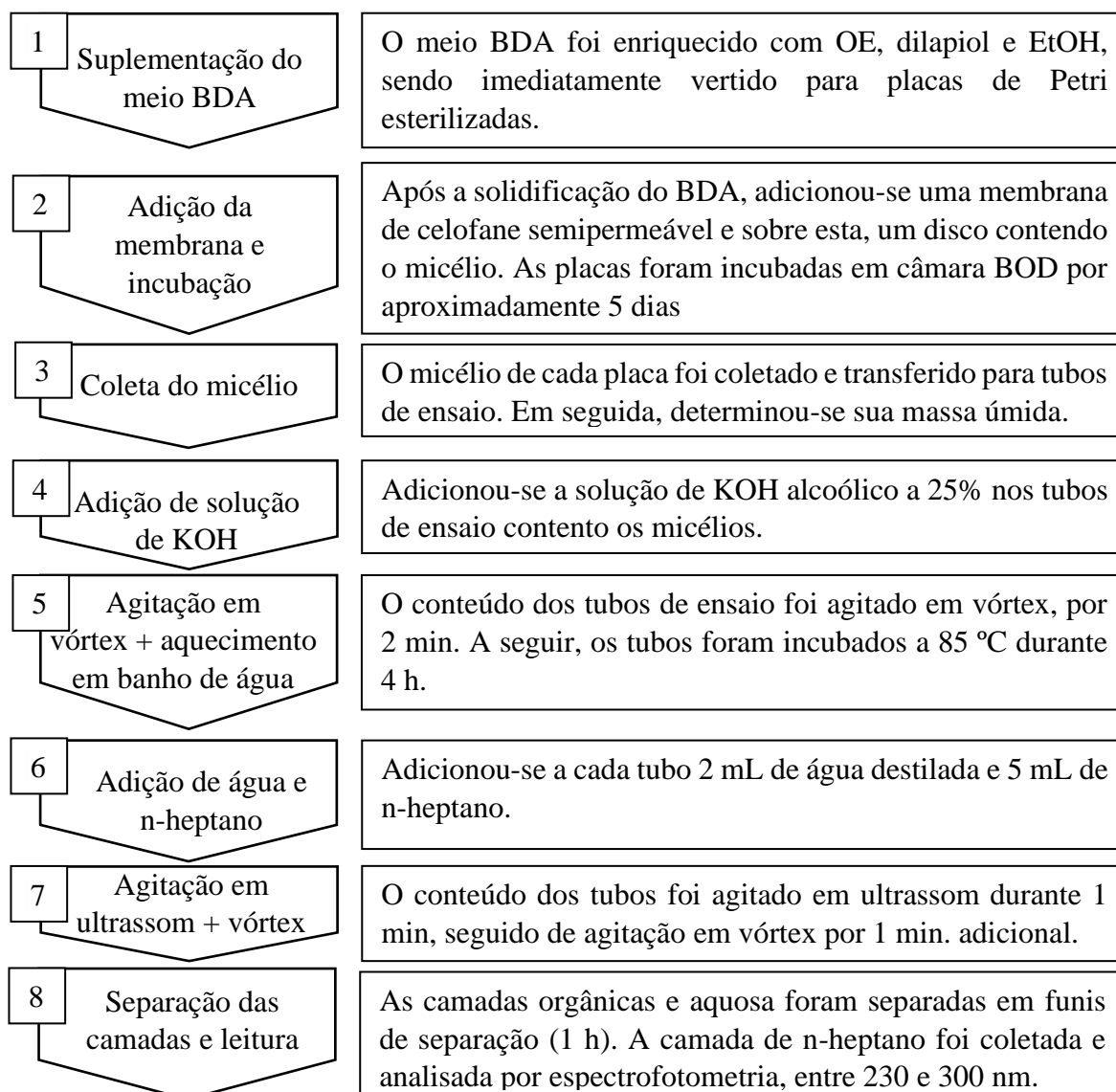


Fonte: o autor (2022).

Para o cálculo da quantidade de ergosterol foram utilizadas fórmulas adaptadas descritas por Tian et al. (2012): % 24(28) dehidroergosterol= (A230/518)/ massa úmida micelial; % ergosterol + %24(28) dehidroergosterol= (A282/290)/ massa úmida micelial. Para essas fórmulas, 290 e 518 são considerados valores de E (%/cm) para o ergosterol cristalino e o 24(28) dehidroergosterol, respectivamente.

Após a determinação espectrofotométrica entre 230 e 300 nm e utilização das mesmas fórmulas já descritas para o cálculo da quantidade de ergosterol, a porcentagem de redução da quantidade de ergosterol na espécie foi calculada seguindo fórmula de Kedia et al. (2014): (C - T)/ C x 100, onde C e T são considerados os percentuais de ergosterol verificadas no controle e no tratamento, respectivamente. A metodologia deste experimento encontra-se resumida no Fluxograma 2.

Fluxograma 2 – Representação esquemática da metodologia do ergosterol.



Fonte: O autor (2022).

1.5.5 Análise estatística

Os dados foram submetidos a testes de normalidade e homogeneidade de variâncias. Quando os dados não atingiram aos pressupostos, foram analisados por meio do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis e o teste de Mann-Whitney. Todos os dados são relatados como média \pm desvio padrão. As análises foram realizadas utilizando o *software* GraphPad Prism 6.0. A variabilidade da composição química dos OEs foi obtida por análise Cluster e a Análise de Componentes Principais, pelo *software* Past 4.0. Os resultados das nanoemulsões foram examinados por análise de variância de uma via (ANOVA) seguido de pós-teste de Dunnet,

utilizando o *software* GraphPad Prism 6.0. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

2 MANUSCRITO 1 Antifungal activity of *Piper gaudichaudianum* Kunth essential oil and ergosterol content of wood rot fungi

Nadia Helena Bianchini^a, Bibiana Fontana Batista^a, Carlos Garrido Pinheiro^a, Guilherme Elias Andrade^b, Alana Silveira Pavlack^b; Fernando Nunes Gouveia^c, Marlove Fátima Brião de Muniz^{a,e}, Berta Maria Heinzmann^{a,f}

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

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

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

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

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

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

Antifungal activity of *Piper gaudichaudianum* Kunth essential oil and ergosterol content of wood rot fungi

ABSTRACT

The search for alternative methods to preserve wood has been stimulated due to the high toxicity of conventional preservative products, and the use of natural products appears as an ecologically accepted alternative. The aim of this study was to evaluate the *in vitro* antifungal activity of the leaves EO of *Piper gaudichaudianum* Kunth and its major compound dillapiole against the fungi that cause white-rot (*Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat.) and brown-rot (*Lentinus lepideus* (Fr.) Fr.) in wood, and possible effects of these extractives on ergosterol content in the fungi plasma membrane. The EO was evaluated in concentrations ranging from 0.5 to 7.5 $\mu\text{L mL}^{-1}$, while for dillapiole the concentration tested corresponded to the amount present in 1.0 and 2.0 mL EO. In order to explain the observed activities, the EO had its chemical composition determined by gas chromatography, and its major component was isolated by column chromatography. The extractive major components were dillapiole (82.62%), α -caryophyllene (4.84%), germacrene B (4.17%) and β -caryophyllene (1.80%). The EO showed antifungal activity against white and brown-rot fungi evaluated, where *L. lepideus* was more sensitive to the effect of extractives, since a fungicidal effect was observed. Additionally, the results indicate highest mycelial growth inhibition of fungi induced by dillapiole than the EO at concentration proportional to the presence in EO ($P < 0.05$). Moreover, the EO and its major component caused a decrease in ergosterol content in mycelia of both fungal species. In this context, the plasma membrane is an important antifungal target of *P. gaudichaudianum* EO and dillapiole on the evaluated fungal species.

Keywords: Piperaceae; Natural products; Dillapiole; Wood preservative; Mode of action

1 INTRODUCTION

The wood decay fungi play an important role in nutrient cycling in nature, mainly in the forest ecosystems, however, they are responsible for a large portion of the economic losses in the lumber industry (PASTORELLI et al., 2020). Among these fungal species the Basidiomycete class deserves to be highlighted, having as representatives the species that cause white and brown-rot in wood (OLIVEIRA et al., 2005). According to Stangerlin et al. (2013), the wood decay fungi have specific enzymatic characteristics regarding the degradation of the wood chemical constituents.

Currently, the wood preservation industry has mastered techniques that are efficient to control these xylophagous organisms through different chemical preservatives. However, these preservatives often have toxic substances in their composition, affecting the health of humans and animals, and the environment (AUGUSTSSON et al., 2017). Therefore, the use of

formulations such as pentachlorophenol, creosote, and copper chromium arsenate have been highly restricted or banned in recent decades (HU et al., 2017).

The societal demand about to the use of non-toxic and renewable resources leads to the development of sustainable alternatives in materials and energy production, by generating less toxic waste and preserving the environment (CHEN et al., 2017). Based on that, natural products as plant extractives appear as a potentially active and environmentally safe alternative to replace the use of highly toxic synthetic preservatives. Several plant secondary metabolites have been found to be active against wood decay fungi, mainly essential oils (EOs) (XIE et al., 2017).

Essential oils are complex mixtures of various low molecular weight volatile compounds produced by glandular trichomes and other secretory structures, and they have been widely used because of their biological activities (SHARIFI-RAD et al., 2017). Among the essential oil-producing species is *Piper gaudichaudianum* Kunth (Piperaceae), occurring in Paraguay, Argentina and Brazil, where it has a wide geographical distribution (SOBRAL et al., 2013). Several biological activities have been described for this species, such antifungal (LAGO et al., 2004), larvicide (BATISTA et al., 2011; MORAIS et al., 2007; RAPADO et al., 2014), anti-inflammatory (FINATO et al., 2018), antimicrobial (PUHL et al., 2011; SILVA et al., 2019) and cytotoxic effects (SPEROTTO et al., 2013). However, the antifungal mechanism of action of *P. gaudichaudianum* EO in wood-decay fungi is not yet understood.

Considering the importance of searching for new substances with antifungal activity to provide alternatives to control wood decay fungi, this study was performed to investigate the antifungal potential of *P. gaudichaudianum* leaves EO and its major compound against the white-rot fungi *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat. and the brown-rot representative *Lentinus lepideus* (Fr.) Fr. Additionally, the possible effects of these extractives on ergosterol content in the fungal plasma membrane were evaluated.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 PLANT MATERIAL

Fresh leaves of *P. gaudichaudianum* were collected in a fragment of native forest in Santa Maria, southern Brazil (29°40'11''S and 53°46'16''W). A voucher specimen was deposited at the Herbarium of the Department of Forest Sciences of Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil (HDCF 7540). Samples were collected during summer,

once it is the season where the EO has a higher content of dillapiole (SCHINDLER; HEINZMANN, 2017).

2.2 ESSENTIAL OIL EXTRACTION

The collected leaves were fragmented in a multiprocessor and subjected to hydrodistillation in a modified Clevenger apparatus for 3 hours. All extractions were performed in triplicate. The obtained hydrolate was subjected to liquid-liquid extraction, using distilled hexane as solvent. The hexane fraction was dried with anhydrous sodium sulfate (Na_2SO_4) and evaporated in a rotary evaporator Buchi R-210 at 30 °C. Then, the yield ($\% \text{ m m}^{-1}$) and density (g mL^{-1}) were calculated. The obtained EO was stored in an amber glass bottle, sealed and kept at - 4 °C until the biological tests were carried out.

2.3 ISOLATION OF EO MAJOR COMPOUND

Two chromatography columns (CC) were performed to fractionate the EO aiming to isolate dillapiole. In the first CC, 3.07 g EO were added to 308 g of silica gel 60 (2.4 x 43 cm) and eluted with hexane:ethyl acetate (95:5 v/v) at 1.4 mL min^{-1} . Fractions of 15 mL were gathered in five main fractions based on thin layer chromatography (TLC) profile and concentrated under reduced pressure at 40 °C. The TLC analyses were carried out on silica gel 60 F254 sheets and the spots were detected by vanillin sulfuric acid-UV 365 nm. Fraction 3 (1.78 g) was submitted to a second CC (4.4 x 29 cm, 179 g silica gel 60), eluted with hexane-acetone 97:3 at 0.9 mL min^{-1} . Among the five fractions obtained (20 mL each), the fraction 2 (1.39 g) was identified as dillapiole.

2.4 CHEMICAL CHARACTERIZATION

The chemical composition was determined by an Agilent 7890A gas chromatograph coupled to a 5075C mass spectrometer (GC-MS) using a non-polar DB5-MS capillary column (Hewlett Packard, 5% phenylmethylsiloxane, 30 m x 0.25 mm i.d. x 0.25 μm film thickness), and electron ionization mode at 70 eV. The carrier gas was helium (1.0 mL \cdot min^{-1}); injector and detector temperatures were set at 150 °C and 280 °C, respectively. The samples were injected in split inlet mode (ratio 1:100). Oven program: 40 °C - 320 °C at 4 °C \cdot min^{-1} .

The compounds identification was based on the comparison of retention indices calculated by linear interpolation to retention times of an *n*-alkane series and of their mass spectra with authentic samples and with literature data (ADAMS, 2009; NIST, 2010). Relative

amounts of the components were calculated based on GC peak areas, by gas chromatography with a flame ionization detector (GC-FID). Analysis parameters were the same as mentioned above, with exception of split ratio (1:50) and both injector and detector temperatures (300 °C).

2.5 ANTIFUNGAL ACTIVITY BIOASSAY

The fungal strains used in tests were provided by Forest Products Laboratory, Brazilian Forest Service, DF, Brazil. All fungi strains were deposited at the Herbarium SMDB of the Biology Department, Universidade Federal de Santa Maria, Brazil. *Ganoderma applanatum* (SMDB 17.748) was the white-rot fungi selected, whereas *L. lepideus* (SMDB 17.750) was the brown-rot representative. The fungal species were cultivated in Petri dishes (9 cm of diameter) with PDA (potato-dextrose-agar) culture medium. The plates remained in BOD (*Biochemical Oxygen Demand*) chamber at $25 \pm 1^\circ\text{C}$ in light/dark (12 h/12 h) for 15 days, approximately.

The PDA medium was supplemented with EO at concentrations of 0.5, 1.0, 2.5, 5.0 and $7.5 \mu\text{L mL}^{-1}$, while dillapiole was tested at the concentration corresponding to the percentage present in $1.0 \mu\text{L mL}^{-1}$ ($0.7578 \mu\text{L mL}^{-1}$) and $2.0 \mu\text{L mL}^{-1}$ ($1.5156 \mu\text{L mL}^{-1}$) EO. The extractives were previously diluted in ethanol ($1.0 \mu\text{L mL}^{-1}$) and then the PDA medium was supplemented with the extractives and poured to the sterile Petri dishes. An absolute control and a negative control containing only ethanol ($1.0 \mu\text{L mL}^{-1}$) were also considered. For the positive control, the fungicide propiconazole at $1.0 \mu\text{L mL}^{-1}$ was used. Mycelial discs (11 mm diameter) were then transferred aseptically to the center of the plates and incubated in BOD at $25 \pm 1^\circ\text{C}$ in 12 h-photoperiod, until the control treatment mycelium reaches the border of the dish (PINHEIRO et al., 2021). All assays were carried out in 3 replicates of 2 experimental units each.

The mycelial growth inhibition caused by the EO was analyzed by probit analysis (FINNEY, 1971), for each fungal species to obtain the 50% inhibitory concentration (IC_{50}) values. The growth of the fungal colony was obtained by an average of two perpendicular measurements performed every 2 days. Mycelial growth inhibition (%) was calculated by the Eq. 1. (BADAWY & ABDELGALEIL, 2014) and Speed Index of Mycelial Growth (SIMG) was calculated using the Eq. 2 (BARBOSA et al., 2015).

$$\text{Growth inhibition (\%)} = [(D_C - D_T) / D_C] \times 100 \quad (1)$$

Where: “ D_C ” and “ D_T ” - average diameters of fungal mycelia of negative control and treatment, respectively.

$$\text{SIMG} = (d_1/n_1 + d_2/n_2 + d_n/n_n) \quad (2)$$

Where: “n” - number of days after the start of the experiment; “d_i” - average diameters of fungal colony (mm).

Additionally, when the extractives completely inhibited fungal growth, and additional test was performed aiming to verify whether a fungicidal or fungistatic action occurred. For this, the same mycelial disk was transferred to a petri dish containing only fresh PDA medium. Thus, if the fungus grows again there was a fungistatic action, whereas if there is no growth a fungicidal activity was detected (KEDIA et al., 2014).

2.6 EFFECTS OF EXTRATIVES ON ERGOSTEROL CONTENT OF FUNGAL PLASMA MEMBRANE

The effects of the EO and dillapiole on the plasma membrane ergosterol content of *L. lepideus* and *G. applanatum* were detected according Pinheiro et al. (2020). Mycelial discs (11 mm diameter) were transferred aseptically to the center of the Petri plates containing PDA supplemented with EO at 1.0 $\mu\text{L mL}^{-1}$ and dillapiole at 0,7578 $\mu\text{L mL}^{-1}$, equivalent concentration to that detected in EO at 1.0 $\mu\text{L mL}^{-1}$. The EO and the dillapiole were previously diluted in ethanol (1 $\mu\text{L mL}^{-1}$). A negative control was also considered, containing only PDA and ethanol. All assays were carried out in triplicate.

After 4 days of incubation in BOD at the conditions above described, the fungal mycelia were harvested and transferred to test tubes. After determining the wet weight, a solution of 25% alcoholic potassium hydroxide was added to each test tube, followed by the addition of sterile distilled water and *n*-heptane. After the layers separation of each tube, the *n*-heptane one was collected and analyzed by scanned spectrophotometry KASUAKY IL-593-S between 230 and 300 nm. The readings at 282 nm corresponded to ergosterol, and at 230 and 282 nm showed the presence of the late sterol intermediate 24(28) dehydroergosterol (TIAN et al., 2012).

The ergosterol content was calculated as a percentage of the mycelium wet weight, according Eq. 3 and Eq. 4 (TIAN et al., 2012). The inhibition of ergosterol content was calculated as Eq. 5 (KEDIA et al., 2014).

$$\% \text{ 24(28) dehydroergosterol} = (A_{230}/518)/\text{mycelia wet wt} \quad (3)$$

$$\% \text{ ergosterol} + \% \text{ 24(28) dehydroergosterol} = (A_{282}/290)/\text{mycelia wet wt} \quad (4)$$

Where: 290 and 518 - E values (in $\% \text{ cm}^{-1}$) determined for crystalline ergosterol and 24(28) dehydroergosterol, respectively; mycelium weight - net wet weight (g).

$$\text{ergosterol inhibition} = (C - T)/C \times 100 \quad (5)$$

Where: “C” - percentage of ergosterol in the negative control set; “T” - percentage ergosterol in the treatment set.

2.7 STATISTICAL ANALYSIS

The data were submitted to homogeneity of variances and normality tests. Since the data did not fit the assumptions, the non-parametric Kruskal-Wallis test and Mann-Whitney test were chosen. All data are reported as means \pm standard deviations. The analysis was performed using GraphPad Prism 6.0 software. A significant difference was considered at a level of $P < 0.05$.

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 CHEMICAL CHARACTERIZATION OF ESSENTIAL OIL

The *P. gaudichaudianum* EO showed a yield of $1.7917 \pm 0.1489\%$ and density of $0.9956 \pm 0.0085 \text{ g mL}^{-1}$. The chemical analysis led to the identification of 14 components, representing 98.39% of the total composition (Table 1). The major compounds detected were dillapiole (82.62%), α -caryophyllene (4.84%), germacrene B (4.17%), β -caryophyllene (1.80%) and α -muurolene (1.58%).

Previous report showed the phenylpropanoid dillapiole as the main component of the EO extracted from *P. gaudichaudianum* leaves, in analyzes performed in all seasons (SCHINDLER; HEINZMANN, 2017). These authors described as major compounds: dillapiole (63.6 - 69.2%); α -humulene (9.6 - 11.8%); germacrene B (4.4 - 6.9%); ishwarene (1.3 - 5.0) and β -caryophyllene (3.5 - 4.0%). The highest dillapiole content found in the study occurred in summer (69.2%).

Other works reported different compounds as the major ones in the species EO. Sperotto et al. (2013) described as major component *E*-nerolidol (22.06%). On the other hand, Andrade et al. (1998) verified as major EO compound α -selinene (8.9 - 16.6%) and, according to Péres et al. (2009), the major compounds found in the species EO was *E*-nerolidol (22.4%).

Table 1. Chemical composition of the essential oil extracted from *Piper gaudichaudianum* Kunth fresh leaves.

Peak	RT	KI ^C	KI ^T	Compound	Class	%
1	27.49	1366	1375	α -Copaene	Sesquiterpene	0.13%
2	28.90	1424	1425	β -Caryophyllene	Sesquiterpene	1.80%
3	29.49	1443	1440	Aromadendrene	Sesquiterpene	0.53%
4	30.04	1461	1462	α -Caryophyllene	Sesquiterpene	4.84%
5	30.46	1474	1474	α -Muurolene	Sesquiterpene	1.58%
6	30.83	1486	1485	Germacrene D	Sesquiterpene	0.14%
7	31.07	1494	1493	α -Selinene	Sesquiterpene	0.17%
8	31.28	1500	1500	Germacrene B	Sesquiterpene	4.17%
9	31.51	1508	1505	δ -Cadinene	Sesquiterpene	0.51%
10	32.80	1552	1554	Elemicin	Phenylpropene	0.15%
11	33.24	1566	1565	Nerolidol	Sesquiterpene alcohol	0.67%
12	33.71	1582	1582	Caryophyllene oxide	Oxygenated sesquiterpene	0.65%
13	34.69	1616	1610	Humulene epoxide II	Oxygenated sesquiterpene	0.45%
14	34.97	1626	1625	Dillapiole	Phenylpropanoid	82.62%
Total percentage of identification						98.39%

Compounds are listed in order of elution on HP₅-MS column. RT: retention time; KI^C: calculated Kovats index; KI^T: tabulated Kovats index.

Source: the authors

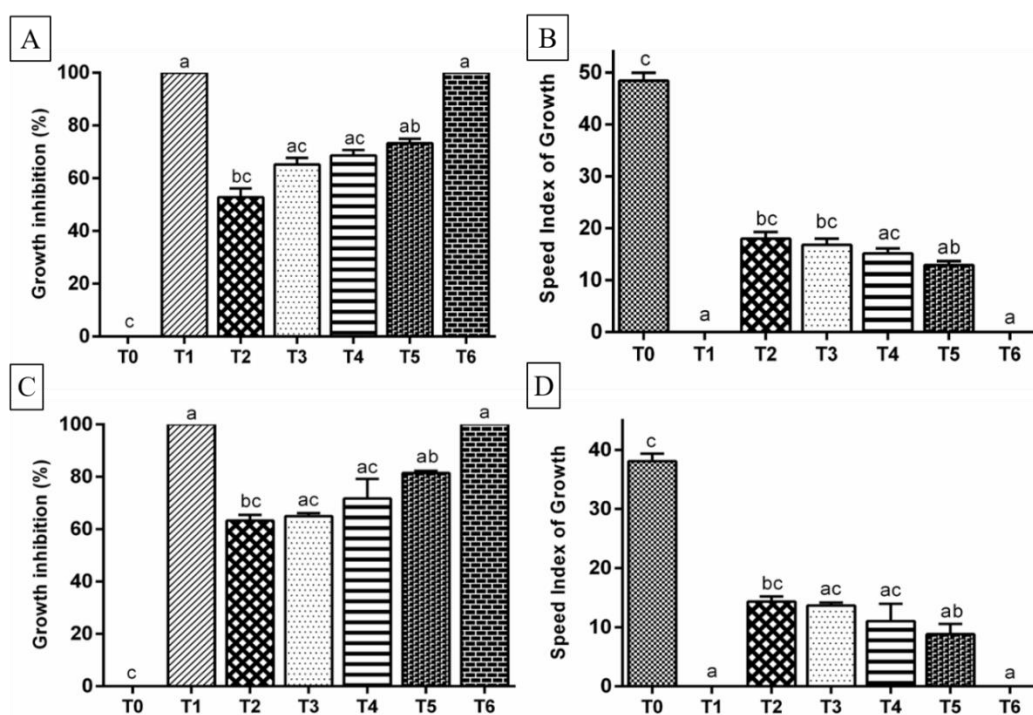
Since the EO studied by Schindler; Heinzmann (2017) was obtained from leaves collected from the same population, the differences evidenced in the chemical composition might be due to factors related to plant genetic (plant genotype) and other external environmental factors, such as climatic conditions, temperature and water availability (BOMFIM et al., 2020; SHARIFI-RAD et al., 2017). The different places of collection may influence the diversities found in the EO compositions reported in the studies. In Santa Maria – RS, dillapiole was the major compound of the EO (SCHINDLER; HEINZMANN, 2017), while in Riozinho – RS, the main EO component was *E*-nerolidol (PÉRES et al., 2009; SPEROTTO et al., 2013). In São Paulo – SP, α -selinene was the major compound of the EO (ANDRADE et al., 1998).

3.2 ANTIFUNGAL ACTIVITY

Concerning the mycelial growth inhibition of the wood decay fungi, the EO treatments above 1.0 $\mu\text{L mL}^{-1}$ did not differ from positive control in both fungal species tested (Figure 1 A,C). Although the EO at the highest concentration (T6) has completely inhibited the growth

of both species, the most susceptible was *L. lepideus* (Figure 1C) once the extractive induced a fungicidal effect only against these brown-rot fungi. However, for the treatments T₃ and T₄ in both white-rot and the brown-rot fungi the EO showed an intermediate activity, once the fungal growth did not differ from both controls. Considering the lowest EO concentration tested (T₂), the growth inhibition results showed values above 50% for both species (Figure 2).

Figure 1 – *In vitro* mycelial growth inhibition and *in vitro* Speed Index of Mycelial Growth of *Ganoderma applanatum* (A, B) and *Lentinus lepideus* (C, D) under the effects of *Piper gaudichaudianum* essential oil (EO). Where: T₀ = negative control; T₁ = positive control; T₂ = 0.5 $\mu\text{L mL}^{-1}$; T₃ = 1.0 $\mu\text{L mL}^{-1}$; T₄ = 2.5 $\mu\text{L mL}^{-1}$; T₅ = 5.0 $\mu\text{L mL}^{-1}$; T₆ = 7.5 $\mu\text{L mL}^{-1}$.

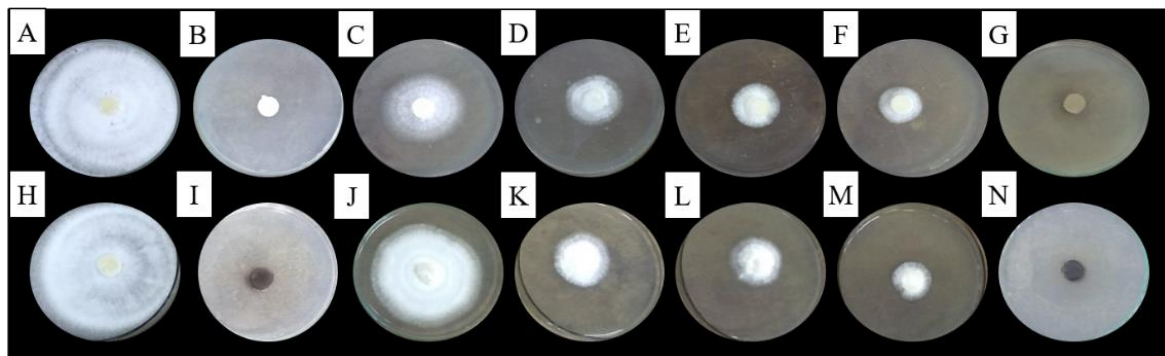


Data are presented as mean \pm SEM (standard error of the mean). Different letters indicate significant differences by Kruskal-Wallis test ($P < 0.05$).

Source: the authors

Regarding the SIMG results, for both fungal species the EO at highest concentration (T₆) did not differ from the positive control, according Figure 1 (B, D). Additionally, for *G. applanatum* the treatment T₄ had an intermediate effect and did not differ from both controls (Figure 1 B). A similar behavior observed for the treatments T₃ and T₄ in *L. lepideus* (Figure 1D).

Figure 2 - Action of essential oil of *Piper gaudichaudianum* leaves against *Ganoderma applanatum* (A-G) and *Lentinus lepideus* (H-N). Where A;H: negative control; B;I: positive control; C;J: 0.5 $\mu\text{L mL}^{-1}$ EO; D;K: 1.0 $\mu\text{L mL}^{-1}$ EO; E;L: 2.5 $\mu\text{L mL}^{-1}$ EO; F;M: 5.0 $\mu\text{L mL}^{-1}$ EO; G;N: 7.5 $\mu\text{L mL}^{-1}$ EO.

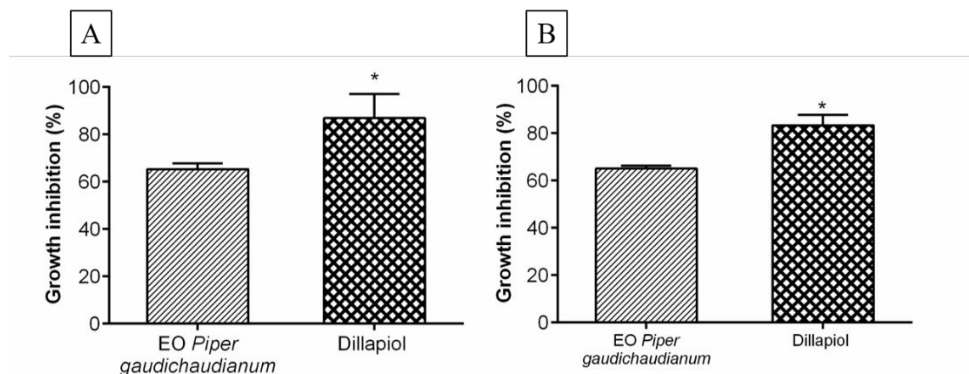


Source: the authors

There are several studies that evaluated the EOs potential to inhibit the growth of wood decay fungi. Xie et al. (2017) evaluated the fungicidal activity of six EOs against *Trametes hirsuta* (white-rot) and *Laetiporus sulphureus* (brown-rot) and the results showed that *Origanum vulgare* L. EO (Lamiaceae) induced 100% of the antifungal index against *L. sulphureus* with a concentration of 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. According these authors, *O. vulgare* EO and *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf EO (Poaceae) also exhibited strong antifungal action with antifungal indices of 100% against *T. hirsuta* at 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Considering the concentrations used in our study, the results suggest that was possible to completely inhibit the growth of white and brown-rot fungi with low concentrations.

Considering the susceptibility of *G. trabeum* and *L. lepideus* to *P. gaudichaudianum* EO at 1.00 $\mu\text{L mL}^{-1}$ and the content of dillapiole detected in this volume of extractive (0.7578 $\mu\text{L mL}^{-1}$), the results of the mycelial growth inhibition test indicated that the dillapiole was more effective than the EO (Figure 3). Therefore, the results suggest that the major compound is possibly responsible for the EO antifungal activity. Some or several minor compounds present in the extractive exert antagonistic effect (s), which result in a decrease in the activity of the EO. According Caesar e Cech (2019), antagonism occurs when effects of active constituents are masked by other compounds in a complex mixture. Pinheiro et al. (2021) described that pulegone, a major compound of *Hesperozygis ringens* (Benth.) Epling EO (Lamiaceae), was more potent against white-rot fungi *G. applanatum* than the EO crude.

Figure 3 - *In vitro* mycelial growth inhibition of *Piper gaudichaudianum* essential oil ($1.0 \mu\text{L mL}^{-1}$) and its major component dillapiole ($0.7578 \mu\text{L mL}^{-1}$) against *Ganoderma applanatum* (A) and *Lentinus lepideus* (B)

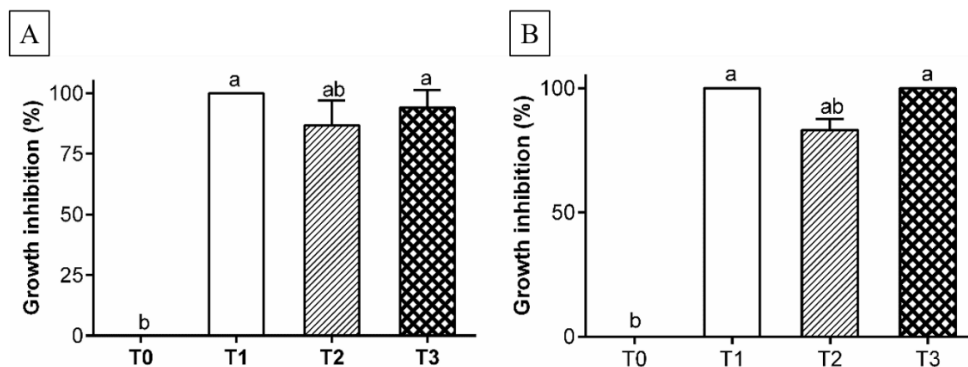


Data are presented as mean \pm SEM (standard error of the mean). * indicate significant differences by Mann-Whitney test ($P < 0.05$)

Source: the authors

When dillapiole was tested at two concentrations against the wood decay fungi, for both species the compound did not differ from the positive control (Figure 4A). *Lentinus lepideus* showed greater susceptibility to this phenylpropanoid (Figure 4B), since the results revealed total inhibition of mycelial growth, not differing from the positive control. Additionally, at the highest concentration, dillapiole showed fungicidal activity for brown-rot fungus. Razzagui-Abyaneh et al. (2007) isolated dillapiole from the OE of dill leaves and reported that dillapiole interfered on the production of aflatoxins in *Aspergillus parasiticus*. Additionally, dillapiole-rich fraction obtained from *Piper aduncum* L. aerial parts showed antifungal activity against dermatophytes and filamentous fungi (FERREIRA et al., 2016).

Figure 4 - *In vitro* mycelial growth inhibition of dillapiole on *Ganoderma applanatum* (A) and *Lentinus lepideus* (B). T₀ = negative control; T₁ = positive control; T₂ = dillapiole at $0.7578 \mu\text{L mL}^{-1}$; T₃ = dillapiole at $1.5156 \mu\text{L mL}^{-1}$



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

Source: the authors

Regarding the white-rot fungi under EO effect the IC_{50} value was $0.6027 \pm 0.002 \mu\text{L mL}^{-1}$ ($y = 0.9231x + 5.5563$; $R^2 = 0.909$), and the mycelial growth inhibition ranged between $52.75 \pm 1.37\%$ and $100.00 \pm 0.00\%$. The brown-rot fungi showed IC_{50} value of $0.4221 \pm 0.045 \mu\text{L mL}^{-1}$ ($y = 1.0271x + 5.3848$; $R^2 = 0.972$) and the mycelial growth inhibition remained between $63.28 \pm 0.88\%$ and $100.00 \pm 0.00\%$ (Table 2). The *Nectandra grandiflora* Nees & Mart. ex Nees EO (Lauraceae) provided IC_{50} values of $1.22 \mu\text{L mL}^{-1} \pm 0.16$ on white-rot fungi *Pycnoporus sanguineus* and $0.39 \mu\text{L mL}^{-1} \pm 0.26$ to on the brown-rot fungi *Gloeophyllum trabeum* (SILVA et al., 2016).

Table 2 - *In vitro* mycelial growth inhibition (%) and half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of *Piper gaudichaudianum* essential oil on *Ganoderma applanatum* and *Lentinus lepideus*

Fungal species	EO conc. ($\mu\text{L mL}^{-1}$)	Inhibition mean \pm SEM (%)	$IC_{50} \pm$ SEM ($\mu\text{L mL}^{-1}$)
<i>G. applanatum</i>	0.5	52.75 ± 1.37	0.60 ± 0.002
	1.0	65.18 ± 1.02	
	2.5	68.63 ± 0.84	
	5.0	73.30 ± 0.68	
	7.5	100.00 ± 0.00	
<i>L. lepideus</i>	0.5	63.28 ± 0.88	0.42 ± 0.045
	1.0	64.99 ± 0.48	
	2.5	71.73 ± 3.06	
	5.0	81.48 ± 0.33	
	7.5	100.00 ± 0.00	

Conc. = Concentrations; SEM = standard error of the mean. IC_{50} values were calculated by probit method
Source: the authors

Relating the chemical composition of *P. gaudichaudianum* EO with the antifungal activity detected, we can see that possibly the high content of phenylpropanoids present in the extractive seem to be responsible for detected antifungal activity. There are several reports on the great biological potential of this class of chemical components. Insecticidal activity on the larvae and pupae of *Aedes aegypti* (RAFAEL et al., 2008) has been already described for dillapiole. Additionally, EO from *Piper aduncum* L. leaves with high dillapiole content was toxic to larvae and adults of *Rhipicephalus microplus* (SILVA et al., 2009), and the extractive with a high content of phenylpropanoids showed acaricidal activity (CHO et al., 2004).

3.3 EFFECT OF PIPER GAUDICHAUDIANUM ESSENTIAL OIL AND DILLAPIOLE ON PLASMA MEMBRANE ERGOSTEROL CONTENT

Most natural resistance studies of wood to decay fungi in the laboratory has maintained the focus only in the final stages of deterioration (BARBERO-LÓPEZ et al., 2021). However,

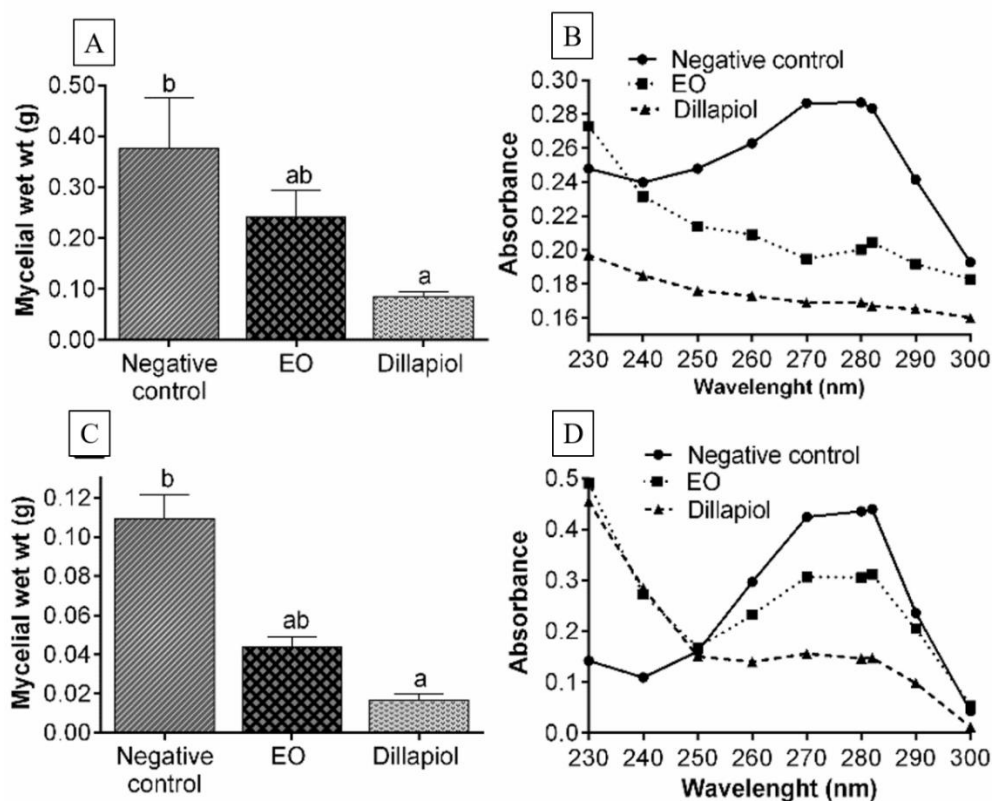
knowledge of the performance of biological properties in the initial and intermediate stages of deterioration is of paramount importance, so that there is a more effective control over the possible damage caused by decaying fungi (STANGERLIN et al., 2013). Based on that, our study evaluated a possible mode of action of the *P. gaudichaudianum* EO and dillapiole against fungal species by determination of the ergosterol content in mycelia under the effect of extractives mentioned.

Regarding the EO and dillapiole concentration to determine the influence of extractives on plasma membrane ergosterol content, $1.0 \mu\text{L mL}^{-1}$ EO and $0.7578 \mu\text{L mL}^{-1}$ dillapiole were chosen because the growth inhibition must be only partial, since mycelial weight is needed for the test. Thus, dillapiole significantly affected ($P = 0.0046$) *G. applanatum* mycelial wet weight when compared to negative control. The mycelial wet weight of the treatment containing EO did not differ from that observed in the negative control and in dillapiole treatment (Figure 5A).

Considering the mycelial wet weight of *L. lepidus*, it was also significantly affected ($P = 0.0036$) by dillapiole, comparing to the negative control. However, in the treatment with EO, the wet weight did not differ from the negative control and dilapiol, as showed in Figure 5C. According to Figure 5B, the curve of treatments with the extractives remained below the curve of the negative control, especially in 282 nm, indicating a decrease in the estimated sterol content.

In our results is observed the difference between the mycelial growth (mm) and the mycelial wet weight values (g) obtained to fungal species under the effect of EO and dillapiole. According Figure 3, the extractive and the isolated phenylpropanoid statistically differed, indicating that dillapiole was more efficient to control mycelial growth. However, Figure 5 A,C shows that there was no statistical difference between the EO and dillapiole. These seemingly disparate results may have occurred due to the different forms of measurement used to evaluate the mycelial growth. In weight evaluation (g), it is possible to consider the fungi vertical growth, computing also the mycelium thickness. Conversely, when evaluating fungal growth through parallel readings to the growth axis (mm), it is not possible to determine the variation of this parameter.

Figure 5 – Mycelial wet weight (g) and absorbance values of sterols extracted from *Ganoderma applanatum* (A, B) and *Lentinus lepideus* (C, D) mycelia growing in medium containing *Piper gaudichaudianum* essential oil at 1.0 $\mu\text{L mL}^{-1}$ or dillapiol at 0.7578 $\mu\text{L mL}^{-1}$



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

Source: the authors

Our observations revealed that *P. gaudichaudianum* EO and dillapiol can affect the ergosterol content in the white-rot fungus evaluated. Compared to control group, the EO presented 48.60% of decrease, whereas dillapiol evoked a decrease of 59.32% of sterol amount in *G. applanatum*. Additionally, the extractives also reduced the ergosterol content in the brown-rot fungi, once the EO showed 68.76% of decrease and its major compound induced an 83.93% reduction of the sterol content. The curve of treatments with extractives remained below the curve of the negative control, indicating a decrease in the estimated sterol content. Corroborating the above, the Figure 5 (B, D) shows the curve of treatments with extractives with lower absorbance values, mainly in 282 nm, evidencing the reduction of the ergosterol content.

Previous reports have described that EO can induce considerable reduction or oscillation in ergosterol content, harming this major sterol component of the fungal cell membrane, fundamental and specific to fungi establishment (BOMFIM et al., 2020). Additionally, it is emphasized that ergosterol is the main steroid component of the fungal cell membrane

(YADAV et al., 2020). Thus, due to its high relevance for fungi, a reduction in ergosterol content provide osmotic disturbances, disruption of cell growth and proliferation (MAZU et al., 2016).

Several reports on antifungal efficacy of different EOs against distinct fungi genera and their effect on ergosterol content have been published. However, to our knowledge, there are no reports on use of EO of Piperaceae species for this purpose. *Coriaria nepalensis* Wall. EO caused fungal cell death of *Candida* isolates due to disrupting membrane integrity, having a significant impairment of ergosterol biosynthesis (AHMAD et al., 2011). *Rosmarinus officinalis* L. EO reduced the ergosterol amount in *Aspergillus flavus* and the biomass of mycelium were also reduced as the EO treatment concentration increased (BOMFIM et al., 2020). *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M. Perry EO and its main component eugenol were evaluated against *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. Both extractive and main component caused a considerable reduction in the ergosterol amount (PINTO et al., 2009). The isolated compound citral was evaluated against *Alternaria alternata* and induced the disturbance of cell integrity through the disorder of gene expression (WANG et al., 2019). According to the authors, this effect was further confirmed by irreversible deleterious disruption of fungal spores and the inhibition of ergosterol biosynthesis as a consequence of exposure to citral.

The antifungal mechanism of EOs is frequently attributed to the membrane disruption. Due to their lipophilic nature and low molecular weight, EOs compounds are able to cause structural and functional damage in the cell of fungi through disrupting the membrane permeability and the osmotic balance of the cell. Hence, due to the specific characteristics of EOs, they could pass easily through cell membranes and generate disturbance of the fungal cell organization, causing a considerable impairment on the ergosterol content. Then, based on the information described, it is possible to infer that the plasma membrane is an important antifungal target of EO (AHMAD et al., 2011; HU et al., 2017; KALAGATUR et al., 2015)

Based on our results, it is possible to infer that *P. gaudichaudianum* EO and dillapiole have fungistatic activity against the white-rot fungi *G. applanatum*, besides reducing the ergosterol content of the plasma membrane of this xylophagous organism. However, the brown-rot fungi evaluated showed greater susceptibility to *P. gaudichaudianum* EO and its major compound, once they induced a fungicidal effect on *L. lepideus*. Additionally, the extractives also reduced the ergosterol content of this wood-decay fungi. The use of EOs to control wood decay fungi has several advantages, as their low toxicity for warm-blooded animals, low environmental impact and the fact that they originate from renewable sources. One more

advantage of using EO to inhibit the growth of wood decay fungi is the lower probability of generating microbial resistance due their chemical complexity and their action mechanisms (COX et al., 2000; PANDEY; TRIPATHI; SINGH, 2018).

4 CONCLUSIONS

In this study, the *P. gaudichaudianum* EO totally inhibited the mycelial growth of the evaluated fungi at the highest concentration evaluated. However, the brown-rot fungi was more susceptible than the white-rot one to *P. gaudichaudianum* EO and dillapiole, since the extractives induced a fungicidal effect on *L. lepideus*, while showed only fungistatic effect against *G. applanatum*. Additionally, the extractive and its major compound reduced the ergosterol content in the fungal mycelia of both evaluated species. These results corroborate the potential of *P. gaudichaudianum* EO and dillapiole as components of environmentally sustainable biopesticides. Therefore, more studies are required to verify how the EO can be impregnated in the wood and how the activity of the extract will be in this condition. Additionally, studies aiming to develop an adequate formulation with *P. gaudichaudianum* EO as wood preservatives need to be carried out, in order to overmatch its volatility, as well as to analyze the economic feasibility, through studies regarding to cost-benefit ratio.

5 ACKNOWLEDGEMENTS

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001.

REFERENCES

AHMAD, A. *et al.* Antifungal activity of *Coriaria nepalensis* essential oil by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against *Candida*. **Yeast**, v. 28, n. 8, p. 611–617, 2011. <https://doi.org/10.1002/yea.1890>.

ANDRADE, E. *et al.* Essential Oils of *Piper gaudichaudianum* Kunth and *P. regnellii* (Miq.) C. DC. **Journal of Essential Oil Research**, v. 10, n. 4, p. 465–467, 1998. <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10412905.1998.9700945>.

AUGUSTSSON, A. *et al.* Persistent hazardous waste and the quest toward a circular economy: the example of arsenic in chromated copper arsenate-treated wood. **Journal of Industrial Ecology**, v. 21, n. 3, p. 689–699, 2017. <https://doi.org/10.1111/jiec.12516>.

BADAWY, M. E. I.; ABDELGALEIL, S. A. M. Composition and antimicrobial activity of essential oils isolated from Egyptian plants against plant pathogenic bacteria and fungi.

Industrial Crops and Products, v. 52, p. 776–782, 2014.

<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.12.003>.

BARBERO-LÓPEZ, A. *et al.* Bio-based wood preservatives: Their efficiency, leaching and ecotoxicity compared to a commercial wood preservative.

Science of the Total Environment, v. 753, p. 142013, 2021. DOI:

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142013>.

BARBOSA, M. S.; VIEIRA, G. H. C.; TEIXEIRA, A. V. Atividade biológica *in vitro* de própolis e óleos essenciais sobre o fungo *Colletotrichum musae* isolado de bananeira (*Musa* spp.).

Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, v. 17, p. 254–261, 2015.

https://doi.org/10.1590/1983-084X/13_063.

BATISTA, J. M. B. *et al.* Absolute configuration and selective trypanocidal activity of

gaudichaudianic acid enantiomers. **Journal of Natural Products**, v. 74, p. 1154–1160, 2011.

DOI: <https://dx.doi.org/10.1021/np200085h>.

BOMFIM, N. S. *et al.* Antifungal and antiaflatoxic activity of rosemary essential oil

(*Rosmarinus officinalis* L.) against *Aspergillus flavus*. **Food Additives & Contaminants:**

Part A, v. 37, n. 1, p. 153–161, 2020. <https://doi.org/10.1080/19440049.2019.1678771>.

CAESAR, L. K.; CECH, N. B. Synergy and antagonism in natural product extracts: when 1 + 1 does not equal 2. **Natural Product Reports**, v. 36, n. 6, p. 869–888. DOI:

<https://doi.org/10.1039/C9NP00011A>.

CHEN, J.; SHEN, K.; LI, Y. Greening the processes of metal–organic framework synthesis and their use in sustainable catalysis. **ChemSusChem**, v. 10, n. 16, p. 3165–3187, 2017.

<https://doi.org/10.1002/cssc.201700748>.

CHO, J. H. *et al.* Acaricidal components of medicinal plant oils against *Dermatophagoides*

farinae and *Dermatophagoides pteronyssinus*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**,

v. 14, p. 631–634, 2004. [https://agris.fao.org/agris-](https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=KR2005012067)

[search/search.do?recordID=KR2005012067](https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=KR2005012067).

COX, S. D. *et al.* The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca*

alternifolia (tea tree oil). **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, n. 1, p. 170–175, 2000.

<https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00943.x>.

FERREIRA, R. G. Antifungal Action of the Dillapiole-rich Oil of *Piper aduncum* against

Dermatomycoses Caused by Filamentous Fungi. **British Journal of Medicine & Medical**

Research, v. 15, n. 12, p. 1-10, 2016. <http://dx.doi.org/10.9734/BJMMR/2016/26340>.

FINATO, A. C. *et al.* Crude leaf extracts of piperaceae species downmodulate inflammatory responses by human monocytes. **PLoS One**, v. 13, n. 6, 2018. DOI:

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198682>.

FINNEY, D. J. **Probit analysis**. London: Cambridge University Press, 1971.

HU, Y. *et al.* Mechanisms of antifungal and anti-aflatoxigenic properties of essential oil derived from turmeric (*Curcuma longa* L.) on *Aspergillus flavus*. **Food Chemistry**, v.220, p.1–8, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.179>.

KALAGATUR, N. K. *et al.* Antagonistic activity of *Ocimum sanctum* L. essential oil on growth and zearalenone production by *Fusarium graminearum* in maize grains. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, 2015. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00892>.

KEDIA, A. *et al.* Antifungal, antiaflatoxigenic, and insecticidal efficacy of spearmint (*Mentha spicata* L.) essential oil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 89, p. 29-36, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.10.027>.

LAGO, J. H. G. *et al.* Benzoic acid derivatives from piper species and their fungitoxic activity against *Cladosporium cladosporioides* and *C. sphaerospermum*. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 11, p. 1783–1788, 2004. <https://doi.org/10.1021/np030530j>.

MAZU, T. K. *et al.* The mechanistic targets of antifungal agents: an overview. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 16, n. 7, p. 555–578, 2016. <https://doi.org/10.2174/1389557516666160118112103>.

MORAIS, S. M. *et al.* Chemical composition and larvicidal activity of essential oils from Piper species. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, n. 10, p. 670–675, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bse.2007.05.002>.

OLIVEIRA J. T. S. *et al.* Influência dos extrativos na resistência ao apodrecimento de seis espécies de madeira. **Revista Árvore**, v. 29, n. 5, p. 819-826, 2005. <https://doi.org/10.1590/S0100-67622005000500017>

PANDEY, A. K.; TRIPATHI, S.; SINGH, P. Plant essential oils: a substitute for conventional insecticides against *Tribolium* species (Coleoptera: Tenebrionidae)-achievements and challenges. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v. 51, n.13–14, p. 696–728, 2018. <https://doi.org/10.1080/03235408.2018.1495875>.

PASTORELLI, R. *et al.* Microbial communities associated with decomposing deadwood of downy birch in a natural forest in Khibiny Mountains (Kola Peninsula, Russian Federation). **Forest Ecology and Management**, v. 455, p. 117643, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2019.117643>.

PÉRES, V. F. *et al.* Chemical composition and cytotoxic, mutagenic and genotoxic activities of the essential oil from *Piper gaudichaudianum* Kunth leaves. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 9, p. 2389-2395, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.06.035>.

PINTO, E. *et al.* Antifungal activity of the clove essential oil from *Syzygium aromaticum* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, n. 11, p. 1454–1462, 2009. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.010538-0>.

PINHEIRO, C. G. *et al.* *Hesperozygis ringens* (Benth.) Epling essential oil: antifungal activity and effect on ergosterol content of wood-decay fungi. **Journal of Essential Oil Research**, v. 33, n. 1, p. 1-11, 2021. <https://doi.org/10.1080/10412905.2020.1840450>.

PINHEIRO, C. G. *et al.* A method for evaluating ergosterol content in wood-decay fungi. **Revista Árvore**, v. 44, p. e4410, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1590/1806-908820200000010>.

PUHL, M. C. M. N. *et al.* Antimicrobial activity of *Piper gaudichaudianum* Kuntze and its synergism with different antibiotics. **Molecules** (Basel, Switzerland), v. 16, n. 12, p. 9925–9938, 2011. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules16129925>.

RAFAEL, M. S. *et al.* Potential control of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) with *Piper aduncum* L. (Piperaceae) extracts demonstrated by chromosomal biomarkers and toxic effects on interphase nuclei. **Genetics and molecular research: GMR**, v. 7, n. 3, p. 772–781, 2008. <https://doi.org/10.4238/vol7-3gmr481>.

RAPADO, L. N. *et al.* A benzoic acid derivative and flavokawains from *Piper* species as schistosomiasis vector controls. **Molecules** (Basel, Switzerland), v. 19, n. 4, p. 5205–5218, 2014. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules19045205>.

RAZZAGHI-ABYANEH, M. *et al.* Dillapiol and Apiol as Specific Inhibitors of the Biosynthesis of Aflatoxin G1 in *Aspergillus parasiticus*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 71, n. 9, p. 2329-2332, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1271/bbb.70264>.

SCHINDLER, B.; HEINZMANN, B. M. *Piper gaudichaudianum* Kunth: seasonal characterization of the essential oil chemical composition of leaves and reproductive organs. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 60, 2017. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4324-2017160441>.

SHARIFI-RAD, J. *et al.* Biological Activities of Essential Oils: From Plant Chemoecology to Traditional Healing Systems. **Molecules**, v. 22, n. 1, p. 1–55, 2017. <https://doi.org/10.3390/molecules22010070>.

SILVA, A. C. A. *et al.* Effect of the essential oils from *Piper* sp. and blue led lights in the enhancement of the antibiotic activity of drugs against MDR bacterial strains. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 199, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2019.111604>.

SILVA, D. T. *et al.* Chemical composition and inhibitory effects of *Nectandra grandiflora* leaves essential oil against wood decay fungi. **Drewno**, v. 59, n.197, 2016. DOI: <https://doi.org/10.12841/wood.1644-3985.C29.10>.

SILVA, W. C. *et al.* Toxicity of *Piper aduncum* L. (Piperales: Piperaceae) from the Amazon forest for the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 164, n. 2–4, p. 267–274, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.06.006>.

SOBRAL, M. *et al.* **Flora Arbórea e Arborescente do Rio Grande do Sul. Porto Alegre: RiMa Novo Ambiente**, 2013. 362p.

SPEROTTO, A. R. M. *et al.* Cytotoxic mechanism of *Piper gaudichaudianum* Kunth essential oil and its major compound nerolidol. **Food and Chemical Toxicology**, v. 57, p. 57–68, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.03.013>.

STANGERLIN, D. M. *et al.* Resistência natural da madeira de três espécies amazônicas submetidas ao ataque de fungos apodrecedores. **Revista Ciência da Madeira** (Brazilian Journal of Wood Science), v. 4, n. 1, p. 15–32, 2013. <http://dx.doi.org/10.15210/cmadv4i1.4056>.

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, n. 3, p. 520–527, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.061>.

WANG, L. *et al.* Effects of essential oil citral on the growth, mycotoxin biosynthesis and transcriptomic profile of *Alternaria alternata*. **Toxins**, v. 11, p. 1-18, 2019. <https://doi.org/10.3390/toxins11100553>.

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. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.06.041>.

YADAV, A. *et al.* Encapsulation of *Bunium persicum* essential oil using chitosan nanopolymer: Preparation, characterization, antifungal assessment, and thermal stability. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 142, p. 172–180, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.09.089>.

3 MANUSCRITO 2 The use of *Piper gaudichaudianum* Kunth extracts to control wood decay fungi growth

Nadia Helena Bianchini^a, Bibiana Fontana Batista^a, Carlos Garrido Pinheiro^a, Guilherme Elias Andrade^b, Marina Amaral Jacobini^b; Fernando Nunes Gouveia^c, Marlove Fátima Brião de Muniz^{a, d}, Berta Maria Heinzmann^{a, e*}

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

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

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

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

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

The use of *Piper gaudichaudianum* Kunth extracts to control wood decay fungi growth

ABSTRACT

In this study we obtained the hexanic and ethanolic extracts of stems and roots of *Piper gaudichaudianum* Kunth aiming to evaluate the antifungal activity of these extracts against fungi that cause white (*Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat.) and brown-rot (*Lentinus lepideus* (Fr.) Fr.) in wood. The extracts were obtained by sequential extraction by soxhlet. After solvent evaporation, the dry extracts were quantified and had their antifungal activity evaluated at 1.25, 2.50 and 5.00 mg mL⁻¹ by determination of mycelial growth inhibition. A negative control (diluent) and positive control (propiconazole) were also considered. The extracts were analyzed by gas chromatography (GC) and ultra-high performance liquid chromatography (UPLC). Regarding plant extracts, it was observed that extractive yields are specific to each part of the plant and directly depend on the solvent utilized. In the antifungal assays the results for hexane extract from roots stands out, which at the highest concentration evaluated, that inhibited $73.90 \pm 0.182\%$ de mycelial growth of *G. applanatum* and $91.44 \pm 5.416\%$ to *L. lepideus*. Through the chemical analysis, a derivative of benzoic acid was identified in this extract. Thus, further studies must be performed to identify the other substances present in the extracts and to investigate their mode of action.

Keywords: Brown-rot; Natural product; Piperaceae; White-rot; Wood preservative

1 INTRODUCTION

The search for active substances from natural sources with presumably lower environmental burden than traditional wood preservatives has increased in recent years (BAKAR et al., 2013). According Soidrou et al. (2013), the use of preservative methods is necessary due to the composition of the wood, once wood remains under threat of decomposition by microorganisms including fungi, which are responsible for white and brown-rot of timber, and can cause a considerable economic loss to lumber industry.

The demand for alternative wood preservation methods arose due to the high toxicity of synthetic products used currently, harming the environment and animals, besides the risk of developing resistance. Additionally, the chemical products used to preserve wood present heavy metals in their composition, as copper or borate, causing health damage to users and with presumably greater environmental harm. Due to the disadvantages of synthetic wood preservatives, different authors have proposed the use of natural products as an ecological and economical solution (DING et al., 2017; ELLER et al., 2020; TCHINDA et al., 2018).

In this context, a promising technique to wood preservation is transferable durability, where plant extracts from naturally resistant materials or biologically active extractives are used

to preserve wood (ELLER et al., 2020; TASCIOGLU et al., 2013). Among these natural products, plant extracts stand out, once they are rich in secondary metabolism of plants.

Secondary metabolites belong to chemical defense system of plants against herbivorous predators and pathogenic microorganisms. The biological properties of plant extracts have received great interest due to their low toxicity to animals and the environment, when compared to synthetic products. Moreover, many biological and pharmacological activities already described to plant extracts and their economic viability and less chance of developing resistance are also highlighted by several works (HE et al., 2018; SCALERANDI et al., 2018).

In Brazil, *Piper gaudichaudianum* Kunth (Piperaceae) is an abundant species, occurring in Paraguay and Argentina (SOBRAL et al., 2013). There are several biological activities described for the extracts of this shrub, such antifungal (LAGO et al., 2004), antiparasitic (BATISTA et al., 2011; CALDERÓN et al., 2010), antimicrobial (PUHL et al., 2011; SILVA et al., 2019), insecticide (CHAABAN et al., 2018; RAMOS et al., 2012) and cytotoxic (PÉRES et al., 2009; SPEROTTO et al., 2013).

Considering the activities already reported for *P. gaudichaudianum* extracts and the demand for wood preservatives with lower environmental burden than traditional wood preservatives, this work reports the antifungal activity of the extracts against wood decay fungi. Additionally, in order to explain the observed activity, the extracts had their chemical composition analyzed by UPLC (ultra performance liquid chromatography) and GC-MS (gas chromatography coupled to mass spectrometry).

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 PLANT MATERIAL

The plant material was collected in Vale Veneto district (29°41'03''S and 53°31'37''W), municipality of São João do Polêsine - RS. A voucher specimen was deposited at the Herbarium of the Department of Forest Sciences of Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil (HDCF 7539). Samples were collected during the summer.

The roots were washed in running water to remove soil and other organic materials. Posteriorly, roots were dried in an oven with air circulation Marconi MAO35 at 45 °C (FIOREZE; MORINI, 2000) for 7 days. Stems were dried in a controlled temperature room at approximately 23 °C (YU, 2014) for 15 days. After drying, the plant material was reduced to fine powder using a laboratory knife mill type Willey Tecnal TE680, passed through 40-mesh

screen. The ground plant material was stored in sealed bottles protected from light at approximately - 4 °C.

2.2 *Piper gaudichaudianum* EXTRACTS

The ground plant material of *P. gaudichaudianum* was extracted by Soxhlet apparatus under reflux until total exhaustion (approximately 12 h). Roots and stems milled were separately transferred to filter paper cartridge and sequentially extracted with hexane and ethanol. The extractive solutions were filtered on filter paper and evaporated in a rotary evaporator Buchi R-210. Thus, the extracts obtained were stored in a desiccator until mass stabilization and afterwards they were lyophilized in bench lyophilizer Terroni LS3000.

2.3 CHEMICAL CHARACTERIZATION BY LIQUID CHROMATOGRAPHY

The samples were analyzed by UPLC Agilent 1200 infinity coupled to a DAD (Diode Array Detector) detector, equipped with pump and an automatic injector, using a pre-column Poroshell 120 EC-C18 (3.0 x 5 mm; 2.7 nm) and reverse phase chromatographic column Poroshell 120 EC-C18 (4.6 x 50 mm; 2.7 µm). The data were obtained and processed using the ChemStation software (Hewlett Packard, Germany). The chromatographic method used was based on the methodology described by Evaristo and Leitão (2001), with some adaptations.

The mobile Phase A consisted of 1.0% (v / v) of HPLC grade acetic acid (Sigma-Aldrich®) in ultrapure water, with pH adjusted to 4.0 using ammonium hydroxide and the mobile Phase B was composed by HPLC grade methanol (Merck®). The samples were diluted in Phase A (1.0 mg mL⁻¹) and standards in Phase B, in different concentrations. Both were injected (5.0 µL) under the following chromatographic conditions: column temperature of 40 °C, flow of 1.2 mL min⁻¹, total analysis time of 45 min and maximum pressure of 400 bar. The elution gradient of solvents A and B was based on the methodology described by Evaristo and Leitão (2001), with adaptations. The detection wavelength chosen for the analysis was 320 nm. All samples were analyzed in duplicate.

The identification of the sample peaks was performed using the chromatograms obtained in each injection and compared with the absorption spectra and retention times of the standards. The quantification of the identified compounds was performed from analytical curves, obtained using commercial products or reference substance isolated by column

chromatography and characterized by NMR-spectra, under identical chromatographic conditions. The detection wavelengths were 250 and 280 nm.

2.4 CHEMICAL CHARACTERIZATION BY GAS CHROMATOGRAPHY

The chemical composition of the hexane extracts was analyzed by an Agilent 7890A gas chromatograph coupled to a 5075C mass spectrometer (GC-MS) using a non-polar DB5-MS capillary column (Hewlett Packard, 5% phenylmethylsiloxane, 30 m × 0.25 mm i.d. × 0.25 μm film thickness), and electron ionization mode at 70 eV. The carrier gas was helium (1.0 mL·min⁻¹); injector and detector temperatures of 150 °C and 280 °C, respectively. The samples were injected in split inlet mode (ratio 1:100). Oven program: 40 °C - 320 °C at 4 °C·min⁻¹. To the analysis, the extracts were diluted in hexane (HPLC grade) at 1 mg mL⁻¹. Then, the solution was filtered in PTFE syringe filter.

The compounds identification was based on the comparison of retention indices calculated by linear interpolation to retention times of an *n*-alkane series and of their mass spectra with authentic samples and with literature data (ADAMS, 2009). Relative amounts of the components were calculated based on GC peak areas, by gas chromatography with a flame ionization detector (GC-FID). Analysis parameters were the same as mentioned above, with exception of split ratio (1:50) and both injector and detector temperatures (300 °C).

2.5 ANTIFUNGAL ACTIVITY BIOASSAY

The wood decay fungi used in the tests were provided by Forest Products Laboratory, Brazilian Forest Service, DF, Brazil and the fungal strains were deposited at the Herbarium SMDB of the Biology Department, UFSM, Brazil. The antifungal activity of hexane and ethanolic extracts of roots (HER and EER, respectively) as well as hexane and ethanolic extracts of stems (HES and EES, respectively) against *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat. (SMDB 17.748) and *Lentinus lepideus* (Fr.) Fr. (SMDB 17.750) was performed by dilution method on PDA (potato-dextrose-agar) medium. The fungal species were cultured in previously sterilized Petri dishes (9 cm of diameter), with PDA medium and incubated in BOD (Biochemical Oxygen Demand) chamber at 25 ± 1 °C in light/dark (12h/12h) for 15 days. Both white and brown-decay fungi were recultivated 15 days before mycelial growth inhibition tests.

The plant extracts were evaluated at 1.25, 2.50 and 5.00 mg mL⁻¹, previously diluted in 5.0 mL of aqueous solution composed by ethanol (12.0%), acetone (0.020%) and tween 20

(0.020%). As positive control, the fungicide propiconazole (1.4 mg mL^{-1}) was used and the negative control was composed by the diluents. An absolute control was also considered. All assays were carried out in 3 replicates of 2 experimental units each. The PDA medium was supplemented with the extractives previously diluted, and then poured to the sterile Petri dishes. Then, mycelial discs (11 mm diameter) were transferred aseptically to the center of the plates and incubated in BOD Novatecnica NT 718, at $25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ in 12h photoperiod, until the control treatment mycelium reaches the border of the dish (PINHEIRO et al., 2021).

Regarding evaluation of mycelial growth inhibition, to obtain the 50% inhibitory concentration (IC_{50}) values, the results were analyzed by probit analysis (FINNEY, 1971). The evaluation of mycelia growth was performed every 2 days, by an average of two perpendicular measurements. Mycelial growth inhibition provided by the evaluated plant extracts was calculated by the equation: Growth inhibition (%) = $[(D_C - D_T) / D_C] \times 100$, where D_C and D_T are average diameters of fungal mycelia of negative control and treatment, respectively (BADAWY; ABDELGALEIL, 2014).

2.6 STATISTICAL ANALYSIS

The data were submitted to homogeneity of variances and normality tests. Once the data did not fit the assumptions, the non-parametric Kruskal-Wallis test and Mann-Whitney test were chosen. All data are reported as means \pm standard deviations. The analysis was achieved using GraphPad Prism 6.0 software. A significant difference was considered at a level of $P < 0.05$.

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 EXTRACTION YIELD

Considering the hexane extracts obtained, HER presented the highest yield ($1.536 \pm 0.115\%$) than HES ($1.187 \pm 0.081\%$). The results evidence that roots have a higher content of nonpolar compounds than the stems, once hexane is a nonpolar solvent and has greater selectivity for this class of substances (CHEMAT et al., 2019). Regarding the ethanolic extracts, EES ($4.177 \pm 0.211\%$) showed values significantly ($P = 0.005$) higher than EER ($3.248 \pm 0.224\%$). These results indicate that the stems have higher content of polar compounds than the roots, since this solvent solubilizes polar compounds (NAWAZ et al., 2020).

Concerning the yields for each vegetative part (roots and stems) separately, ethanolic extracts had higher values than the hexane ones. Based on the exposed results it is inferred that roots and stems have a higher content of polar compounds than nonpolar compounds (NAWAZ et al., 2020).

3.2 CHEMICAL CHARACTERIZATION OF PLANT EXTRACTS

The analysis by GC-MS of HER generated a chromatogram containing 3 peaks (Figure 1A). The chemical composition analysis of HER by GC-MS enabled the identification of only 1 compound (Table 1), indicated by the black arrow in Figure 1A. This indicates that probably the other two major compounds in the extract have not yet been described.

Table 1 - Chemical composition of the hexane extract of roots (HER) from *Piper gaudichaudianum* Kunth

Peak	RT	KI _C	KI _T	Compound	%
1	36.199	1669		4-(3 hydroxy-3-methyl-butenyl)-methyl benzoate	14.74
2	40.768	1840		NI	67.22
3	41.627	1874		NI	18.04
Total percentage of identification					14.74

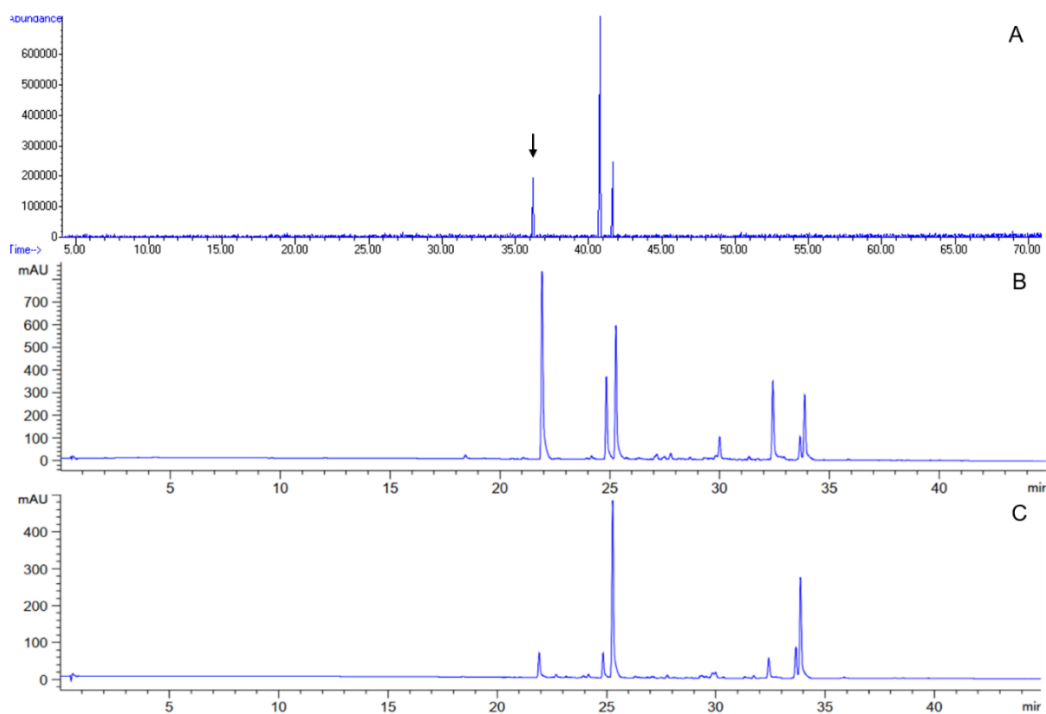
Compounds are listed in order of elution on DB5-MS column. RT: Retention time; IK_C: calculated Kovats index; IK_T: tabulated Kovats index; NI: not identified
Source: the authors

The chemical analysis of HER by UPLC enabled the identification of 5 major peaks at 250 nm (Figure 1B) and 2 main peaks at 280 nm (Figure 1C). However, according GC-MS analysis, the major chemical compounds of this extract have not yet been elucidated. Thus, there are no chemical standards to be acquired commercially to perform the analysis.

Batista et al. (2011) isolated the major compound of *P. gaudichaudianum* ethyl acetate extract and identified as a racemic mixture of the gaudichaudianic acid, a prenylated chromene. Additionally, these authors described that the HPLC analysis revealed the presence of this substance in all organs of the adult plant, while in seedlings it was found only in the roots,

revealing that gaudichaudianic acid is biosynthesized as a racemic mixture from the seedling stage onward.

Figure 1 - Chromatographic profile of hexane extract of roots (HER) from *Piper gaudichaudianum* by Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (A) and Ultra-Performance Liquid Chromatography at 250 nm (B) and 280 nm (C)



Black arrow indicates the peak for the compound identified by gas chromatography coupled to mass spectrometry. Source: the authors.

Batista et al. (2008) also isolated chromenes from *P. gaudichaudianum* stems and the structures of isolates were confirmed from the NMR analysis. These chromenes exhibit significant anti-trypanocidal activities against *Trypanosoma cruzi*. Additionally, in CH₂Cl₂-MeOH (2:1) extracts from leaves and roots of *P. gaudichaudianum*, Lago et al. (2004) identified two chromenes, three prenylated benzoic acids and pinocembrin. These authors also reported that pinocembrin showed fungicidal activity against *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum*. Based on these studies, it seems that the compounds obtained from *P. gaudichaudianum* are active against several organisms and this species has potential to the search for other biological activities not yet reported.

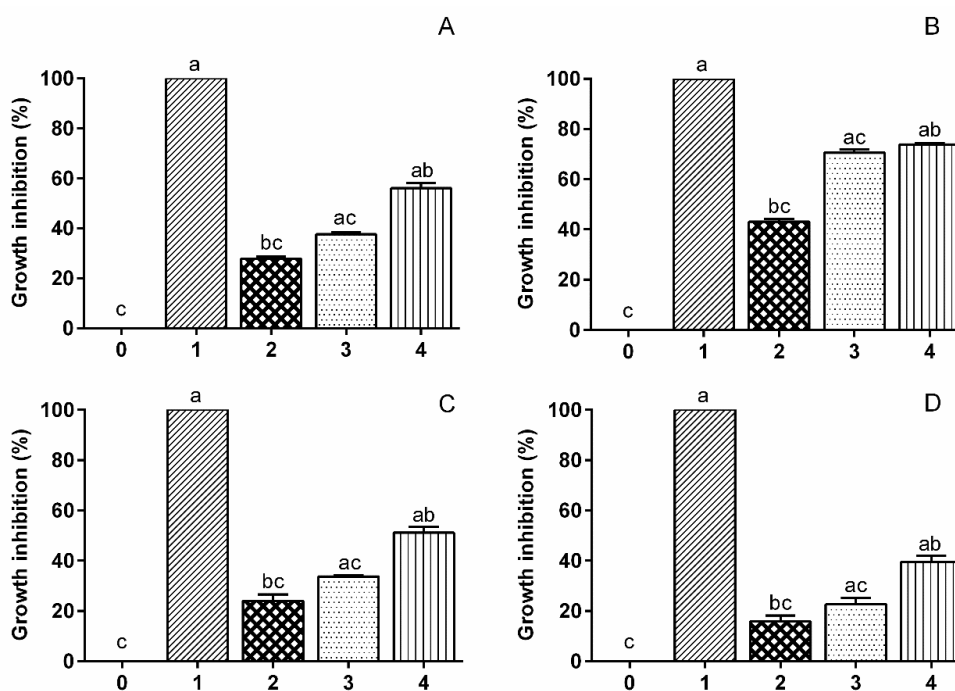
Péres et al. (2006) described a comparative study of extraction methods for terpenes, fatty acids and Vitamin E from leaves of *P. gaudichaudianum* and they reported that the major concentration of nerolidol was achieved by soxhlet extraction with petroleum ether, while

higher levels of palmitic acid were found by pressurized liquid extraction (PLE) with petroleum ether. Phytol appears in higher amount in the PLE ethanolic extract, and the better technique to extract linoleic and 9,12,15-octadecatrienoic acids was sonication with ethanol. However, lignoceric acid was better extracted by PLE with ethanol, and linoleic acid, 9,12,15-octadecatrienoic acid and lignoceric acid were detected only in the ethanolic extracts. Thus, the choice of solvent and the extraction method influence directly the chemical composition of plant extracts, and reflected in their biological activity (PÉRES et al., 2006).

3.3 ANTIFUNGAL ACTIVITY

Regarding the antifungal activity test, all extracts at the highest concentration (5.0 mg mL⁻¹) showed a significant mycelial growth inhibition of *G. applanatum* (Figure 2), when compared to negative control (Figure 2 A-D). Additionally, these treatments did not differ from the positive control. For all extracts, the treatments at 2.5 mg mL⁻¹ also did not differ from the positive control, although it does not differ from the negative control as well.

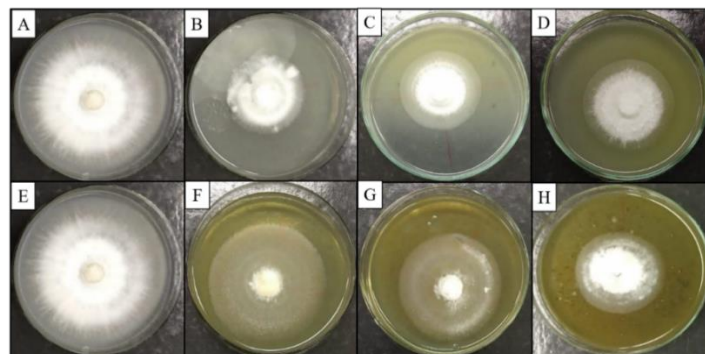
Figure 2 - *In vitro* mycelial growth inhibition of *Ganoderma applanatum* under the effects of ethanolic extract of roots (EER) (A), hexane extract of roots (HER) (B), ethanolic extract of stems (EES) (C) and hexane extract of stems (HES) (D). Where: 0 = negative control; 1 = positive control; 2 = 1.25 mg mL⁻¹; 3 = 2.5 mg mL⁻¹; 4 = 5.0 mg mL⁻¹



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

Source: the authors

Figure 3 – Antifungal activity evaluation of roots hexane extract (HER) (A-D) and ethanolic extract (EER) (E-H) against *Ganoderma applanatum*. Where A;E: negative control; B;F: 1.25 mg mL⁻¹; C;G: 2.5 mg mL⁻¹; D;H: 5.0 mg mL⁻¹



Source: the authors

Through the results of mycelial growth inhibition (Figure 3) and IC₅₀ (Table 2) of the extracts against *G. applanatum*, the root ones stand out. The obtained results evidenced that HER was the most active extract against *G. applanatum*.

Table 2 - *In vitro* mycelial growth inhibition (%) and half maximal inhibitory concentration IC₅₀ of *Piper gaudichaudianum* extracts on *Ganoderma applanatum*. Where: HER: hexane extract of roots; EER: ethanolic extract of roots; HES: hexane extract of stems; EES: ethanolic extract of stems

Extract	Conc. (mg mL ⁻¹)	Inhibition mean ± SEM (%)	IC ₅₀ ± SEM (mg mL ⁻¹)
HER	1.25	43.16 ± 0.473	1.41 ± 0.041
	2.5	70.51 ± 0.534	
	5.0	73.90 ± 0.182	
EER	1.25	27.90 ± 0.291	3.99 ± 0.261
	2.5	37.59 ± 0.311	
	5.0	56.14 ± 0.821	
HES	1.25	15.84 ± 0.958	8.61 ± 0,098
	2.5	22.67 ± 1.042	
	5.0	39.55 ± 0.945	
EES	1.25	23.96 ± 1.061	4.94 ± 0.057
	2.5	33.69 ± 0.213	
	5.0	51.16 ± 0.931	

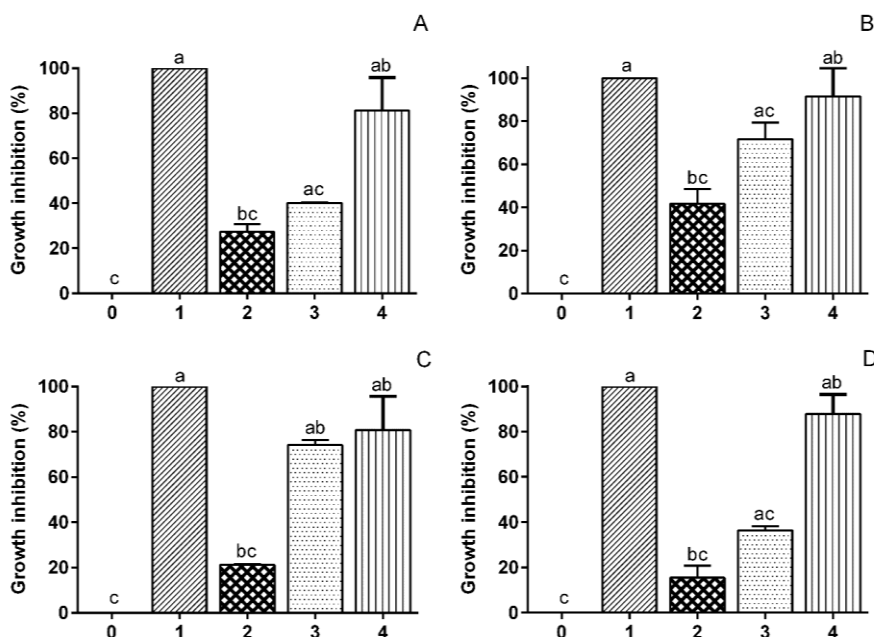
Conc. = Concentrations; SEM = standard error of the mean. IC₅₀ values were calculated by probit method

Source: the authors

The brown-rot fungi *L. lepideus* showed visually higher sensitivity to *P. gaudichaudianum* extracts. All extracts at the highest concentration (5.0 mg mL⁻¹) showed a significant mycelial growth inhibition of *L. lepideus*, when compared to negative control (Figure 4 A-D). These treatments did not differ from the positive control. The treatment of the

EES at 2.5 mg mL^{-1} also did not differ from the treatment characterized by the use of propiconazole and presented a result significantly higher than the negative control (Figure 4C).

Figure 4 - *In vitro* mycelial growth inhibition *Lentinus lepideus* under the effects of ethanolic extract of roots (EER) (A), hexane extract of roots (HER) (B), ethanolic extract of stems (EES) (C) and hexane extract of stems (HES) (D). Where: 0 = negative control; 1 = positive control; 2 = 1.25 mg mL^{-1} ; 3 = 2.5 mg mL^{-1} ; 4 = 5.0 mg mL^{-1}

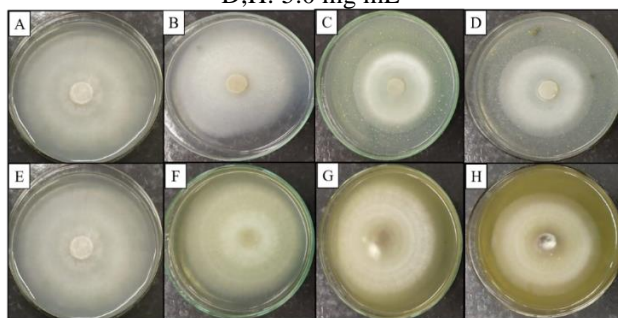


Data are presented as mean \pm SEM (standard error of the mean). Different letters indicate significant differences by Kruskal-Wallis test ($P < 0.05$)

Source: the authors

The results of mycelial growth inhibition and IC_{50} (Table 3) of the extracts against *L. lepideus*, showed that HER stood out (Figure 5). In general, the IC_{50} values using extracts of *P. gaudichaudianum* ranged between 1.49 and 2.62 mg mL^{-1} .

Figure 5 - Antifungal activity evaluation of roots hexane extract (HER) (A-D) and ethanolic extract (EER) (E-H) against *Lentinus lepideus*. Where A;E: negative control; B;F: 1.25 mg mL^{-1} ; C;G: 2.5 mg mL^{-1} ; D;H: 5.0 mg mL^{-1}



Source: the authors

The results of HER against *G. applanatum* and *L. lepideus* demonstrate the potential of this extract to inhibit the mycelial growth of wood decay fungi. Due the complexity of their chemical composition, the more pronounced antifungal activity of HER probably results from interactions of the different components (BAKKALI et al., 2008).

Table 3 - *In vitro* mycelial growth inhibition (%) and half maximal inhibitory concentration IC₅₀ of *Piper gaudichaudianum* extracts on *Lentinus lepideus*. Where: HER: hexane extract of roots; EER: ethanol extract of roots; HES: hexane extract of stems; EES: ethanolic extract of stems

Extract	Conc. (mg mL ⁻¹)	Inhibition mean ± SEM (%)	IC ₅₀ ± SEM (mg mL ⁻¹)
HER	1.25	41.73 ± 2.761	1.49 ± 0.008
	2.5	71.59 ± 3.121	
	5.0	91.44 ± 5.416	
EER	1.25	27.25 ± 1.387	2.48 ± 0.314
	2.5	40.24 ± 0.083	
	5.0	81.24 ± 5.962	
HES	1.25	15.49 ± 2.153	2.62 ± 0.351
	2.5	36.39 ± 0.737	
	5.0	87.88 ± 3.513	
EES	1.25	21.23 ± 0.114	2.06 ± 0.494
	2.5	74.12 ± 0.877	
	5.0	80.77 ± 6.091	

Conc. = Concentrations; SEM = standard error of the mean. IC₅₀ values were calculated by probit method
Source: the authors

Pessini et al. (2005) evaluated the antifungal activity of ethyl acetate extract obtained from *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck (Piperaceae) leaves. These authors reported that, after the extract fractionation, the hexane fraction showed significant anticandidal activity. Additionally, Lucena et al. (2017) found a highest mortality rates of *Anticarsia gemmatilis* (Hübner) and *d Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) using hexane extracts of *Piper aduncum* L. leaves (Piperaceae), that may be related to the higher contents of phenylpropanoid. Rodrigues et al. (2012) evaluated the antifungal activity of *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. (Piperaceae) and described that the dichloromethane and hexane fractions of the ethanolic extract induced the highest inhibition of *Trichophyton rubrum*.

There are several reports about biological activities related to species of the Piperaceae family, but there are few of studies related to extracts of stems and roots of *P. gaudichaudianum*. Batista et al. (2011) investigated extract of the roots, stems, and leaves of *P. gaudichaudianum* and described a prenylated chromene with trypanocidal activity against the Y-strain of *Trypanosoma cruzi*. Additionally, chromenes isolated from *P. gaudichaudianum* stems and *P.*

aduncum leaves exhibited significant anti-trypanocidal activities (BATISTA et al., 2008). Antifungal activity was also described to compounds obtained from *Piper crassinervium* Kunth leaves, *P. aduncum* leaves, *Piper hostmannianum* leaves (Miq.) C. DC., and also to leaves and roots from *P. gaudichaudianum* against *Cladosporium cladosporioides* and *C. sphaerospermum* (LAGO et al., 2004). These authors identified compounds as benzoic acid derivatives, chromenes and flavonoids.

According to Soidrou et al. (2013) the essential oil from *Piper capense* L. f. and *Piper borbonense* (Miq.) C. DC. demonstrated a strong *in vitro* activity against the white-rot fungus *Coriolus versicolor* and the brown-rot ones *Gloeophyllum trabeum*, *Poria placenta* and *Coniophora puteana*. Additionally, the antifungal activity of ethanolic extracts from leaves and inflorescences of *Piper asperiusculum* Kunth and *Piper pertomentellum* Trel. & Yunck. against *Fusarium oxysporum* f. sp. *Passiflorae* and *Colletotrichum tamarilloi* was also previously reported (BAYONA et al., 2018). The authors described the presence of flavonoids, phenols, terpenes and steroids in the studied extracts.

There are several reports on the antifungal activity of benzoic acid derivatives. Parra et al. (2013) isolated a benzoic acid derivative from the inflorescences of *Piper cumanense* Kunth and described the antifungal activity of this substance against *Fusarium oxysporum* and *Botrytis cinerea*. Lago et al. (2009) reported the presence of prenylated benzoic acid derivatives in crude extracts from *P. aduncum* and *P. hostmannianum* leaves, and the activity against *Cladosporium sphaerospermum* and *C. cladosporioides*.

The uses of extractives to preserve wood is of special interest if the extracts originate from a material that is a sustainable byproduct or waste (TCHINDA et al., 2018). In our study, we propose the use of plant parts that are not commonly used to extract EO. Additionally, the use of the evaluated extracts to control wood decay fungi growth has not yet been reported, standing out the originality of this research.

4 CONCLUSIONS

The present study evidenced that extractive yields are specific to stems and roots of *P. gaudichaudianum* and depend directly on the extraction solvent. According to the antifungal biosassays, among the *P. gaudichaudianum* extracts evaluated, the results for HER are the most promising. Based on that, further studies must be carried out to identify the substances present in the extracts. Complementary searches may be conducted to investigate the mode of action of the extracts and their active components, as well as their application in industry.

5 ACKNOWLEDGEMENTS

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001. We thank FAPERGS for the PROBIC scientific initiation grant, and we thank CNPq for the PIBIC scientific initiation grant.

REFERENCES

- BADAWY, M. E. I.; ABDELGALEIL, S. A. M. Composition and antimicrobial activity of essential oils isolated from Egyptian plants against plant pathogenic bacteria and fungi. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 776–782, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.12.003>.
- BAKAR, E. S. Durability of phenolic-resin-treated oil palm wood against subterranean termites and a white-rot fungus. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 85, p. 126–130, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.04.019>.
- BAKKALI, F. *et al.* Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446–475, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>.
- BATISTA, J. M. B. *et al.* Absolute configuration and selective trypanocidal activity of gaudichaudianic acid enantiomers. **Journal of Natural Products**, v. 74, p. 1154–1160, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1021/np200085h>.
- BATISTA, J. M. *et al.* Natural chromenes and chromene derivatives as potential anti-trypanosomal agents. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, n. 3, p. 538–540, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1248/bpb.31.538>.
- BAYONA, W. R. P. *et al.* Chemical and biological characterization of ethanolic extracts obtained from *Piper asperiusculum* and *Piper pertomentellum*. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 23, n. 1, 2018 Available from: <http://revplantasmedicinales.sld.cu/index.php/pla/article/view/576/241>.
- BENTO, T. S. *et al.* Growth inhibition and antioxidant response of wood decay fungi exposed to plant extracts of *Casearia* species. **Letters in Applied Microbiology**, v. 58, n. 1, p. 79–86, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1111/lam.12159>.
- CALDERÓN, A. I. *et al.* Screening of Latin American plants for antiparasitic activities against malaria, Chagas disease, and leishmaniasis. **Pharmaceutical Biology**, v. 48, n. 5, p. 545–553, 2010. DOI: <https://doi.org/10.3109/13880200903193344>.
- CHAABAN, A. *et al.* Chemical composition of *Piper gaudichaudianum* essential oil and its bioactivity against *Lucilia cuprina* (Diptera: Calliphoridae). **Journal of Essential Oil Research**, v. 30, n. 3, p. 159–166, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1080/10412905.2017.1423406>.

CHEMAT, F. *et al.* Review of Alternative Solvents for Green Extraction of Food and Natural Products: Panorama, Principles, Applications and Prospects. **Molecules**, v. 24, n. 16, p. 3007, 2019. DOI: <https://dx.doi.org/10.3390%2Fmolecules24163007>.

DING, T. *et al.* Life cycle assessment of tannin extraction from spruce bark. **iForest - Biogeosciences and Forestry**, v. 10, n. 5, p. 807-814, 2017. DOI: <https://doi.org/dx.doi.org/10.3832/ifor2342-010>.

ELLER, F. J. *et al.* Effect of burgundy solid extracted from Eastern Red Cedar heartwood on subterranean termites and Wood-decay fungi. **Industrial Crops and Products**, v. 144, p. 112023, 2020. DOI: <https://doi.org/dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.112023>.

EVARISTO, I. M.; LEITÃO, M. C. Identificação e Quantificação por DAD-HPLC, da Fracção Fenólica Contida em Folhas de *Quercus suber* L. **Silva Lusitana**, v. 9, n. 2, p. 135–141, 2001. Available from: http://www.scielo.mec.pt/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0870-63522001000200002&lng=pt&nrm=iso.

FINNEY, D. J. **Probit analysis**. London: Cambridge University Press, 1971.

FIOREZE, R.; MORINI, B. Yam (*Discorea* sp) drying with different cuts and temperatures: experimental and simulated results. **Food Science and Technology**, v. 20, n. 2, p. 262-266, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0101-20612000000200023>.

HE, X. *et al.* Genotypic and Environmental effects on the volatile chemotype of *Valeriana jatamansi* Jones. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 1-10, 2018. DOI: <https://doi.org/dx.doi.org/10.3389/fpls.2018.01003>.

LAGO, J. H. G. *et al.* Benzoic acid derivatives from *Piper* species and their fungitoxic activity against *Cladosporium cladosporioides* and *C. sphaerospermum*. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 11, p. 1783–1788, 2004. DOI: <https://doi.org/dx.doi.org/10.1021/np030530j>.

LAGO, J. H. G. *et al.* Prenylated benzoic acid derivatives from *Piper aduncum* L. and *P. hostmannianum* C. DC. (Piperaceae). **Phytochemistry Letters**, v. 2, n. 3, p. 96–98, 2009. DOI: <https://doi.org/dx.doi.org/10.1016/j.phytol.2009.01.001>.

LUCENA, D. C. *et al.* Biological Activity of *Piper aduncum* extracts on *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Erebidae) and *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 89, n. 3, p. 1869-1879, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201720170194>.

NAWAZ, H. *et al.* Effect of solvent polarity on extraction yield and antioxidant properties of phytochemicals from bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 56, p. e17129, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/s2175-97902019000417129>.

PARRA, J. E. *et al.* A new benzoic acid derivative isolated from *Piper* cf. *cumanense* Kunth (Piperaceae). **Phytochemistry Letters**, v. 6, n. 4, p. 590–592, 2013. DOI: <https://doi.org/dx.doi.org/10.1016/j.phytol.2013.07.014>.

PESSINI, G. L. *et al.* Antifungal activity of the extracts and neolignans from *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 6, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0103-50532005000700007>.

PÉRES, V. F. *et al.* Chemical composition and cytotoxic, mutagenic and genotoxic activities of the essential oil from *Piper gaudichaudianum* Kunth leaves. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 9, p. 2389-2395, 2009. DOI: <https://doi.org/dx.doi.org/10.1016/j.fct.2009.06.035>.

PÉRES, V. F. *et al.* Comparison of soxhlet, ultrasound-assisted and pressurized liquid extraction of terpenes, fatty acids and Vitamin E from *Piper gaudichaudianum* Kunth. **Journal of Chromatography A**, v. 1105, n. 1, p. 115–118, 2006. DOI: <https://doi.org/dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2005.07.113>.

PINHEIRO, C. G. *et al.* *Hesperozygis ringens* (Benth.) Epling essential oil: antifungal activity and effect on ergosterol content of wood-decay fungi. **Journal of Essential Oil Research**, v. 33, n. 1, p. 1-11, 2021. <https://doi.org/10.1080/10412905.2020.1840450>.

PUHL, M. C. M. N. *et al.* Antimicrobial activity of *Piper gaudichaudianum* Kuntze and its synergism with different antibiotics. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 16, n. 12, p. 9925–9938, 2011. DOI: <https://doi.org/dx.doi.org/10.3390/molecules16129925>.

RAMOS, C. S. *et al.* Electrophysiological responses of the *Naupactus bipes* beetle to essential oils from Piperaceae species. **Natural Product Communications**, v. 7, n. 8, p. 1103-1106, 2012. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22978240>.

RODRIGUES, E. R. *et al.* *Pothomorphe umbellata*: Antifungal activity against strains of *Trichophyton rubrum*. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 22, p. 265—269, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mycmed.2012.05.005>.

SCALERANDI, E. *et al.* Understanding synergistic toxicity of terpenes as insecticides: contribution of metabolic detoxification in *Musca domestica*. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p.1579, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01579>.

SILVA, A. C. A. *et al.* Effect of the essential oils from *Piper* sp. and blue led lights in the enhancement of the antibiotic activity of drugs against MDR bacterial strains. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 199, p. 111604, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2019.111604>.

SOBRAL, M. *et al.* **Flora Arbórea e Arborescente do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: RiMa Novo Ambiente, 2013.

SOIDROU, S. H. *et al.* Fungicidal activity of four essential oils from *Piper capense*, *Piper borbonense* and *Vetiveria zizanioides* growing in Comoros against fungi decay wood. **Journal of Essential Oil Research**, v. 25, n. 3, p. 216–223, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1080/10412905.2013.767758>.

SPEROTTO, A. R. M. *et al.* Cytotoxic mechanism of *Piper gaudichaudianum* Kunth essential oil and its major compound nerolidol. **Food and Chemical Toxicology**, v. 57, p. 57–68, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.03.013>.

TASCIOGLU, C. *et al.* Antifungal properties of some plant extracts used as wood preservatives. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 85, p. 23–28, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.06.004>.

TCHINDA, J. B. S. *et al.* Inhibition of fungi with wood extractives and natural durability of five Cameroonian wood species. **Industrial Crops and Products**, v. 123, n. 1, p. 183–191, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.06.078>.

YU, J. Thermal stability of major classes of polyphenols in skins, seeds and stems of grape pomace. *In*: CÂMARA, S J. **Grapes: Production, Phenolic Composition and Potential Biomedical Effects**. Nova Science Publishers, 2014. p. 273–285.

4 MANUSCRITO 3 Development of nanoemulsions containing *Piper gaudichaudianum* Kunth essential oil and influence of collection site on its chemical composition

Nadia Helena Bianchini^a, Samantha Nunes de Godoi^b, Carlos Garrido Pinheiro^a, Bibiana Fontana Batista^a, Guilherme Elias Andrade^c, Aline Ferreira Ourique^b, Berta Maria Heinzmann^{a,d}

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

^b Programa de Pós-Graduação em Nanociências, Centro Universitário Franciscano, Santa Maria, RS, BR. CEP 97010-030, Brasil.

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

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

Development of nanoemulsions containing *Piper gaudichaudianum* Kunth essential oil and influence of collection site on its chemical composition

ABSTRACT

The leaves essential oil (EO) of *Piper gaudichaudianum* Kunth (Piperaceae) has great potential to be used due to the various biological activities already described for this species. Based on that, this work describes a comparative study between the chemical compositions of essential oils (EOs) from different vegetative parts of *P. gaudichaudianum*, and the interference of the collection site in the chemical composition of the EOs. Also, it was to develop a nanoemulsion containing *P. gaudichaudianum* EO and analysis of the stability under different storage conditions was performed. The EO was obtained by hydrodistillation of the plant material in clevenger apparatus for 3 hours. Afterwards, the extraction yield and density of the OE were determined and the extracts were analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) and the compounds were quantified by gas chromatography with a flame ionization detector (CG-FID). The nanoemulsion were prepared by high energy emulsification method. According to the Cluster analysis and principal component analysis, there was no difference between the chemical composition of the EOs obtained from leaves, stems collected in the same site. However, the density of stems EO was lower than leaves EO ($P = 0.0011$). Furthermore, we evidenced a difference between the chemical compositions of the leaves EOs collected in different regions, while the roots EOs did not differ. According to the results, we recommend hydrodistillation of the entire aerial part of *P. gaudichaudianum* to obtain EO. Regarding the nanoemulsion, the formulation showed stability when stored at room temperature and under refrigeration.

Keywords: Nanotechnology. Stability study. Piperaceae. Chemical variability. Cluster analysis. Principal component analysis.

1 INTRODUCTION

Essential oils (EOs) are complex mixtures of low molecular weight volatile compounds produced and secreted by specialized secretory tissues spread in plant organs, such as leaves, branches and roots. The chemical composition is highly variable, both inter and intraspecifically. These differences may be related to factors such as polymorphism, extraction method used, part of the plant used for extraction, pre-treatment of plant material before extraction, geographical differences, environmental conditions such as soil, climate and relief (AMARAL et al., 2015; SHARIFI-RAD et al., 2017; TOHIDI; RAHIMMALEK; TRINDADE, 2019).

Brazil has a great potential to produce EOs due to its the wide flora biodiversity. The Brazilian extensive territorial area results in great ecological variations with the formation of

different biomes (STEHMANN; SOBRAL, 2017). However, this potential has not been adequately exploited. Despite the rich biodiversity of the Brazilian flora, in 2018 it ranked 13th among the main exporting countries of EOs in the world, showing a grow rate of only 0.8% between 2017 and 2018, while global growth of this sector was 9.0% in the same period (UNITED NATIONS DEPARTMENT OF ECONOMIC AND SOCIAL AFFAIRS, 2018). According to the same institution, Ireland (27.1%), USA (9.3%) and France (9.1%) were the top exporters in 2018. India was the country with a highest trade value in exports than in EO imports in 2019, with Brazil ranking third (OBSERVATORY OF ECONOMIC COMPLEXITY, 2021).

Research related to the development of high value-added products from EOs has grown in recent years in several areas. Among them are the use of EOs to combat fungi that infect crops and grains in the field (BOMFIM et al., 2015, 2020; DAS et al., 2019), the development of new drugs to control conventional drug resistant microbes (CHELLAPPANDIAN et al., 2018; CHOUHAN; SHARMA; GULERIA, 2017; NAZZARO et al., 2019; WANG et al., 2019), the evaluation of cytotoxicity on tumour cells (MAGGI et al., 2019), the use of EOs as botanical insecticides (GAIRE; SCHARF; GONDHALEKAR, 2019; PAVELA et al., 2019; POLITI et al., 2017), and as a wood protection agent (CHITTENDEN; SINGH, 2011; MEDEIROS et al., 2016; XIE et al., 2017; ZHANG et al., 2016).

Among the essential oil (EO) producing species, *Piper gaudichaudianum* Kunth (Piperaceae) stands out for its high extraction yield (SCHINDLER; SILVA; HEINZMANN, 2018) and for the several biological activities already described. Among them are insecticide (CHAABAN, 2018; KRINSKI; FOERSTER, 2016), antifungal (MORANDIM-GIANNETTI et al., 2010), larvicidal (MORAIS et al., 2007), cytotoxic (SPEROTTO et al., 2013) and antibacterial (SILVA et al., 2019). Moreover, the leaves EO of this species have density similar to water (SCHINDLER; SILVA; HEINZMANN, 2018), characteristic which probably facilitates the mixing of this extractive with polar solvents, an important property for the development of several products.

Nanotechnology enables the development of formulations containing EOs in order to reduce the volatility, degradation, and instability of its constituents (FLORES et al., 2011). Nanoemulsions are a nanostructured systems of a colloidal dispersion with small oil droplets scattered in an aqueous phase (MOGHIMI et al., 2017). This procedure can improves the bioavailability of chemical compounds, facilitates the permeation through biological barriers and reduces the degradation of compounds (DEVALAPALLY; CHAKILAM; AMIJI, 2007). Therefore, the development of nanostructured systems should benefit silviculture and wood

preservation areas (DING et al., 2011). The purpose of this study was to evaluate the influence of the collection site and the plant organs used for extraction on the EO chemical composition. Additionally, we aimed to develop a nanoemulsion containing *P. gaudichaudianum* EO and analyze its stability under different storage conditions.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 PLANT MATERIAL

The collection of plant material was carried out in two different sites, to verify if the place of collection influences the chemical composition of the EO. Additionally, different parts of the plant were collected to determine if there is a difference in the EO chemical composition between the vegetative parts of this species. All collections were performed during summer, in southern Brazil.

The first collection of *P. gaudichaudianum* was carried out in Santa Maria municipality, in a fragment of native forest (29°40'11''S and 53°46'16''W), where leaves and roots were collected. A voucher specimen was deposited at the Herbarium of the Department of Forest Sciences of Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, Rio Grande do Sul (RS), Brazil (HDCF 7540). Subsequent collection was carried out in a fragment of native forest in Vale Vêneto district, São João do Polêsine municipality (29°41'03''S e 53°31'37''W), where leaves, stems and roots of *P. gaudichaudianum* were collected. A voucher specimen was deposited in the Herbarium of Forest Sciences Department of UFSM (HDCF 7539).

Leaves and roots were separated and EO from fresh leaves were obtained as described below in the corresponding item. The roots were washed and dried in an oven Marconi MAO35 at 45 °C, with air circulation (FIOREZE; MORINI, 2000) for 7 days. After this period, the roots were powder in a Willey Tecnal TE680 knife mill, and then passed through 40-mesh screen. The milled roots were stored in sealed bottles at approximately 4 °C, until EO extraction.

Stems remained in a controlled temperature environment (23 °C) for 15 days (YU, 2014). After drying, they were ground (40-mesh) and mixed. The milled plant material was stored separately (roots and stems) in sealed bottles at approximately 4 °C, until EO extraction. In order to optimize the extractive process, a comparative study between the chemical composition of EO from leaves and stems was carried out. For this purpose, the stems of the plant were also collected.

2.2 EXTRACTION OF ESSENTIAL OILS

Fresh leaves were fragmented in a multiprocessor and subjected to hydrodistillation in a modified Clevenger apparatus for 3 hours. However, to obtain the EOs from roots and stems, dry and ground plant material was used, as described above. All extractions were performed in triplicate.

The obtained hydrolates were subjected to liquid-liquid partition, using distilled hexane as solvent (SILVA et al., 2009). The hexane fractions were dried with anhydrous sodium sulfate (Na_2SO_4) and the solvent was evaporated in a rotary evaporator Buchi R-210 at 30 °C. Then, the extraction yield ($\% \text{ m m}^{-1}$) and density (g mL^{-1}) were calculated. The obtained EOs were stored in amber glass bottles, sealed and kept at 4 °C until chemical analysis performance.

2.3 CHEMICAL CHARACTERIZATION BY GAS CHROMATOGRAPHY

The chemical compositions of the EOs were determined by an Agilent 7890A gas chromatograph coupled to a 5075C mass spectrometer (GC-MS) using a non-polar HP5-MS capillary column (Hewlett Packard, 5% phenylmethylsiloxane, 30 m \times 0.25 mm i.d. \times 0.25 μm film thickness), and electron ionization mode at 70 eV. The carrier gas was helium ($1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$); injector and detector temperatures were set at 150 °C and 280 °C, respectively. The samples were injected in split inlet mode (ratio 1:100). Oven program: 40 °C - 320 °C at 4 °C \cdot min $^{-1}$.

The compounds identification was based on the comparison of retention indices, calculated by linear interpolation, to retention times of an *n*-alkane series and of their mass spectra with authentic samples and with literature data (ADAMS, 2009, NIST 2010). Relative amounts of the components were calculated based on GC peak areas, by gas chromatography with a flame ionization detector (GC-FID). Analysis parameters were the same as mentioned above, with exception of split ratio (1:50) and both injector and detector temperatures (300 °C).

2.4 PREPARATION OF NANOEMULSIONS

The nanoemulsion containing *P. gaudichaudianum* leaves EO were prepared according Godoi et al. (2017), by high energy emulsification method, using Ultra-Turrax®. The concentration of EO in the formulation was 0.75%, chosen according to the results of tests of antifungal activity of this extractive against wood-decay fungi (BIANCHINI et al. 2022, in

preparation). The EO used in the development of the nanoemulsions was a pool of EOs from *P. gaudichaudianum* leaves collected in Vale Vêneto and in Santa Maria.

The oil phase was composed of the *P. gaudichaudianum* EO (0.75%) and sorbitan monooleate (0.37%), and the aqueous phase was composed by polysorbate 80 (0.37%) and ultrapure water. The phases were weighed and homogenized separately on a magnetic stirrer, without heating, for 10 min. The aqueous phase was subjected to high agitation at 10,000 rpm in Ultra-Turrax for 10 min. After this period, while still under agitation, the oil phase was slowly added into the aqueous phase and the agitation was then increased to 17,000 rpm for 1h15min. After preparation, the nanoemulsions were subjected to characterization. An aliquot of *P. gaudichaudianum* EO was subjected to the same storage conditions as the nanoemulsions.

2.5 NANOEMULSION CHARACTERIZATION

For the characterization of nanoemulsions, the parameters average particle size, polydispersity index (PDI), zeta potential, EO content and pH were evaluated. The evaluation of the average particle size and PDI was performed by the dynamic light scattering technique using the Zetasizer equipment (Nano-ZS Zetasizer model ZEN 3600, Malvern, United Kingdom). Through this technique, it was possible to measure the diffusion of particles that moved under Brownian motion and this measurement was converted into size and size distribution. The formulations were diluted in Milli-Q® water previously filtered through a 0.45 µm membrane, and the readings were performed in triplicate.

The evaluation of the zeta potential was performed using the laser Doppler Microelectrophoresis technique using the Zetasizer equipment (Zetasizer® nano-Zs model ZEN 3600, Malvern), and the results are expressed in millivolts (mV). Therefore, the equipment applies an electric field to a solution of molecules, which will move at a velocity related to their zeta potential. The reading of this speed is performed using the laser interferometric technique (light scattering with phase analysis). Thus, it is possible to calculate the electrophoretic mobility and, with this result, finally determine the zeta potential. The formulations were diluted in a 10 mM NaCl solution previously filtered through a 0.45 µm membrane before performing the analyses. All analyzes were performed in triplicate.

The pH of the nanoemulsions was evaluated by readings obtained directly from the formulations using a previously calibrated potentiometer (DM-22, Digimed®). All readings were performed in triplicate

2.6 ANALYSIS OF NANOEMULSION STABILITY

The stability of the formulations was evaluated according to Godoi et al. (2017). Immediately after preparation, the nanoemulsions were characterized and subjected to different storage conditions: at room temperature (25 °C), under refrigeration (4 °C) and in climate chamber (40 °C and 65% humidity) for 0, 7 and 15 days, in triplicate. For analysis purposes, EO at 0.75% and aliquots of pure EO were subjected to the same storage conditions as the nanoemulsions. However, for the free EO, only pH is usually evaluated (GODOI et al., 2017). The control (free EO), was composed of all the reagents used to develop the nanoemulsion. However, it was not subjected to the nanoemulsion process. At each analysis time, the nanoemulsions were evaluated for characterization parameters in each storage condition, as described above. Results comparisons of analysis were performed with data obtained at time zero (after preparation).

2.7 ANALYSIS OF THE NANOEMULSION ESSENTIAL OIL

Piper gaudichaudianum EO was extracted from the nanoemulsions and from the control group (free EO) for the chemical composition analysis, by GC, in order to verify the EO constituents incorporated in the formulations. The extractions were performed according to Godoi et al. (2017). The samples were extracted concomitantly with the stability evaluation under storage in the 3 different conditions, as described above.

For extraction, an aliquot of 100 µL from each group was transferred to a microvial flask and heated at 50 °C for 15 min. Then, 1 mL of hexane was added and the solution was submitted to vortexing for 1 min. The solution was centrifuged for 5 min at 10,000 rpm. The supernatants were collected and analyzed by GC-MS.

2.8 STATISTICAL ANALYSIS

The yield and density of the EOs were submitted to homogeneity of variances and normality tests. Once the data did not fit the assumptions, the non-parametric Mann-Whitney test was performed by GraphPad Prism 6.0 software. The variability of the EO chemical composition between the EOs obtained from different plant parts and the different collection places were evaluated by Cluster analysis (CA) and principal component analysis (PCA). In the PCA analysis, through the objects (plant organs) and variables (EO components) the diagrams

were plotted. The CA is presented as a dendrogram using Ward's method of Hierarchical Clustering, based on the Euclidean distance (BARBOUCHI et al., 2021), by software Past 4.0. The results of the nanoemulsions characterization were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by the Dunnett test, using GraphPad Prism 6.0 software (GODOI et al., 2017).

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 EXTRACTION YIELD AND DENSITY

The leaves EO collected in Vale Vêneto had a density of $0.9492 \pm 0.0135 \text{ g mL}^{-1}$ and the leaves EO collected in Santa Maria showed a density of $0.9956 \pm 0.0085 \text{ g mL}^{-1}$, a value significantly higher than the one obtained in Vale Vêneto ($P = 0.0061$). On the other hand, leaves extractive collected in Santa Maria showed a higher yield than leaves EO collected in Vale Vêneto ($P < 0.0001$) (Table 1).

The yields of roots EOs showed no difference among the plant material collected in Vale Vêneto and in Santa Maria (Table 1). However, the density values of leaves EO obtained in Vale Vêneto were higher ($P = 0.0011$) than the density ($0.5694 \pm 0.0913 \text{ g mL}^{-1}$) and yield ($0.0336 \pm 0.0041\%$) of the stems EO collected in same site. Due to the low yield of EO of roots, it was not possible to quantify the volume and density of this extractive.

Table 1 - Yield and density of the essential oil of *Piper gaudichaudianum* Kunth obtained from vegetative parts collected in Summer in Vale Vêneto and Santa Maria - RS, Southern Brazil.

Leaves	Yield (%)	Density (g mL^{-1})	Roots	Yield (%)
LVS_VV	0.7683 ± 0.1007^b	0.9492 ± 0.0135^b	RTS_VV	0.0946 ± 0.0046
LVS_SM	1.7940 ± 0.1488^a	0.9956 ± 0.0085^a	RTS_SM	0.0984 ± 0.0016

Data are reported as means \pm standard deviations. LVS_VV: essential oil obtained from leaves collected in Vale Vêneto; LVS_SM: essential oil obtained from leaves collected in Santa Maria; RTS_VV: essential oil obtained from roots collected in Vale Vêneto; RTS_SM: essential oil obtained from roots collected in Santa Maria
Source: the authors

The extraction yield of the leaves EO was higher when compared to some previous studies reported in the literature for *P. gaudichaudianum*. Leaves collected in Rio de Janeiro, RJ, Brazil showed yield values in the range of 0.02 to 0.23% (RAMOS et al., 2021), to leaves collected in São Paulo, SP, Brazil the yield ranged from 0.6 to 0.8% (ANDRADE et al., 1998) and to leaves collected in Santa Maria, RS, Brazil, the yield values for this species was in the

range of 1.32 to 1.61% (SCHINDLER; HEINZMANN, 2017). The yield of EOs can be influenced by extrinsic and intrinsic factors, such as plant genetic, geographic variation, seasonal variability as well as method of extraction used (DHIFI et al., 2016), among others.

3.2 CHEMICAL CHARACTERIZATION OF ESSENTIAL OILS

The chemical analysis of leaves EO collected in Vale Vêneto enabled the identification of 13 compounds, totaling 94.92% of the composition. Among the identified compounds, the major ones which stand out are the phenylpropanoids dillapiole and myristicin, and also the sesquiterpenoid α -humulene. All major chemical compounds detected in the EO of stems were phenylpropanoids and they were also found in the leaves EO. They are: myristicin; dillapiole; and apiole. Regarding the roots EO, dillapiole was the only compound that was also present in EO from leaves and stems. The major component found in this extractive was a benzoic acid derivative, detected exclusively in this EO (Table 2).

Table 2 - Chemical composition of *Piper gaudichaudianum* Kunth essential oils from leaves, stems and roots collected in Vale Vêneto –RS, Southern Brazil

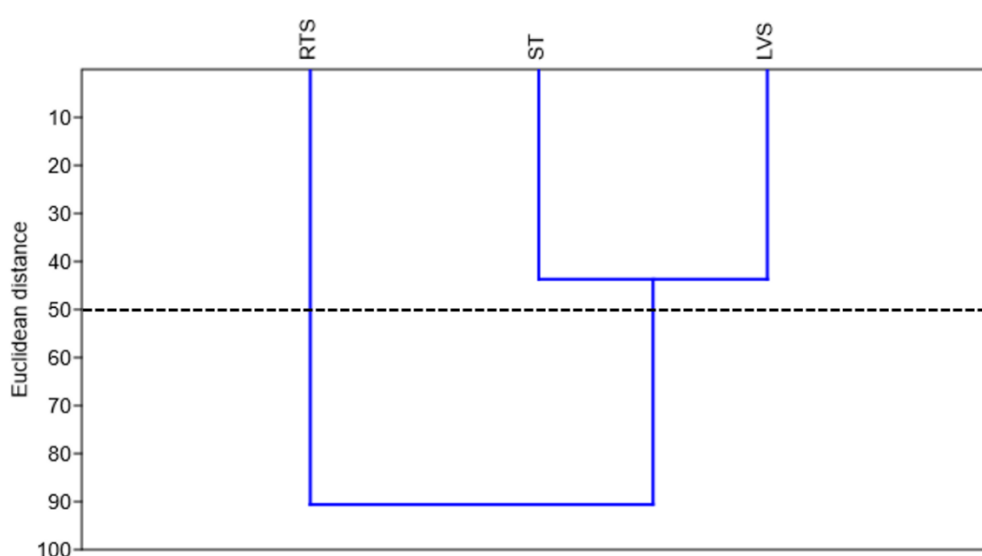
Code	KI ^C	KI ^T	Compound	%		
				LVS_VV	STBR_VV	RTS_VV
1	1099	1098 ^N	Linalool	0.99	-	-
2	1374	1374 ^N	α -Copaene	-	-	1.84
3	1418 - 1419	1417 - 1419 ^N	β -Caryophyllene	6.53	2.37	-
4	1435 - 1437	1439 ^A	α -Guaiene	1.06	-	-
5	1454 - 1455	1453 - 1454 ^N	α -humulene	18.63	9.23	4.90
7	1468	1469 ^N	Aromadendrene	1.39	-	-
8	1488	1489 ^N	Valencene	2.13	-	-
9	1495	1496 ^N	α -Selinene	5.26	-	-
10	1501	1504 ^N	δ -Guaiene	2.15	-	-
11	1519 - 1520	1519 - 1520 ^N	Myristicin	21.32	61.01	-
12	1560 - 1561	1560 - 1562 ^N	Nerolidol	2.74	0.49	-
13	1584	1583 ^N	β -Elemene	0.59	-	-
14	1616 - 1617	1620 ^N	Dillapiole	27.4	14.79	10.36
15	1670	-	HMBBM *	-	-	75.31
16	1672 - 1673	1671 ^N	Apiole	4.73	9.51	-
Σ				94.92	97.40	92.41

Compounds are listed in order of elution on HP5-MS column. KI^C: calculated Kovats index; KI^T: tabulated Kovats index; HMBBM: 4-(3 hydroxy-3-methyl-butenyl)-methyl benzoate (benzoic acid derivative); LVS_VV: essential oil obtained from leaves; STBR_VV: essential oil obtained from stems; RTS_VV: essential oil obtained from roots.

Source: the authors

To correlate the chemical composition of the EOs obtained from different parts of the plant, the Cluster analysis was performed (Figure 1), and resulted in the separation of two distinct groups after the cutting in the Euclidean distance of 50 units. Thus, there is a clear separation between the root EO and the clustering of the EOs obtained from leaves and stems. This grouping is directly related to the chemical compounds presented in the EOs, since the greatest similarity in chemical composition occurs between the EOs of aerial parts.

Figure 1 – Cluster analysis of the chemical composition of *Piper gaudichaudianum* Kunth essential oils from roots, leaves and stems collected in Vale Vêneto - RS, Southern Brazil, using the Ward method



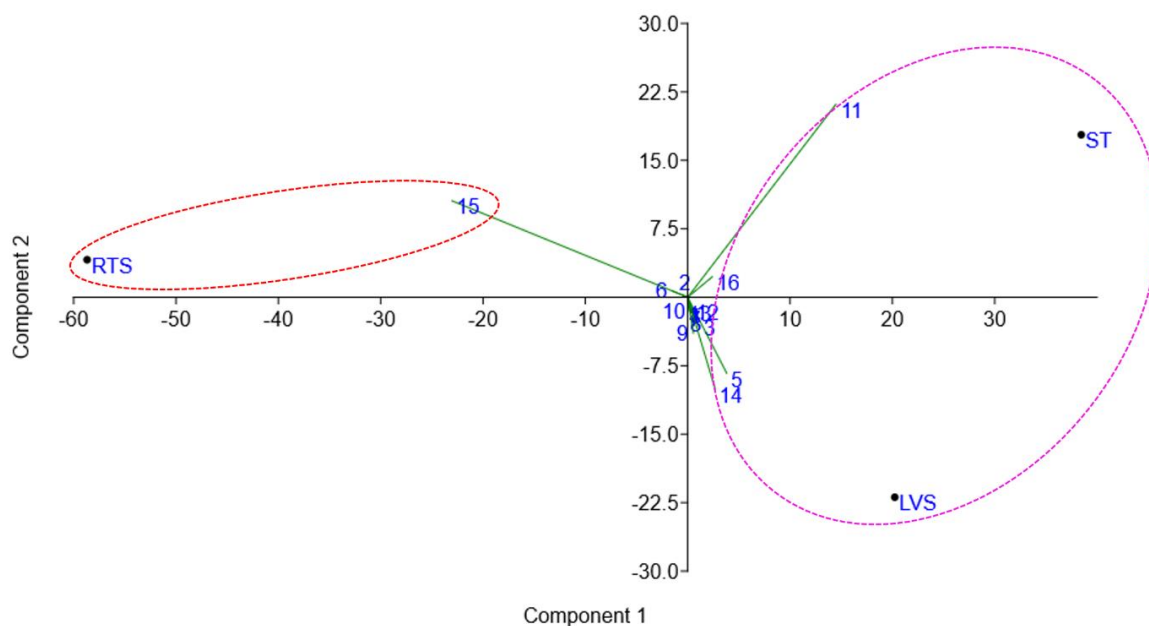
Where: LVS= essential oil obtained from leaves; ST= essential oil obtained from stems; RTS= essential oil obtained from roots.

Source: the authors

To correlate the clusters of the chemical compositions, the principal component analysis was performed (Figure 2) and, according to that, the component 1 explains 86,755% of the variance, and principal component 2 accounts for 13,245% of this variable. Additionally, the chemical compounds 5 (α -humulene), 11 (myristicin), 14 (dillapiole) and 16 (apiole), are common compounds to leaves and also stems OEs (Table 2). These chemical components may contribute for the grouping of leaves and stems OEs.

The chemical compound 15, a derived from benzoic acid (Table 2), is the responsible for the separation of roots OE (Figure 2). Therefore, the principal component analysis confirms the separation of the EOs in groups in the Cluster analysis, indicating that the presence of the chemical compounds shown in Figure 2 influence this separation. Thus, this analysis suggests that the EOs from the aerial parts, i.e. from leaves and stems, can be extracted together, without significative changes in the EO chemical composition.

Figure 2 - Dispersion graph of principal component analysis considering the chemical components of *Piper gaudichaudianum* Kunth essential oils obtained from roots, leaves and stems collected in Vale Vêneto - RS, Southern Brazil.



Where: LVS= essential oil obtained from leaves; ST= essential oil obtained from stems; RTS= essential oil obtained from roots; 5= α -humulene; 11= Myristicin; 14= Dillapiole; 15= HMBBM; 16= Apiole stands out.
Source: the authors

This recommendation reduces one step in the process of extracting the EO, which facilitates the obtention of this extractive on a commercial scale. Additionally, once the density of stems EO was lower than the one of leaves EO, when submitting the entire aerial parts to hydrodistillation, possibly it will be not necessary to perform the liquid-liquid partition of the hydrolate with hexane to obtain the extractive, optimizing the extraction process. These productivity gains are essential to stimulate the obtaining of *P. gaudichaudianum* EO on a commercial scale.

The chemical composition of the EO obtained from leaves and roots of *P. gaudichaudianum* collected in Santa Maria is described in Table 3. Regarding the leaves EO, 14 compounds were identified, corresponding to 98.29% of the extractive. The major chemical compounds were the phenylpropanoid dillapiole, together with the sesquiterpenoids α -humulene and germacrene B. The chemical composition of roots EO enabled the identification of 20 compounds, where the benzoic acid derivative, the phenylpropanoid dillapiole and the sesquiterpenoid α -humulene were the major components of this extractive.

Table 3 - Chemical composition of *Piper gaudichaudianum* essential oil from leaves and roots collected in Santa Maria – RS, Southern Brazil

Code	KI ^C	KI ^T	Compound	%	
				LVS_SM	RTS_SM
1	950	950 ^N	Camphene	-	0.40
2	1002	1001 ^N	α -Phellandrene	-	0.12
3	1027	1025 ^N	Limonene	-	0.18
5	1372	1372 ^N	α -Cubebene	-	0.14
6	1366 - 1374	1374 - 1375 ^N	α -Copaene	0.13	3.44
7	1418 - 1424	1417 - 1425 ^N	β -Caryophyllene	1.80	2.10
8	1434	1434 ^N	β -Cubebene	-	0.53
10	1443 - 1468	1440 - 1469 ^N	Aromadendrene	0.53	-
12	1454 - 1461	1453 - 1462 ^N	α -humulene	4.84	5.46
13	1473	1466 ^A	Ishwarane	-	0.91
14	1473 - 1502	1474 - 150 ^N	α -Muurolene	1.58	1.01
15	1486 - 1492	1485 - 1490 ^N	Germacrene D	0.14	0.38
17	1494 - 1495	1493 - 149 ^N	α -Selinene	0.17	-
18	1499	149 ^N	β -Selinene	-	0.47
19	1500	1500 ^N	Germacrene B	4.17	-
21	1505	1502 ^N	γ -Muurolene	-	0.30
22	1508 - 1522	1505 - 1524 ^N	δ -Cadinene	0.51	0.78
24	1552	1554 ^N	Elemicin	0.15	-
25	1560 - 1566	1560 - 1565 ^N	Nerolidol	0.67	-
26	1582 - 1614	1582 - 1614 ^N	Caryophyllene oxide	0.65	0.47
28	1616	1610 ^N	Humulene epoxide II	0.45	-
29	1622 - 1626	1620 - 1625 ^N	Dillapiole	82.62	10.36
30	1648	1647 ^N	τ -Muurolol	-	0.49
31	1651	1650 ^N	δ -Cadinol	-	0.89
32	1660	1657 ^N	α -Eudesmol	-	0.27
34	1678	-	HMBBM*	-	62.62
Σ				98.39	91.32

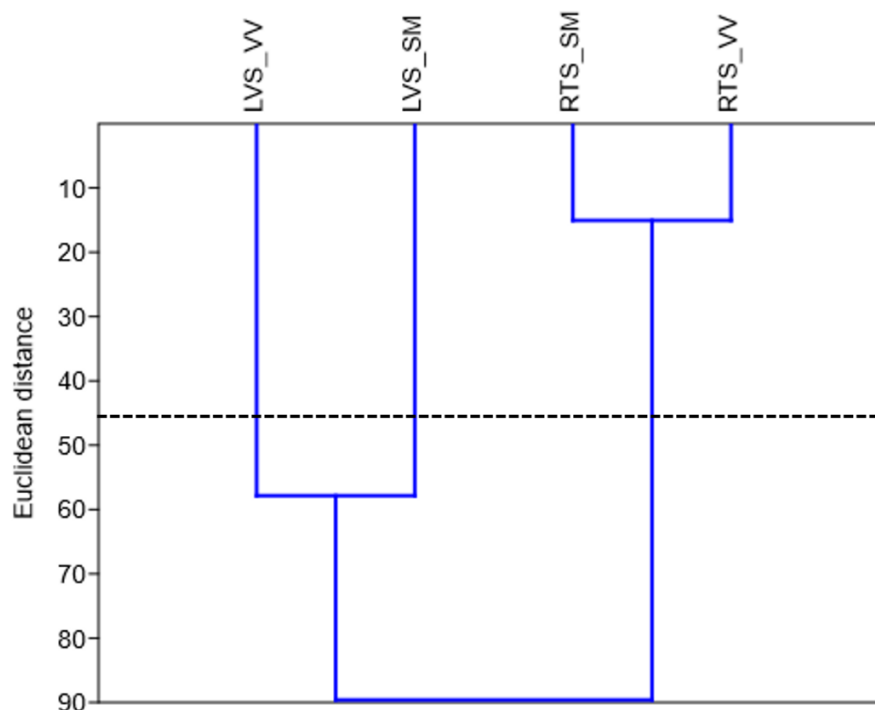
Compounds are listed in order of elution on DB5-MS column. KI^C: calculated Kovats index; KI^T: tabulated Kovats index; HMBBM: 4-(3 hydroxy-3-methyl-butenyl)-methyl benzoate. Where LVS_SM: essential oil obtained from leaves; RTS_SM: essential oil obtained from roots.

Source: the authors

The comparison of the EOs chemical composition by cluster analysis, after cutting the Euclidean distance at 45 units, showed a separation of the OEs from leaves collected in Santa Maria and the EO from leaves collected in Vale Vêneto (Figure 3). Additionally, it is possible to observe the grouping of the EOs obtained from roots collected in both sites. This grouping

is related to the chemical compounds present in the EOs. Thus, to correlate the clusters with the chemical composition of the extractives, the principal component analysis was performed.

Figure 3 - Cluster analysis of the chemical composition of *Piper gaudichaudianum* essential oils from roots and leaves collected in Vale Veneto and Santa Maria - RS, Southern Brazil, using the Ward method



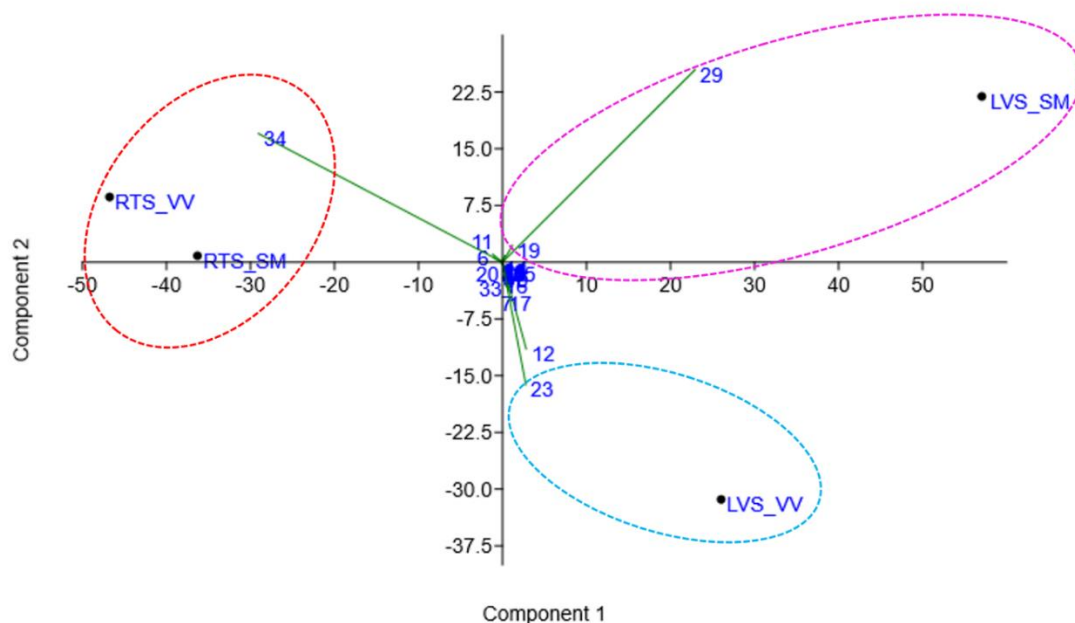
Where: LVS_SM= essential oil obtained from leaves collected in Santa Maria; RTS_SM= essential oil obtained from roots collected in Santa Maria; LVS_VV= essential oil obtained from leaves collected in Vale Vêneto; RTS_VV= essential oil obtained from roots collected in Vale Vêneto.

Source: the authors

According to the principal component analysis (Figure 4), the component 1 explains 82.588% of the variance, and principal component 2 accounts for 17,088% of this variable. According to Table 3, the compound 34 (benzoic acid derivative) was the major chemical component in the roots EO collected at both sites, indicating that this compound influenced the grouping of the roots EOs.

Regarding the leaves EO collected in Santa Maria, an influence of the compounds 29 (dillapiole) and 19 (germacrene B) in the separation of this group was observed (Figure 4). Although the compound 29 was common in all extractives (Table 3), it was present in leaves EO collected in Santa Maria in a percentage at about four times higher when compared to the other extractives. The compound 19 was identified exclusively in the leaves EO collected in Santa Maria (Table 3).

Figure 4 - Dispersion graph of principal component analysis considering the chemical components of *Piper gaudichaudianum* essential oils from roots and leaves collected in Vale Vêneto and Santa Maria - RS, Southern Brazil.



Where: LVS_SM= essential oil obtained from leaves collected in Santa Maria; RTS_SM= essential oil obtained from roots collected in Santa Maria; LVS_VV= essential oil obtained from leaves collected in Vale Vêneto; RTS_VV= essential oil obtained from roots collected in Vale Vêneto; 23= Myristicin; 29= Dillapiole; 34= HMBBM.

Source: the authors

The separation of leaves EO extracted from plants collected in Vale Vêneto can be explained by the presence of the phenylpropanoid myristicin (23). Therefore, the principal component analysis confirms the separation of the groups in the Cluster analysis, demonstrating that the presence of the chemical compounds shown in Figure 4 influences on this separation. Thus, results suggest that the collection site influences the chemical composition of *P. gaudichaudianum* leaves EO. However, this variable does not seem to influence the composition of roots EO.

Regarding the chemical composition of *P. gaudichaudianum* EOs, previous reports indicated that the collection site influences the chemical composition of extractives. Sperotto et al. (2013) analyzed the chemical composition of *P. gaudichaudianum* leaves EO collected in Riozinho (RS, Brazil) and found the four sesquiterpenoids *E*-nerolidol, α -humulene, bicyclogermacrene and *E*-caryophyllene as major compounds. Schindler; Heinzmann (2017) analysed the chemical composition of the leaves EO of the same species collected in Santa Maria (RS) and described as major compounds: dillapiole; α -humulene; β -caryophyllene; and germacrene B. Therefore, the same specie collected in RS, but in different municipalities

showed different major components, evidencing the influence of the collection site on the chemical composition of the extractive.

Additionally, it is known that beyond of the collection site, other factors can also directly influence the chemical composition of EOs. The main determining factor of EOs chemical composition is the genetics of the producing plant, however it can also vary according to its phenology. Moreover, EO chemical composition is also susceptible to variations of external environmental factors, such as luminosity, temperature, water availability, climate, altitude and soil type of the place where the plant was collected. Also, there may be qualitative and quantitative changes in the chemical composition according to the extraction method, the plant organ, besides drying and milling methods previously used (AMARAL et al., 2015; CHOUHAN; SHARMA; GULERIA, 2017; SHARIFI-RAD et al., 2017).

Schindler et al. (2018) verified the effect of seasonality of the EO content in *P. gaudichaudianum* obtained from leaves and reproductive organs collected in Santa Maria and reported that there was no quantitative seasonal variability in the production of leaves EO. Thus, the authors indicated that the collection can be carried out at any time of the year, besides that the plant material can be dried at room temperature without decreasing the EO content. Schindler et al. (2018) complement that the place of collection influenced the chemical composition of *P. gaudichaudianum* leaves EO, but according our results it does not interfere in the composition of its roots extractive.

Ramos et al. (2021) accomplished the chemical composition, seasonal variation and circadian rhythm of EOs from leaves of *P. gaudichaudianum* collected in Rio de Janeiro, Brazil. The main compounds of the EO were the sesquiterpenes bicyclogermacrene, *E*-caryophyllene and eudesmadiene. These authors also report that the variation of chemical profiles was different at phenological stages, however, more intense chemical variation was most perceptible between day and night than the seasons.

3.3 NANOEMULSION CHARACTERIZATION

Visually, the nanoemulsion was physically stable once there was no phase separation in the evaluated period. Table 4 shows the nanoemulsion characterization parameters. The nanometric properties of the nanoemulsion after preparation were adequate, according to Schaffazick et al. (2003), with mean particle diameter under 70 nm and PDI around 0.3. Zeta potential value of the nanoemulsion was -5.09 ± 0.94 mV and it showed an acid pH, as well as the pH value of the free EO (Table 4).

Table 4 – Characterization of the nanoemulsion containing *Piper gaudichaudianum* essential oil at 0.75%, pH after preparation and pH value of the free essential oil

NE 0.75% Size (nm) \pm SD	NE 0.75% PDI \pm SD	NE 0.75% Zeta potential (mV) \pm SD	NE 0.75% pH \pm SD	Free EO 0.75% pH \pm SD
67 \pm 0.89	0.340 \pm 0.02	-5.09 \pm 0.94	5.97 \pm 0.08	6.05 \pm 0.00

Where: PDI = polydispersity index; NE = nanoemulsion; EO = essential oil. Data are expressed as mean \pm standard deviation (SD).

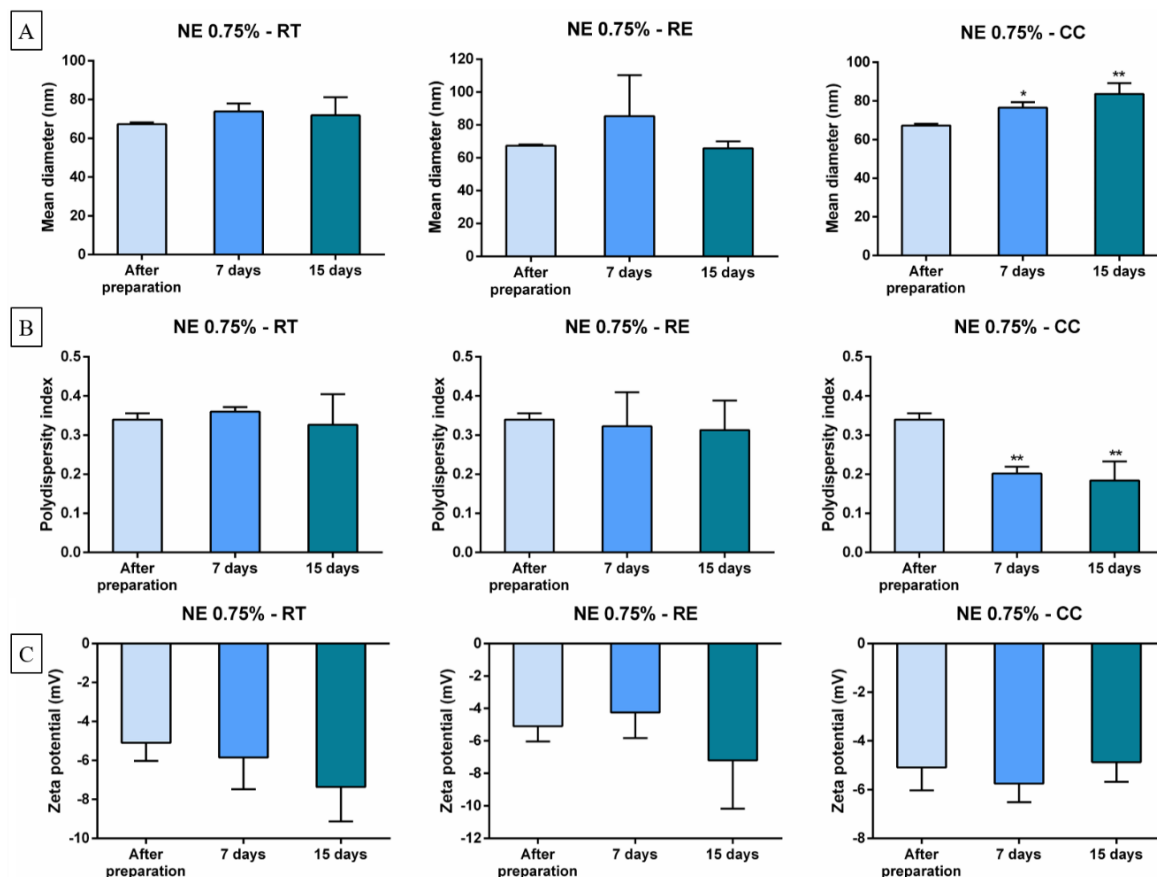
Source: the authors

Regarding to the mean particle diameter, nanoemulsions should show values between 20 and 200 nm (JAHROMI et al., 2018), range that covers the result found in this study. According to Acevedo-Fani et al. (2015), PDI value close to zero indicates droplet size uniformity of the nanoemulsion, which was founded in our study. Another important parameter in the characterization of nanoparticles is the zeta potential, where non-zero values indicate a greater stability of the system (FLORES et al., 2011), which was also detected in our formulation. The negative zeta potential values are related to existence of the polysorbate 80 in the nanoemulsion, due to the coating of the formulation with polysorbate, causing a negative surface density of charge (MARCHIORI et al., 2010). The presence of polysorbate in the formulation creates a spherical interfacial layer that protects the EO, preventing sedimentation and creaming, increasing the stability of the nanoemulsion (VOLPATO et al. 2016).

3.4 STABILITY STUDY

After preparation, the nanoemulsions were maintained in different storage conditions: room temperature (25 °C), under refrigeration (4 °C) and climate chamber (40 °C and 65% humidity) for 15 days. The mean particle diameter of the nanoemulsion stored in climate chamber showed higher values on day 7 (77 \pm 2.79 nm) and on day 15 (84 \pm 5.51 nm) when compared to the formulation right after preparation (67 \pm 0.89 nm) (Figure 5A). Thus, the nanoemulsion did not show appropriate stability when stored in a climatic chamber.

Figure 5 - Average particle diameter (A), polydispersity index (B) and zeta potential (C) of the nanoemulsions in the stability study from 0 to 15 days, under different storage conditions.



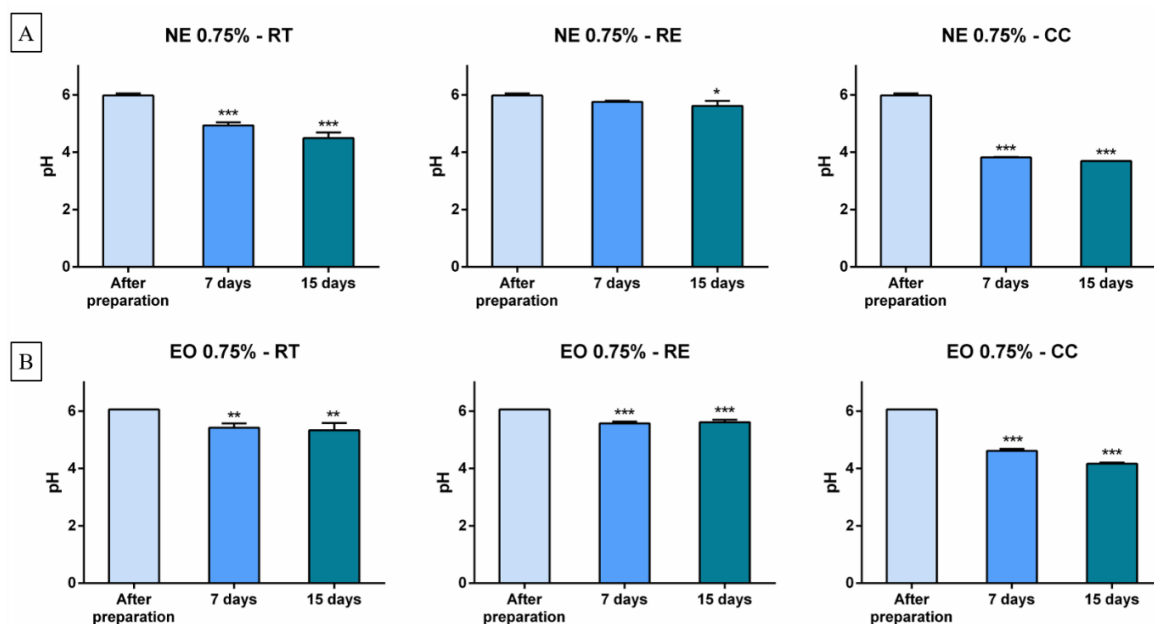
Analyses were performed by one-way variance (ANOVA), followed by Dunnett's test. Values with $p < 0.05$ were considered statistically significant. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$. Where: NE = nanoemulsion; RT = room temperature; RE = under refrigeration; CC = climatic chamber.

Source: the authors

The nanoemulsion stored in a climatic chamber showed a reduction in the polydispersity index (Figure 5B). The polydispersity index values on day 7 (0.202 ± 0.02) and on day 15 (0.184 ± 0.05) were lower than the values after preparation (0.340 ± 0.02). This indicates that, despite the increase in the particle diameter, there was a uniformity in droplet size. However, no statistical difference was observed for the zeta potential values in the evaluated storage conditions (Figure 5C). Therefore, there are no changes in the interface with the dispersing medium to this formulation (SCHAFFAZICK et al., 2003).

The results indicate that the nanoemulsion did not show good stability when stored in a climatic chamber during the evaluation period. According to Sun et al. (2012), the temperature rises can cause an increase in particle size and consequently lead to phase separation of the formulation. Therefore, the best storage conditions for the nanoemulsions were at room temperature and under refrigeration.

Figure 6 – pH value of the nanoemulsion (A) and pH value of the free essential oil (B) in the stability study from 0 to 15 days, under different storage conditions.



Analyses were performed by one-way variance (ANOVA), followed by Dunnett's test. Values with $p < 0.05$ were considered statistically significant. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$. Where: NE = nanoemulsion; EO = free essential oil; RT = room temperature; RE = under refrigeration; CC = climatic chamber.

Source: the authors

Regarding to the pH value, only the nanoemulsion stored under refrigeration did not change the pH value on day 7 (Figure 6A). However, the free EO had a lower pH value on day 7 (5.57 ± 0.07) than the solution after preparation (6.05 ± 0.00) (Figure 6B) when stored under the same conditions. This reduction may be associated with the higher contact of the EO with the aqueous phase (FLORES et al., 2011).

Oliveira et al. (2020) developed a nanoemulsion with *Piper alatipetiolatum* Yunck. EO, and the formulation with spherical morphology had an average size of 316 ± 8 nm, PDI of 0.44 ± 0.01 , zeta potential of -8.5 ± 0.1 mV, and pH around 5. In our study, average size was below 70 nm, PDI around 0.3, zeta potential of -5.09 ± 0.94 and pH 5.97 ± 0.08 (Table 4). Oliveira et al. (2020) corroborate our findings, affirming that pH around 5 does not interfere with the structure or diameter of the spherical particles.

3.5 ANALYSIS OF THE NANOEMULSION ESSENTIAL OIL

The major compound of the *P. gaudichaudianum* EO, dillapiole, was quantified in the nanoemulsion by CG-MS in a content higher than 40%, under all storage conditions (Table 5). After 15 days of storage, the dillapiole content remained around 40% in the nanoemulsion, with

no degradation of the compound over that time. The other main compounds also remained stable in the nanoemulsion under all storage conditions during the evaluation period. Myristicin content remained between 20.0 -21.5%, α -humulene ranged between 6.2 – 8.7%, while apiole varied between 6.6 – 8.4%.

Table 5 – Stability of the compounds in the nanoemulsion containing *Piper gaudichaudianum* essential oil and of the compounds in the free essential oil under different storage conditions

Compounds	%*											
	NE after preparation			NE Day 15			FEO after preparation			FEO Day 15		
	RT	RE	CC	RT	RE	CC	RT	RE	CC	RT	RE	CC
Linalool	1.7	1.9	1.9	2.4	1.8	-	1.8	2.2	2.1	1.8	2.2	1.2
β -Caryophyllene	-	-	-	-	-	-	3.4	3.1	3.4	2.9	2.9	2.3
Aromadendrene	2.3	1.9	1.9	2.2	2.2	-	1.4	1.0	1.1	0.9	1.0	0.9
α -humulene	7.9	6.8	6.2	7.8	8.7	6.9	11.1	10.0	11.1	9.0	10.0	9.1
α -Farnesene	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.0	-
Allo-	-	-	-	-	-	-	1.5	1.0	1.3	-	-	-
Aromadendrene	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(Z,E)- α -Farnesene	-	-	-	-	-	1.0	-	-	-	1.4	-	-
α -Selinene	2.1	1.7	1.6	-	1.8	-	2.8	2.5	2.8	2.3	2.3	-
Myristicin	20.0	20.2	20.1	21.5	21.2	20.3	18.6	19.0	18.8	19.5	19.5	20.0
Nerolidol	4.0	3.7	3.6	2.8	2.9	3.4	3.5	3.5	3.5	3.7	3.6	3.6
Spathulenol	1.0	1.2	1.2	-	0.9	1.0	1.1	1.0	1.3	1.0	1.1	0.9
Caryophyllene oxide	2.1	2.1	1.9	-	1.5	2.0	2.0	2.0	2.1	2.1	1.9	2.1
1,5,5,8-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tetramethyl-12-oxabicyclo[9.1.0]dodeca-3,7-diene	1.9	2.1	2.0	1.8	1.4	0.9	1.9	1.8	-	-	1.9	-
Dillapiole	42.9	44.1	44.0	46.8	46.8	48.9	39.2	39.7	38.9	41.1	41.2	45.0
tau.-Muurolol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.6	-	-
Apiole	8.4	8.4	8.4	7.4	7.0	6.6	7.4	7.2	6.2	8.3	7.7	7.7
Σ	94.8	94.2	93.1	92.7	96.3	91.2	95.6	92.2	92.5	94.8	96.1	92.7

Compounds are listed in order of elution on DB5-MS column. *Percentage obtained by gas chromatography coupled to mass spectrometry. Where: NE = nanoemulsion; FEO = free essential oil; RT = room temperature; RE = refrigeration; CC = climatic chamber.

Source: the authors

Regarding to the content of chemical compounds in the free EO, most compounds also remained stable. According to Table 5, the percentage of the major compound dillapiole ranged from 39.2 – 45%, while α -humulene varied between 9.1 – 11.1, and to apiole, the range was 6.2 – 8.3%. In the nanoemulsion, alterations in linalool, aromadendrene and α -selinene were detected, where the compounds were not identified in the nanoemulsion stored at climatic chamber for 15 days. According to Table 5, β -caryophyllene was present only in the free EO. Possibly this low molecular weight compound degraded during the EO emulsification. However, it is highlighted that the major compounds of EO remained stable under all storage conditions in the evaluated period.

Table 6 – Stability of the compounds of the *Piper gaudichaudianum* essential oil under different storage conditions

Compounds	RT	KI C	KI T	%*		
				RT	RE	CC
α -Pinene	9.30	931	935	0.13	0.14	-
β -Pinene	10.96-10.97	973	976-980	0.13	0.15	0.11
Linalool	15.93-15.94	1100	1100	1.29	1.29	1.28
β -Cubebene	25.49-25.50	1374-1375	1377	0.41	0.42	0.38
α -Gurjunene	26.57-26.58	1408	1409	0.14	0.14	0.13
Aromadendrene	26.86-26.87	1417-1418	1418	6.72	6.60	6.46
β -Gurjunene	27.18	1428	1433	0.32	0.32	0.31
Neoclovene	27.47	1437	1453	3.57	-	-
Allo-Aromadendrene	27.47-27.48	1437	1432	-	3.52	3.52
Seychellene	27.62	1442	1460	0.18	0.19	0.19
α -humulene	27.93	1452	1454	15.84	15.58	15.58
γ -Gurjunene	28.18	1460	1460	3.23	3.19	3.19
α -Amorphene	28.65-28.67	1476	1479	0.36	0.39	0.39
Germacrene D	28.78- 28.79	1480	1480	0.36	0.37	0.37
Valencene	28.93	1484	1483	1.48	1.75	1.75
α -Selinene	29.26	1495	1496	5.07	5.28	4.77
α -Muurolene	29.38-29.40	1494-1500	1494	0.40	0.44	0.40
δ -Guaiene	29.55-29.56	1500-1505	1503	1.95	2.15	1.86
γ -Cadinene	29.78	1513	1512	-	-	0.51
δ -Cadinene	29.78-29.89	1508-1516	1515-1518	0.47	0.50	0.13
Myristicin	30.06-30.07	1519-1523	1526	13.15	13.08	13.35
α -Calacorene	30.64	1539	1542	0.11	-	-
Elemicin	31.12-31.13	1557-1559	1556	0.33	0.31	0.26
Nerolidol	31.29	1563-1565	1565	3.36	3.39	3.40
Spathulenol	31.63	1575-1576	1576	1.13	1.09	1.23
Caryophyllene oxide	31.80-31.81	1581-1582	1581	1.79	1.83	1.88
1,5,5,8-Tetramethyl-12-oxabicyclo[9.1.0]dodeca-3,7-diene	32.53-32.54	1603- 1608	1606	1.62	1.63	1.70
Dillapiole	33.05-33.06	1623-1627	1622	26.66	26.45	26.94
tau.-Cadinol	33.44-33.45	1638-1641	1638	0.47	0.46	
δ -Cadinol	33.58-33.60	1643-1646	1639	0.12	0.13	
Cubenol	33.80	1654	1650	-	-	0.72
α -Himachalene	33.80-33.81	1651-1654	1649	0.70	0.73	
Apiole	34.62-34.63	1683-1684	1681	6.03	6.12	6.01
	Σ			97.73	97.64	97.44

Compounds are listed in order of elution on DB5-MS column. *Percentage obtained by gas chromatography coupled to mass spectrometry. Where: NE = nanoemulsion; FEO = free essential oil; RT = room temperature; RE = refrigeration; CC = climatic chamber; RT = retention time; KI C = calculated Kovats index; KI T= tabled Kovats index.

Source: the authors

Table 6 shows the chemical composition of pure *P. gaudichaudianum* EO stored in three storage conditions: in room temperature, under refrigeration and in climatic chamber. The major compound dillapiole showed a percentage ranging from 26.45-26.94%, whereas α -humulene and apiole remained around 15% and 6%, respectively (Table 6). Notably, the results indicate that there was no degradation of the major compounds during the analyzed period.

4 CONCLUSIONS

Based on the results, it is possible to verify the influences of the collection sites on the chemical composition of *P. gaudichaudianum* leaves EO. Additionally, it is possible to recommend that the entire aerial parts can be used in the hydrodistillation process, without separation of leaves from stems, for the evaluated collection site. These informations are essential for obtaining the EO of *P. gaudichaudianum* on a commercial scale, once it increases the productivity of the extractive process and encouraging the development of high value-added products from this extractive. Regarding to the EO content in nanoemulsions, the formulation preserved the percentage of the main EO compounds in the evaluated period. Additionally, the best storage conditions of the formulation are at room temperature (25 °C) and under refrigeration (4 °C).

ACKNOWLEDGMENTS

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001. We thank FAPERGS for the PROBIC scientific initiation grant.

REFERENCES

- ACEVEDO-FANI, A. *et al.* Edible films from essential-oil-loaded nanoemulsions: Physicochemical characterization and antimicrobial properties. **Food Hydrocolloids**, v. 47, p. 168–177, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.01.032>.
- AMARAL, L. P. *et al.* Variabilidad de la composición química del aceite esencial de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez (Lauraceae). **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 14, n. 3, p. 190-205, 2015.
- ANDRADE, E. *et al.* Essential Oils of *Piper gaudichaudianum* Kunth and *P. regnellii* (Miq.) C. DC. **Journal of Essential Oil Research**, v. 10, n. 4, p. 465-467, 1998. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/10412905.1998.9700945>.
- BIANCHINI, N. H. *et al.* Antifungal activity of *Piper gaudichaudianum* Kunth essential oil and ergosterol content of wood rot fungi (in preparation).
- BOMFIM, N. S. *et al.* Antifungal activity and inhibition of fumonisin production by *Rosmarinus officinalis* L. essential oil in *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg. **Food Chemistry**, v. 166, p. 330–336, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.06.019>.

BOMFIM, N. S. *et al.* Antifungal and antiaflatoxic activity of rosemary essential oil (*Rosmarinus officinalis* L.) against *Aspergillus flavus*. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 37, n. 1, p. 153–161, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/19440049.2019.1678771>.

CHAABAN, A. Chemical composition of *Piper gaudichaudianum* essential oil and its bioactivity against *Lucilia cuprina* (Diptera: Calliphoridae). **Journal of Essential Oil Research**, v. 30, n. 3, p. 159–166, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/10412905.2017.1423406>.

CHELLAPPANDIAN, M. *et al.* Traditionally practiced medicinal plant extracts inhibit the ergosterol biosynthesis of clinically isolated dermatophytic pathogens. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 28, n. 1, p. 143–149, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mycmed.2017.11.001>.

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. DOI: <http://dx.doi.org/10.1179/2042645311Y.0000000004>.

CHOUHAN, S.; SHARMA, K.; GULERIA, S. Antimicrobial activity of some essential oils-present status and future perspectives. **Medicines (Basel, Switzerland)**, v. 4, n. 3, p. 58, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/medicines4030058>.

DAS, S. *et al.* Antimicrobial activity, antiaflatoxic potential and *in situ* efficacy of novel formulation comprising of *Apium graveolens* essential oil and its major component. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 160, p. 102–111, 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.07.013>.

DEVALAPALLY, H.; CHAKILAM, A.; AMIJI, M. M. Role of Nanotechnology in Pharmaceutical Product Development. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96, n. 10, p. 2547–2565, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1002/jps.20875>.

DHIFI, W. *et al.* Essential Oils' Chemical Characterization and Investigation of Some Biological Activities: A Critical Review. **Medicines**, v. 3, n. 4, p. E25, 2016. DOI: <https://doi.org/10.3390/medicines3040025>.

DING, X. *et al.* Efficient one-pot synthesis and loading of self-assembled amphiphilic chitosan nanoparticles for low-leaching wood preservation. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, n. 1, p. 58–64, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.04.002>.

FLORES, F. C. *et al.* Nanostructured systems containing an essential oil: protection against volatilization. **Química Nova**, v. 34, p. 968–972, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422011000600010>.

FIOREZE, R.; MORINI, B. Yam (*Discorea* sp) drying with different cuts and temperatures: experimental and simulated results. **Food Science and Technology**, v. 20, n. 2, p. 262–266, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0101-20612000000200023>.

GAIRE, S.; SCHARF, M. E.; GONDHALEKAR, A. D. Toxicity and neurophysiological impacts of plant essential oil components on bed bugs (Cimicidae: Hemiptera). **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 3961, 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-40275-5>.

GODOI, S. N. *et al.* Evaluation of Stability and In Vitro Security of Nanoemulsions Containing *Eucalyptus globulus* Oil. **BioMed Research International**, v. 2017, p. e2723418, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1155/2017/2723418>.

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

JAHROMI, M. A. M. *et al.* Nanomedicine and advanced technologies for burns: Preventing infection and facilitating wound healing. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 123, p. 33-64, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.08.001>.

KRINSKI, D.; FOERSTER, L. A. Toxicity of essential oils from leaves of Piperaceae species in rice stalk stink bug eggs, *Tibraca limbativentris* (Hemiptera: Pentatomidae). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 40, n. 6, p. 676–687, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/1413-70542016406021616>.

MAGGI, F. *et al.* Secondary metabolites, secretory structures and biological activity of water celery (*Apium nodiflorum* (L.) Lag.) growing in central Italy. **Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology**, v. 153, n. 2, p. 325–335, 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/11263504.2018.1492992>.

MARCHIORI, M. L. *et al.* Hydrogel containing dexamethasone-loaded nanocapsules for cutaneous administration: preparation, characterization, and *in vitro* drug release study. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 36, n. 8, p. 962–971, 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.3109/03639041003598960>.

MEDEIROS, F. C. M. DE *et al.* Fungicidal activity of essential oils from Brazilian Cerrado species against wood decay fungi. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 114, p. 87–93, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.06.003>.

MOGHIMI, R. *et al.* Nanoemulsification of *Salvia officinalis* Essential Oil; The Impact on the Antibacterial Activity in Liquid and Vapour Phase. **Journal of Bionanoscience**, v. 11, p. 80–86, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1166/jbns.2017.1407>.

MORAIS, S. M. *et al.* Chemical composition and larvicidal activity of essential oils from *Piper* species. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, n. 10, p. 670–675, 2007. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bse.2007.05.002>.

MORANDIM-GIANNETTI, A. DE A. *et al.* Composition and antifungal activity against *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* and *Cryptococcus neoformans* of essential oils from leaves of *Piper* and *Peperomia* species. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 4, n. 17, p. 1810–1814, 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.5897/JMPR09.303>.

NAZZARO, F. *et al.* Essential Oils and Microbial Communication. In: **Essential oils - oils of nature**. Croatia: Intechopen, 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.85638>.

OBSERVATORY OF ECONOMIC COMPLEXITY. Available on: <https://oec.world/en/profile/hs92/essential-oils>. Access on jan. 2022.

OLIVEIRA, A. C. *et al.* Nanoemulsion Loaded with Volatile Oil from *Piper alatipetiolatum* as an Alternative Agent in the Control of *Aedes aegypti*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 30, p. 667–677, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s43450-020-00092-8>.

PAVELA, R. *et al.* Exploring the Insecticidal Potential of Boldo (*Peumus boldus*) Essential Oil: Toxicity to Pests and Vectors and Non-target Impact on the Microcrustacean *Daphnia magna*. **Molecules**, v. 24, n. 5, p. 879, 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules24050879>.

POLITI, F. A. S. *et al.* Insecticidal activity of an essential oil of *Tagetes patula* L. (Asteraceae) on common bed bug *Cimex lectularius* L. and molecular docking of major compounds at the catalytic site of ClAChE1. **Parasitology Research**, v. 116, n. 1, p. 415–424, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-016-5305-x>.

RAMOS, I. J. *et al.* Advanced Chemophenetic Analysis of Essential Oil from Leaves of *Piper gaudichaudianum* Kunth (Piperaceae) Using a New Reduction-Oxidation Index to Explore Seasonal and Circadian Rhythms. **Plants**, v. 10, p. 2116, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants10102116>.

SCHAFFAZICK, S. R. *et al.* Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas polimericos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726–737, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422003000500017>.

SCHINDLER, B.; SILVA, D. T.; HEINZMANN, B. M. Efeito da sazonalidade sobre o rendimento do óleo essencial de *Piper gaudichaudianum* Kunth. **Ciência Florestal**, v. 28, n. 1, p. 263–273, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20170210>.

SCHINDLER, B.; HEINZMANN, B. M. *Piper gaudichaudianum* Kunth: Seasonal Characterization of the Essential Oil Chemical Composition of Leaves and Reproductive **Engineering, Technology and Techniques**, v. 60, p. 1-11, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2017160441>.

SHARIFI-RAD, J. *et al.* Biological activities of essential oils: from plant chemoecology to traditional healing systems. **Molecules**, v. 22, n. 1, p. 1–55, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules22010070>.

SILVA, A. C. A. *et al.* Effect of the essential oils from *Piper* sp. and blue led lights in the enhancement of the antibiotic activity of drugs against mdr bacterial strains. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 199, 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2019.111604>.

SILVA, R. S. *et al.* Lime essential oil in the teaching of thin layer chromatography. **Química Nova**, v. 32, n. 8, p. 2234–2237, 2009. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422009000800042>.

SPEROTTO, A. R. M. *et al.* Cytotoxic mechanism of *Piper gaudichaudianum* Kunth essential oil and its major compound nerolidol. **Food and Chemical Toxicology**, v. 57, p. 57–68, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2013.03.013>.

STEHMANN, J. R.; SOBRAL, M. Biodiversidade no Brasil. In: SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia: do produto natural ao Medicamento**. Porto Alegre: Artmed, 2017. 233 p.

SUN, H. *et al.* Development and characterization of a novel nanoemulsion drug-delivery system for potential application in oral delivery of protein drugs. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 5529–5543, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.2147/IJN.S36071>.

TOHIDI, B.; RAHIMMALEK, M.; TRINDADE, H. Review on essential oil, extracts composition, molecular and phytochemical properties of *Thymus* species in Iran. **Industrial Crops and Products**, v. 134, p. 89–99, 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.02.038>.

VOLPATO, A. *et al.* Larvicidal and insecticidal effect of *Cinnamomum zeylanicum* oil (pure and nanostructured) against mealworm (*Alphitobius diaperinus*) and its possible environmental effects. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 19, p. 1159–1165, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2016.10.008>.

WANG, L. *et al.* Effects of essential oil citral on the growth, mycotoxin biosynthesis and transcriptomic profile of *Alternaria alternata*. **Toxins**, v. 11, p. 553, 2019. DOI: 10.3390/toxins11100553.

UNITED NATIONS DEPARTMENT OF ECONOMIC AND SOCIAL AFFAIRS. **International Trade Statistics Yearbook**, v. 1, 2018. <https://doi.org/10.18356/7bcd7d96-en>. Access on jan. 2022.

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. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.06.041>.

YU, J. Thermal stability of major classes of polyphenols in skins, seeds and stems of grape pomace. In: CÂMARA, S J. **Grapes: Production, Phenolic Composition and Potential Biomedical Effects**. Nova Science Publishers, 2014. p. 273–285.

ZHANG, Z. *et al.* Antifungal activity of monoterpenes against wood white-rot fungi. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 106, p. 157–160, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.06.041>.

5 DISCUSSÃO

Com relação à atividade antifúngica do OE de *P. gaudichaudianum* frente a fungos apodrecedores da madeira, existem estudos que evidenciam o potencial deste extrativo para o controle destes agentes xilófagos. Schindler (2015) avaliou a atividade antifúngica do OE de folhas e de órgãos reprodutivos (OR) de *P. gaudichaudianum* e do seu composto majoritário frente ao fungo de podridão-branca *P. sanguineus* e de podridão-parda *G. trabeum*. Para *P. sanguineus*, o OE de OR a 0,25 $\mu\text{L mL}^{-1}$ foi eficiente para controlar o crescimento do fungo, enquanto o OE de folhas a 0,5 e 1,0 $\mu\text{L mL}^{-1}$ não diferiram do controle positivo propiconazole.

Cabe ressaltar que Schindler (2015) avaliou o crescimento fúngico até que o tratamento controle atingisse 3/4 da placa, e não até cobrir toda a superfície, como foi realizado no presente estudo. Deste modo, o período que Schindler (2015) utilizou para avaliar o experimento foi menor em relação ao número de dias utilizado neste estudo. Para o fungo de podridão-parda, o mesmo padrão foi observado para o OE de folhas, sendo que para ambas as espécies avaliadas, o OE de folhas apresentou atividade fungitóxica na concentração de 1,0 $\mu\text{L mL}^{-1}$. Adicionalmente, a autora descreve que o dilapiol foi o composto responsável pela atividade antifúngica detectada frente a ambos os fungos avaliados. O mesmo efeito foi observado neste estudo, sendo que o composto majoritário apresentou melhores resultados de inibição de crescimento micelial em relação ao OE.

O OE de raízes de *P. gaudichaudianum* e seu composto majoritário também foram avaliados frente a fungos apodrecedores da madeira. Trés (2017) avaliou a atividade destes extrativos frente ao fungo de podridão-branca *T. versicolor* e de podridão-parda *G. trabeum*. O OE de raízes a 1,0 $\mu\text{L mL}^{-1}$ inibiu totalmente o crescimento do fungo de podridão-branca, apresentando atividade fungicida. A substância isolada em concentração proporcional a sua presença no extrativo apresentou uma inibição de 100%, indicando que possivelmente este composto seja o responsável pela atividade detectada. Entretanto, para o fungo de podridão-parda, apesar do OE não inibir totalmente o crescimento, apresentou o mesmo comportamento que o fungicida comercial Propiconazole. O composto majoritário apresentou menor atividade antifúngica em relação ao controle positivo, indicando que esta substância não foi a única responsável pela atividade detectada.

Deste modo, é possível observar que o micélio das espécies fúngicas utilizadas no presente estudo apresentaram um comportamento distinto frente aos extrativos avaliados em comparação aos fungos estudados por Schindler (2015) e Trés (2017). Como foram utilizados diferentes extrativos vegetais da mesma espécie nos referidos estudos, não surpreende o fato de

que cada micélio reaja de maneira distinta a determinados extrativos vegetais. Isto demonstra que cada espécie fúngica reage de maneira diferente frente à exposição a substâncias que visam inibir o seu crescimento. No caso dos resultados obtidos com os OEs, isto é ainda mais evidente, uma vez que pequenas alterações na composição química do extrativo podem acarretar mudanças na atividade biológica detectada.

Deste modo, ao analisarmos os resultados do Manuscrito 1, observa-se que foi necessário o uso de concentrações mais elevadas para inibir totalmente o crescimento de ambos os fungos avaliados. Ao relacionar a composição química do OE de folhas utilizado neste experimento com o extrativo avaliado por Schindler (2015), observa-se que apesar do composto majoritário ter sido o mesmo, houve alterações nos compostos minoritários. Possivelmente estas variações na composição química também tenham interferido na atividade, considerando que na maioria das vezes pode ocorrer um efeito aditivo, sinérgico ou mesmo potenciação entre os constituintes do OE (DANIELLI et al., 2017), e isto pode modificar a atividade pretendida. No entanto, a ocorrência de antagonismo também já foi relatada entre diferentes componentes de um OE. Neste caso, o composto majoritário isolado, quando testado em concentração proporcional à existente no OE, apresenta uma atividade maior em relação ao extrativo vegetal bruto (PINHEIRO et al., 2021).

De acordo com os resultados obtidos no Manuscrito 1, o composto dilapiol foi mais eficiente para combater o crescimento de ambos os organismos xilófagos em relação ao OE. Isto evidencia que o componente majoritário do OE de folhas de *P. gaudichaudianum* possivelmente seja o responsável pela atividade antifúngica detectada e que o OE contenha substância(s) que antagonize(m) seu efeito. Silva et al. (2016) avaliaram a atividade antifúngica do OE de *Nectandra grandiflora* Nees & Mart. ex Ness. e de seu composto majoritário frente aos fungos apodrecedores *P. sanguineus* e *G. trabeum* e relataram que o fungo causador de podridão-parda apresentou maior vulnerabilidade ao efeito do OE em relação ao constituinte majoritário. Isto evidencia que houve um efeito sinérgico, aditivo ou uma potenciação entre os compostos químicos presentes no OE. Com relação aos testes envolvendo *P. sanguineus* sob efeito do composto majoritário, os resultados não diferiram daqueles encontrados com o OE, indicando que a atividade do OE tenha sido causada pela substância predominante.

Com relação à atividade antifúngica detectada nos Manuscritos 1 e 2, observou-se que em ambos os casos o fungo causador de podridão-parda *L. lepideus* apresentou maior susceptibilidade aos extrativos avaliados em relação ao fungo de podridão-branca. Existem relatos na literatura sobre a maior vulnerabilidade de fungos causadores de podridão-parda na madeira ao efeito de OEs em relação àqueles que causam podridão-branca. No estudo realizado

por Pánek et al. (2014), o fungo de podridão-branca (*T. versicolor*) foi mais resistente ao efeito dos OEs avaliados em relação ao fungo de podridão-parda (*Coniophora puteana*). Bayramoglu; Arica (2009) corroboram ao afirmar que o fungo *T. versicolor* apresentou uma alta produção da enzima extracelular ligninolítica lacase, responsável por degradar a lignina e desativar os compostos fenólicos com alta atividade antifúngica. A produção desta enzima pelos fungos causadores de podridão-branca pode justificar a maior resistência desta classe fúngica aos extrativos vegetais.

Quanto ao modo de ação dos OEs sobre os fungos apodrecedores da madeira, existem diversos relatos demonstrando que a membrana plasmática fúngica é um dos principais alvos para a ação antifúngica destes extrativos vegetais (HU et al., 2017). Conforme mencionado ao longo do presente estudo, a membrana plasmática é responsável pela manutenção de um ambiente homeostático, pela troca de materiais e transferência de energia e informação entre as células, desempenhando um papel vital para os fungos (PERCZAK et al., 2019).

Adicionalmente, o ergosterol é o principal componente da classe dos esteróis na membrana celular fúngica, e atua mantendo a função e a integridade das células, regulando a fluidez e permeabilidade da membrana, controlando a atividade de muitas enzimas ligadas a ela (TIAN et al., 2012). Deste modo, existem relatos que a interrupção das vias biossintéticas de esteróis por substâncias naturais ou sintéticas inibiu o crescimento de fungos apodrecedores da madeira (PINHEIRO et al. 2021), além de espécies como *Candida* spp., *Aspergillus* spp. (BOMFIM et al., 2020), *Fusarium* spp. (AVANÇO et al., 2017), *Alternaria* spp. e espécies de dermatófitos (WANG et al., 2019).

Devido à natureza lipofílica dos constituintes químicos dos OEs e de outros componentes obtidos a partir de plantas, a presença dessas substâncias no meio de cultura pode acarretar em estresse no ambiente celular lipídico, induzindo a uma reprogramação genômica para evitar a desintegração da arquitetura da parede celular (PARVEEN et al., 2004). Adicionalmente, OuYang; Tao; Jing (2016) corroboram ao afirmar que o citral apresentou atividade antifúngica frente ao fungo *Penicillium digitatum*, além de promover uma diminuição na biossíntese do ergosterol. Wang et al. (2019) também relataram que o citral alterou a integridade celular por meio do distúrbio da expressão gênica, o que foi confirmado pela observação de perturbações prejudiciais dos esporos, juntamente com a inibição da biossíntese de ergosterol.

Com relação ao uso de OEs para preservar madeiras, outra vantagem que estes extrativos possuem em relação aos produtos sintéticos é a diminuição do risco de resistência. Devido à complexidade química dos extrativos vegetais, seus compostos podem atuar por meio de

diferentes mecanismos (REINPRECHT, 2010). Existem estudos sobre o surgimento de resistência e de diversos efeitos colaterais com o uso de antifúngicos sintéticos utilizados para o tratamento de doenças, como *Candida* spp. Desta maneira, os autores sugerem que a utilização de OEs associados a antibióticos de uso convencional tenha acarretado um efeito sinérgico, diminuindo o risco de resistência (PANDEY; TRIPATHI; SINGH, 2018).

O uso combinado de OEs com substâncias sintéticas também foi avaliado frente a espécies de dermatófitos, havendo um efeito sinérgico e aditivo, reduzindo a concentração ativa dos agentes antifúngicos sintéticos quando combinados com os OEs (DANIELLI et al., 2017). Deste modo, considerando a elevada toxicidade dos preservantes da madeira de uso convencional, o uso combinado destes produtos com OEs pode ser uma alternativa para reduzir a quantidade utilizada nos tratamentos preservantes.

No que tange à análise da composição química dos extratos de *P. gaudichaudianum* descrita no Manuscrito 2, foi feita a análise por CG-EM apenas para o EHR, que apresentou maior atividade frente aos fungos apodrecedores avaliados. A análise possibilitou a identificação de apenas um composto, evidenciando a necessidade da realização de análises mais complexas para elucidar a estrutura dos demais componentes. Devido à falta de conhecimento destas substâncias, não foi possível identificar a composição dos extratos por UPLC, sendo que para este tipo de análise é necessário realizar análises cromatográficas utilizando padrões junto com as amostras. Entretanto, caso não exista o padrão para ser adquirido comercialmente, uma alternativa seria isolar os compostos por cromatografia em coluna e analisá-los por diferentes métodos espectroscópicos, como o infravermelho e Ressonância Magnética Nuclear (RMN), para elucidar suas estruturas químicas. Na sequência esses compostos poderiam ser utilizados como substâncias de referência para sua identificação e quantificação em extratos.

Esta última opção foi a escolhida por Batista Jr. et al. (2011), que analisaram por HPLC a composição química de folhas, caules e raízes de plantas adultas e plântulas de *P. gaudichaudianum* extraídas com acetato de etila. Os autores isolaram o composto majoritário do extrato de folhas de plantas adultas e analisaram por RMN e *High resolution electrospray ionisation mass spectrometry* (HRESIMS), identificando-o como uma mistura racêmica do ácido gaudichaudiânico, um cromeno prenilado. A partir disso, as análises por HPLC indicaram que, nos extratos das mudas, este composto estava presente apenas nas raízes, enquanto nas plantas adultas foi detectado em todos os órgãos. Deste modo, à medida que a planta se desenvolve, este composto é encontrado também nas partes aéreas, sendo biossintetizado como uma mistura racêmica a partir do estágio de plântulas.

Adicionalmente, foi relatado o uso de RMN para identificar cromenos e derivados isolados a partir do extrato de caules de *P. gaudichaudianum*, que apresentaram atividade tripanocida frente a *Trypanosoma cruzi* (BATISTA et al., 2008). Um estudo semelhante foi realizado por Lago et al. (2004), onde foi relatada a presença de dois cromenos, três ácidos benzóicos prenilados e pinocembrina no extrato de folhas e raízes de *P. gaudichaudianum*, extraídas com diclorometano e metanol. Neste caso, a identificação dos compostos também foi realizada por RMN e HRESIMS, e foi detectada atividade antifúngica do composto pinocembrina frente a *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum*.

Com relação aos resultados obtidos no Manuscrito 3, observou-se que, para a região estudada e para aquela população, é possível recomendar que seja feita a extração de toda a parte aérea da planta, uma vez que a composição química do OE de folhas e caules de *P. gaudichaudianum* não diferiu entre si. Esta informação é importante quando se pensa na obtenção deste extrativo em escala comercial, porque otimiza o processo produtivo, uma vez que elimina a etapa de separação das folhas dos caules antes da hidrodestilação. Outro fato interessante foi que a densidade do OE de caules foi menor em relação a densidade do OE das folhas. Com base no exposto, ao realizar a hidrodestilação de toda a parte aérea, possivelmente a densidade do extrativo obtido seria menor que a densidade do OE obtido apenas de folhas. Dessa forma, a etapa da extração líquido-líquido não seria necessária, diminuindo os custos do processo e acelerando ainda mais o processo de extração.

Entretanto, através da análise multivariada, observou-se que os compostos presentes no OE de raízes desta espécie são diferentes dos extrativos obtidos do restante da planta. Schindler; Heinzmann (2017) relataram que a composição química do OE de folhas e órgãos reprodutivos de *P. gaudichaudianum* também diferiu entre si, onde o fenilpropanoide dilapiol foi o composto majoritário do OE de ambas as partes da planta, durante todas as estações do ano, enquanto miristicina esteve presente apenas nos órgãos reprodutivos. No Manuscrito 3 do presente estudo observou-se que o local de coleta influenciou na composição química do OE de folhas de *P. gaudichaudianum*, apesar dos locais de coleta distarem aproximadamente 48 km entre si. Isto indica que é fundamental avaliar a composição química dos extrativos vegetais, evitando-se generalizações para a mesma região.

Corroborando o exposto, Sperotto et al. (2013), Schindler; Heinzmann, (2017) e Andrade et al. (1998) analisaram o OE de folhas de *P. gaudichaudianum*, coletadas em diferentes cidades do Rio Grande do Sul. Estes autores encontraram diferentes compostos químicos nos extrativos, evidenciando que o local de coleta interfere na composição química dos OEs. Entretanto, mais estudos devem ser realizados para verificar quais fatores estão

envolvidos nestas alterações, como por exemplo tipo de solo, altitude, clima, relevo, disponibilidade hídrica, além da genética da planta.

No caso do presente estudo, apesar de ambas as coletas terem sido realizadas durante o verão e em uma região de mata nativa, alguns fatores variaram entre os locais. Em Santa Maria, a coleta foi realizada em uma região declivosa, sob uma mata nativa densa, onde não havia muita luminosidade. Entretanto, em Vale Vêneto, as coletas foram realizadas próximo a um riacho, em uma região menos declivosa e sob uma mata nativa menos densa, havendo mais luminosidade e umidade na região. Estas variações podem ter influenciado na diferença de composição química detectada.

Marchese; Figueira (2005) ressaltam a importância dos cuidados pré e pós-colheita do material vegetal quando o intuito é a produção de plantas medicinais e aromáticas. Esses autores destacam que os processos pré-colheita como a seleção do material vegetal, as condições climáticas e ambientais durante o plantio, os tratamentos culturais e a época da colheita influenciam na qualidade do produto final. Adicionalmente, o manejo pós-colheita de plantas aromáticas, como o método de coleta, os métodos de secagem empregados e a forma de armazenamento do material vegetal também influenciam na qualidade e no período de conservação desse produto.

Com relação ao uso de OEs para atuar como preservantes da madeira, estes extrativos vegetais e seus compostos são susceptíveis à oxidação, degradação térmica e rápida volatilização, principalmente quando utilizados em ambiente externo (CESPI et al., 2017). Além desses fatores, os OEs de *P. gaudichaudianum* apresentam densidade semelhante à da água e, portanto, podem ser facilmente lixiviados, o que pode ser um problema quando se pensa no uso desta classe de extrativos como preservantes da madeira. Desta maneira, a nanotecnologia surge com uma alternativa atrativa, por meio do desenvolvimento de nanoemulsões a partir do OE bruto. Assim, o uso de formulações desenvolvidas em um sistema adequado pode ser uma abordagem adicional para aprimorar as atividades biológicas do OE de *P. gaudichaudianum*.

As nanoemulsões são desenvolvidas a partir de uma dispersão coloidal contendo pequenas gotículas de OE (20-200 nm) suspensas em uma fase aquosa (MOGHIMI et al., 2017). O uso dessa técnica pode diminuir a volatilidade do extrativo e aumentar a ação de seus compostos ativos (DONSÌ et al., 2012). Desta forma, uma nanoemulsão óleo-água surge como uma alternativa ao uso de OE puros, sendo que esse produto possui pequeno diâmetro de gota, o que fornece metaestabilidade. Outra vantagem é que essas formulações necessitam de baixas concentrações de surfactante, além de possibilitar a diluição sem perda da estrutura inicial (HASKELL, 1998; SEIBERT et al., 2019). Adicionalmente, devido ao seu pequeno tamanho

de gotícula, as nanoemulsões tendem a apresentar melhores propriedades físico-químicas e biológicas em comparação às macroemulsões (ACEVEDO-FANI et al., 2015; LEE et al., 2019).

Kim et al. (2009) relatam que as emulsões de OEs podem ser agregadas após um período mais longo de armazenamento, limitando assim sua adequação para aplicação prática. Os autores ressaltam ainda que o uso de emulsificante pode resultar em perda de estabilidade por evaporação de componentes alcoólicos voláteis, reduzindo a eficácia biológica e induzindo impactos toxicológicos. Desta maneira, é necessário elaborar várias formulações para então eleger a mais estável.

Existem diversos relatos na literatura sobre o efeito benéfico da nanotecnologia na preservação da madeira, uma vez que a adição de técnicas relativamente simples potencializa o efeito de produtos naturais frente aos agentes xilófagos. Cai et al. (2018) relataram que o uso de derivados da β -ciclodextrina como transportadores de liberação sustentada de isotiocianato de alila, um composto organossulfurado obtido da mostarda branca, como preservante natural. Estes autores observaram que a impregnação de madeira com os complexos à base de água possibilitou uma penetração e distribuição mais uniforme do preservante na madeira.

Cespi et al. (2017) desenvolveram uma microemulsão a partir do OE de *Smyrniium olusatrum* L. Estes autores formularam microemulsões estáveis, onde não houve a cristalização dos compostos do extrativo, e a atividade biológica do OE foi mantida. Considerando os diversos benefícios do desenvolvimento de sistemas nanoemulsionados com OEs, no presente estudo utilizou a nanotecnologia como ferramenta para desenvolver nanoemulsões estáveis com OE de *P. gaudichaudianum*, e a estabilidade desta formulação foi avaliada durante 15 dias.

De acordo com os resultados descritos no Manuscrito 3, a nanoemulsão contendo o OE de *P. gaudichaudianum* apresentou propriedades nanométricas adequadas após a preparação. Os valores de tamanho médio de gotícula, índice de polidispersão e potencial zeta estavam dentro do intervalo recomendado (JAHROMI et al., 2018; SCHAFFAZICK et al., 2003) quando armazenadas à temperatura ambiente e sob refrigeração. O valor de pH tanto para as nanoemulsões quanto para o OE livre foi ácido, e está de acordo com a literatura (GÜNDEL et al., 2018).

Entretanto, apesar do pH das nanoemulsões ser ácido, as análises por CG-EM do OE extraído das nanoemulsões demonstraram que os constituintes majoritários dilapiol, miristicina, α -cariofileno e apiol permaneceram estáveis durante o período avaliado, em todas as condições de armazenamento. Contudo, os compostos linalol, aromadendreno e α -selineno não foram identificados no OE extraído da nanoemulsão armazenada em câmara climática durante 15 dias.

Portanto, com base nos resultados encontrados no presente estudo, recomenda-se armazenar a nanoemulsão contendo OE de *P. gaudichaudianum* à temperatura ambiente (25 °C) ou sob refrigeração (4 °C) para garantir a sua estabilidade.

Com relação à análise da composição química do OE livre, os resultados indicam que houve alteração nos compostos allo-aromadendreno, α -selineno e 1,5,5,8-tetrametil-12-oxabicyclo[9.1.0]dodeca-3,7-dieno. Estes compostos não foram identificados quando o OE livre estava armazenados em câmara climática por 15 dias. Para o OE puro armazenado nas mesmas condições que a nanoemulsão, os resultados indicam que não houve alteração nos constituintes majoritários do OE após 15 dias de armazenamento. Entretanto, a análise por CG-EM indicou que quando o OE puro estava armazenado em câmara climática por 15 dias, os monoterpenos α -pineno e β -pineno não foram detectados, demonstrando que houve degradação ou evaporação destes constituintes. Com isso, destaca-se que o nanoemulsão do OE preservou os compostos químicos do extrativo quando armazenado adequadamente. Adicionalmente, acredita-se que a proteção do OE no sistema nanoemulsionado se tornará ainda mais evidente à medida que o tempo de armazenamento das formulações aumentar.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os resultados obtidos no Manuscrito 1, pode-se afirmar que o OE de folhas de *P. gaudichaudianum* inibiu totalmente o crescimento dos fungos apodrecedores da madeira apresentando efeito fungicida, sendo que o fungo causador de podridão-parda *L. lepideus* apresentou maior susceptibilidade ao extrativo. Adicionalmente, observou-se que o composto majoritário possivelmente é o responsável pela atividade detectada, e que tanto o OE quanto o dilapiol reduziram o teor de ergosterol de ambos os fungos avaliados.

Em relação ao Manuscrito 2, os resultados acerca dos extratos hexânicos e etanólicos de caules e raízes de *P. gaudichaudianum* evidenciam que o rendimento de extração depende diretamente do solvente utilizado, e é específico para cada parte da planta avaliada. Quanto à atividade antifúngica detectada, mais uma vez o fungo de podridão-parda *L. lepideus* apresentou maior susceptibilidade, onde destacam-se os resultados obtidos com o extrato hexânico de raízes de *P. gaudichaudianum*.

Com os resultados obtidos no Manuscrito 3, pode-se afirmar que o local de coleta interferiu na composição química e no rendimento de extração do OE de folhas de *P. gaudichaudianum*. Adicionalmente, observou-se que não houve diferença entre a composição química do OE de folhas e caules de *P. gaudichaudianum*. Deste modo, para a região estudada, é possível recomendar que seja realizada a hidrodestilação de toda parte aérea da planta, possibilitando ganhos em produtividade no processo de extração. Adicionalmente, foi possível desenvolver uma nanoemulsão com o OE de folhas de *P. gaudichaudianum*, que conservou sua estabilidade durante o período avaliado quando armazenada à temperatura ambiente e sob refrigeração.

Com base no exposto, afirma-se que este estudo atende a hipótese formulada, uma vez que os extrativos vegetais avaliados inibiram o desenvolvimento dos fungos *G. applanatum* e *L. lepideus*, e um dos mecanismos de ação do OE e do dilapiol foi elucidado. Adicionalmente, foi possível desenvolver uma nanoemulsão estável a partir do OE de folhas de *P. gaudichaudianum*, que apresenta potencial para o desenvolvimento de um biopreservante da madeira.

Sugere-se que mais estudos sejam realizados com a nanoemulsão do OE de folhas de *P. gaudichaudianum*, por meio de testes de apodrecimento acelerado frente a fungos apodrecedores da madeira. Acredita-se que haverá uma diminuição da volatilidade dos compostos do OE e uma maior fixação do extrativo na madeira, potencializando o uso desta formulação como biopreservante da madeira. Dessa forma, poderá haver um estímulo para a

realização de estudos relacionados a propagação desta espécie em grande escala, na forma de um produto florestal não madeireiro. Adicionalmente, poderá estimular o desenvolvimento de estudos relacionados ao pré-tratamento do material vegetal antes da extração de OE, bem como estudos genéticos e de manejo, visando determinar quais são as condições ideais para aumentar a produção de OE pela planta.

REFERÊNCIAS

- ABRUZZI, R. C. *et al.* Relação das propriedades mecânicas e densidade de postes de madeira de eucalipto com seu estado de deterioração. **Revista Árvore**, v. 36, n. 6, p. 1173-1181, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-67622012000600018>.
- ACEVEDO-FANI, A. *et al.* Edible films from essential-oil-loaded nanoemulsions: Physicochemical characterization and antimicrobial properties. **Food Hydrocolloids**, v. 47, p. 168–177, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.01.032>.
- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy**. Illinois: Allured Publishing Corporation, 2009.
- AGBOR, G. A. *et al.* Antioxidant and anti-atherogenic activities of three *Piper* species on atherogenic diet fed hamsters. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 64, n. 4, p. 387–391, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.etp.2010.10.003>.
- AHMAD, A. *et al.* Antifungal activity of *Coriaria nepalensis* essential oil by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against *Candida*. **Yeast**, v. 28, n. 8, p. 611–617, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1002/yea.1890>.
- AKHTAR, Y. *et al.* Effect of chemical complexity of essential oils on feeding deterrence in larvae of the cabbage looper. **Physiological Entomology**, v. 37, n. 1, p. 81–91, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3032.2011.00824.x>.
- ALMEIDA, R. R. P. *et al.* Chemical Variation in *Piper aduncum* and Biological Properties of Its Dillapiolene-Rich Essential Oil. **Chemistry & Biodiversity**, v. 6, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1002/cbdv.200800212>.
- AMARAL, L. P. *et al.* Variabilidad de la composición química del aceite esencial de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez (Lauraceae). **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 14, n. 3, p. 190 - 205, 2015.
- ARANTES, V.; MILAGRES, A. M. F. Relevância de compostos de baixa massa molar produzidos por fungos e envolvidos na biodegradação da madeira. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1586–1595, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000600043>.
- ASTANI, A.; REICHLING, J.; SCHNITZLER, P. Comparative study on the antiviral activity of selected monoterpenes derived from essential oils. **Phytotherapy Research**, v. 24, n. 5, p. 673–679, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1002/ptr.2955>.
- AUGUSTSSON, A. *et al.* Persistent hazardous waste and the quest toward a circular economy: The example of arsenic in chromated copper arsenate-treated wood. **Journal of Industrial Ecology**, v. 21, n. 3, p. 689–699, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1111/jiec.12516>.

AVANÇO, G. B. *et al.* *Curcuma longa* L. essential oil composition, antioxidant effect, and effect on *Fusarium verticillioides* and fumonisin production. **Food Control**, v. 73, p. 806–813, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.09.032>.

BACCEGA, B. *et al.* *In vitro* and *in vivo* activity of the essential oil and nanoemulsion of *Cymbopogon flexuosus* against *Trichomonas gallinae*. **Avicenna Journal of Phytomedicine**, v. 11, n. 1, p. 32–34, 2021. Acesso em: 02 fev. 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7885001/>

BADAWY, M. E. I.; ABDELGALEIL, S. A. M. Composition and antimicrobial activity of essential oils isolated from Egyptian plants against plant pathogenic bacteria and fungi. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 776–782, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.12.003>.

BARBERO-LÓPEZ, A. *et al.* Pyrolysis distillates from tree bark and fibre hemp inhibit the growth of wood-decaying fungi. **Industrial Crops and Products**, v. 129, p. 604–610, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.12.049>.

BARH, D. *et al.* Exoproteome and secretome derived broad spectrum novel drug and vaccine candidates in vibrio cholerae targeted by piper betel derived compounds. **Plos One**, v. 8, n. 1, p. e52773, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052773>.

BARROS, A. M. C. *et al.* Potencial dos análogos do dilapiol para uso em Doenças Negligenciadas, com ênfase para Leishmaniose Cutânea: revisão literária. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n.7, p.73198-73218, 2021. DOI: <https://doi.org/10.34117/bjdv7n7-477>.

BATISTA, J. M. B. *et al.* Absolute configuration and selective trypanocidal activity of gaudichaudianic acid enantiomers. **Journal of Natural Products**, v. 74, p. 1154–1160, 2011. DOI: <https://doi.org/dx.doi.org/10.1021/np200085h>.

BATISTA, J. M. *et al.* Natural chromenes and chromene derivatives as potential anti-trypanosomal agents. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, n. 3, p. 538–540, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1248/bpb.31.538>.

BAYRAMOGLU, M.; ARICA, M. Y. Immobilization of laccase onto poly(glycidylmethacrylate) brush grafted poly(hydroxyethylmethacrylate) films: Enzymatic oxidation of phenolic compounds. **Materials Science and Engineering**, v. 6, n. 1, p. 1990–1997, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2009.03.011>.

BI, Z. *et al.* Identification of antifungal compounds in konjac flying powder and assessment against wood decay fungi. **Industrial Crops and Products**, v. 140, p. 111650, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111650>.

BOMFIM, N. DA S. *et al.* Antifungal and antiaflatoxic activity of rosemary essential oil (*Rosmarinus officinalis* L.) against *Aspergillus flavus*. **Food Additives & Contaminants**, v. 37, n. 1, p. 153–161, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1080/19440049.2019.1678771>.

BROCCO, V. F. *et al.* Potential of teak heartwood extracts as a natural wood preservative. **Journal of Cleaner Production**, v. 142, p. 2093–2099, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.11.074>.

CAI, L. *et al.* β -Cyclodextrins as sustained-release carriers for natural wood preservatives. **Industrial Crops and Products**, v. 130, p. 42–48, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.12.061>.

CARVALHO, W. *et al.* Uma visão sobre a estrutura, composição e biodegradação da madeira. **Química Nova**, v. 32, n. 8, p. 2191–2195, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000800033>.

CESPI, M. *et al.* Microemulsions enhance the shelf-life and processability of *Smyrniium olusatrum* L. essential oil. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 32, n. 3, p. 159–164, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1002/ffj.3367>.

CHELLAPPANDIAN, M. *et al.* Traditionally practiced medicinal plant extracts inhibit the ergosterol biosynthesis of clinically isolated dermatophytic pathogens. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 28, n. 1, p. 143–149, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2017.11.001>.

CHEN, D.-Z. *et al.* Two new sphingolipids from the leaves of *Piper betle* L. **Molecules**, v. 18, p. 11241–9, 2013. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules180911241>.

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. DOI: <https://doi.org/10.1179/2042645311Y.0000000004>.

CHOUHAN, S.; SHARMA, K.; GULERIA, S. Antimicrobial activity of some essential oils-present status and future perspectives. **Medicines**, v. 4, n. 3, p. 58, 2017. DOI: <https://doi.org/10.3390/medicines4030058>.

COGGINS, C. Trends in timber preservation—a global perspective. **Journal of Tropical Forest Science**, v. 20, n. 4, 2008.

DANIELLI, L. J. *et al.* Chemosensitization of filamentous fungi to antifungal agents using *Nectandra* Rol. ex Rottb. species essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 102, p. 7–15, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.03.013>.

DAS, S. *et al.* Antimicrobial activity, antiaflatoxigenic potential and in situ efficacy of novel formulation comprising of *Apium graveolens* essential oil and its major component. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 160, p. 102–111, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.07.013>.

DEFLORIO, G. *et al.* Host responses in the xylem of trees after inoculation with six wood-decay fungi differing in invasiveness. **Botany**, v. 87, p. 26–35, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1139/B08-113>.

DEVALAPALLY, H.; CHAKILAM, A.; AMIJI, M. M. Role of Nanotechnology in pharmaceutical product development. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96, n. 10, p. 2547–2565, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1002/jps.20875>.

DING, T. *et al.* Life cycle assessment of tannin extraction from spruce bark. **iForest - Biogeosciences and Forestry**, v. 10, n. 5, p. 807, 2017. DOI: 10.3832/ifor2342-010.

DONSÌ, F. *et al.* Design of nanoemulsion-based delivery systems of natural antimicrobials: effect of the emulsifier. **Journal of Biotechnology**, v. 159, n. 4, p. 342–350, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.07.001>.

DYER, L.; PALMER, A. **Piper: A Model Genus for Studies of Phytochemistry, Ecology, and Evolution**. US: Springer, 2004. 214 p.

EE, G. C. L. *et al.* Pellitorine, a potential anti-cancer lead compound against HL6 and MCT-7 cell lines and microbial transformation of piperine from *Piper Nigrum*. **Molecules**, v. 15, n. 4, p. 2398–2404, 2010. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules15042398>.

ELLER, F. J. *et al.* Hexadecyl ammonium chloride amylose inclusion complex to emulsify cedarwood oil and treat wood against termites and wood-decay fungi. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 129, p. 95–101, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2018.01.010>.

ENOKI, A.; ITAKURA, S.; TANAKA, H. The involvement of extracellular substances for reducing molecular oxygen to hydroxyl radical and ferric iron to ferrous iron in wood degradation by wood decay fungi. **Journal of Biotechnology**, v. 53, n. 2–3, p. 265–272, 1997. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(97\)01682-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(97)01682-9).

EVARISTO, I. M.; LEITÃO, M. C. Identificação e quantificação por DAD-HPLC, da fracção fenólica contida em folhas de *Quercus suber* L. **Silva Lusitana**, v. 9, n. 2, p. 135–141, 2001.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA**. 6. ed. Brasília: [s. n.], 2019.

FAZOLIN, M. *et al.* Propriedade inseticida dos óleos essenciais de *Piper hispidinervum* C. DC.; *Piper aduncum* L. e *Tanecium nocturnum* (Barb. Rodr.) Bur. & K. Shum sobre *Tenebrio molitor* L. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 1, p. 113-120, 2007. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542007000100017>.

FENG, Y. X. *et al.* Contact toxicity and repellent efficacy of *Valerianaceae* spp. to three stored-product insects and synergistic interactions between two major compounds camphene and bornyl acetate. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 190, p. 110106, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.110106>.

FERREIRA, R. G. *et al.* Antifungal Action of the Dillapiole-rich Oil of *Piper aduncum* against Dermatophytes Caused by Filamentous Fungi. **British Journal of Medicine & Medical Research**, v. 15, n. 2, p. 1-10, 2016. DOI: <https://doi.org/10.9734/BJMMR/2016/26340>.

FESTER, K.; KUTCHAN, T. Introduction to the different classes of natural products. In: OSBOURN, A. E.; LANZOTTI, V. (eds.). **Plant-derived Natural Products: Synthesis, Function, and Application**. Missouri: Springer, 2009. p. 3–50. DOI: https://doi.org/10.1007/978-0-387-85498-4_1.

FIGUEIRAS, A. R. R.; COIMBRA, A. B.; VEIGA, F. J. B. Nanotecnologia na saúde: aplicações e perspectivas. **Boletim Informativo Geum**, v. 5, n. 2, p. 14-26, 2014.

FINATO, A. C. *et al.* Crude leaf extracts of Piperaceae species downmodulate inflammatory responses by human monocytes. **PLoS One**, v. 13, n. 6, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198682>.

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

FLORES, F. C. *et al.* Nanostructured systems containing an essential oil: protection against volatilization. **Química Nova**, v. 34, p. 968–972, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422011000600010>.

FRITSCHI, F. B.; LIN, H.; WALKER, M. A. Scanning electron microscopy reveals different response pattern of four *Vitis* genotypes to *Xylella fastidiosa* infection. **Plant Disease**, v. 92, n. 2, p. 276–286, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-92-2-0276>.

GALVÃO, K. C. S. **Desenvolvimento de nanoemulsões para uso em alimentos e uso tópico**. 2015. 213 p. Tese (Doutorado em Ciências da Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, SP, 2015.

GAÍNZA Y.A. *et al.* *Piper aduncum* against *Haemonchus contortus* isolates: cross resistance and the research of natural bioactive compounds. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 25, n. 4, p. 383–393, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1984-29612016073>.

GERENGI, H. *et al.* Impact of copper chrome boron (CCB) wood preservative on the corrosion of St37 steel. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 53, n. 49, p. 19192–19198, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1021/ie5033342>.

GODOI, S. N. *et al.* Evaluation of Stability and In Vitro Security of Nanoemulsions Containing *Eucalyptus globulus* Oil. **BioMed Research International**, v. 2017, p. e2723418, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1155/2017/2723418>.

GOMES, E. O. *et al.* Synergistic Potential of Dillapiole Combined With Pyrethroids against Mosquitoes. **Vector Biology Journal**, v. 1, n. 3, p. 1-4, 2016. DOI: <https://doi.org/10.4172/2473-4810.1000114>.

GONZÁLEZ-LAREDO, R. F. *et al.* Preservación de la madera usando productos naturales. **Madera y Bosques**, v. 21, 2015. DOI: <https://doi.org/10.21829/myb.2015.210427>.

GUIMARÃES, E. F.; VALENTE, M. C. **Piperáceas – Piper. Flora Ilustrada Catarinense.** Itajaí, Santa Catarina. 2001. 104p.

GUIMARÃES, E. F. *et al.* Piperaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2015. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB12780>>. Acesso em: 10 jan. 2022.

GÜNDEL, S. DA S. *et al.* Evaluation of cytotoxicity, genotoxicity and ecotoxicity of nanoemulsions containing Mancozeb and Eugenol. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 169, p. 207–215, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.11.023>.

GUTAROWSKA, B.; ŻAKOWSKA, Z. Estimation of fungal contamination of various plant materials with UV-determination of fungal ergosterol. **Annals of Microbiology**, v. 60, n. 3, p. 415–422, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13213-010-0057-9>.

HARJU, A. M. *et al.* Chemical factors affecting the brown-rot decay resistance of *Scots pine* heartwood. **Trees**, v. 17, n. 3, p. 263–268, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00468-002-0233-z>.

HARKAT-MADOURI, L. *et al.* Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of essential oil of *Eucalyptus globulus* from Algeria. **Industrial Crops and Products**, v. 78, p. 148–153, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.10.015>.

HASKELL, R. J. Characterization of submicron systems via optical methods. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 87, n. 2, p. 125–129, 1998. DOI: <https://doi.org/10.1021/js970331i>.

HE, X. *et al.* Genotypic and environmental effects on the volatile chemotype of *Valeriana jatamansi* Jones. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 1003, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01003>.

HEINZMANN, B. M.; SPITZER, V.; SIMÕES, C. M. O. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento.** Porto Alegre: Artmed, 2017. p. 167–184.

HENRIKSSON, G.; JOHANSSON, G.; PETTERSSON, G. A critical review of cellobiose dehydrogenases. **Journal of Biotechnology**, v. 78, n. 2, p. 93–113, 2000. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0168-1656\(00\)00206-6](https://doi.org/10.1016/s0168-1656(00)00206-6).

HOSSEINI, S. F. *et al.* Two-step method for encapsulation of oregano essential oil in chitosan nanoparticles: Preparation, characterization and in vitro release study. **Carbohydrate Polymers**, v. 95, n. 1, p. 50–56, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.02.031>.

HU, Y. *et al.* Mechanisms of antifungal and anti-aflatoxigenic properties of essential oil derived from turmeric (*Curcuma longa* L.) on *Aspergillus flavus*. **Food Chemistry**, v. 220, p. 1–8, 2017. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.09.179.

INDÚSTRIA BRASILEIRA DE ÁRVORES – IBÁ. Disponível em: <https://iba.org/>. Acesso em: 07 jan. 2022.

IRITI, M. *et al.* Histo-cytochemistry and scanning electron microscopy of lavender glandular trichomes following conventional and microwave-assisted hydrodistillation of essential oils: a comparative study. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 21, n. 4, p. 704–712, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1002/ffj.1692>.

JAHROMI, M. A. M. *et al.* Nanomedicine and advanced technologies for burns: Preventing infection and facilitating wound healing. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 123, p. 33–64, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.08.001>.

JARAMILLO, A.; MANOS, P. Phylogeny and patterns of floral diversity in the genus *Piper* (Piperaceae). **American Journal of Botany**, v. 88, p. 706–16, 2001. DOI: <https://doi.org/10.2307/2657072>.

JEFFREY, C. S. *et al.* Antiherbivore prenylated benzoic acid derivatives from *Piper kelleyi*. **Journal of Natural Products**, v. 77, n. 1, p. 148–153, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1021/np400886s>.

KALAGATUR, N. K. *et al.* Antagonistic activity of *Ocimum sanctum* L. essential oil on growth and zearalenone production by *Fusarium graminearum* in maize grains. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, 2015. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00892>.

KATSUNG, B. G.; MASTERS, S. B.; TREVOR, A. J. **Basic & Clinical Pharmacology**. 12. ed. San Francisco: McGraw-Hill, 2012.

KEDIA, A. *et al.* Antifungal, antiaflatoxicogenic, and insecticidal efficacy of spearmint (*Mentha spicata* L.) essential oil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 89, p. 29–36, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.10.027>.

KIM, S. *et al.* Phase behavior, microstructure transition, and antiradical activity of sucrose laurate/propylene glycol/the essential oil of *Melaleuca alternifolia*/water microemulsions. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 348, n. 1, p. 289–297, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2009.07.043>.

KIRKER, G. T. *et al.* The role of extractives in naturally durable wood species. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 82, p. 53–58, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.03.007>.

KNAAK, N.; FIUZA, L. M. Potential of essential plant oils to control insects and microorganisms. **Neotropical Biology and Conservation**, v. 5, n. 2, p. 120–132–132, 2010. DOI: <https://doi.org/10.4013/4757>.

KOURNIATIS, L. R. *et al.* Nanoemulsões óleo de laranja/água preparadas em homogeneizador de alta pressão. **Química Nova**, v. 33, n. 2, p. 295–300, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422010000200013>.

KUMAR, A. *et al.* Nanoencapsulated plant-based bioactive formulation against food-borne molds and aflatoxin B1 contamination: Preparation, characterization and stability evaluation in the food system. **Food Chemistry**, v. 287, p. 139–150, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1080/22311866.2019.1576542>.

LAGO, J. H. G. *et al.* Benzoic acid derivatives from *Piper* species and their fungitoxic activity against *Cladosporium cladosporioides* and *C. sphaerospermum*. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 11, p. 1783–1788, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1021/np030530j>.

LEE, J. Y. *et al.* Antibacterial and antioxidant properties of hydroxypropyl methylcellulose-based active composite films incorporating oregano essential oil nanoemulsions. **LWT**, v. 106, p. 164–171, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.02.061>.

LIN, C.Y. *et al.* Contact and fumigant actions of *trans*-cinnamaldehyde against wood-decay fungi evaluated by using solid-phase microextraction. **Wood Science and Technology**, v. 54, n. 1, p. 237–247, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00226-019-01149-1>.

LIU, S. Q. *et al.* Dillapiol: A Pyrethrum Synergist for Control of the Colorado Potato Beetle. **Journal of Economic Entomology**, v. 107, n. 2, p. 797–805, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1603/EC13440>.

MARCHESE, J. A.; FIGUEIRA, G. M. O uso de tecnologias pré e pós-colheita e boas práticas agrícolas na produção de plantas medicinais e aromáticas. **Revista Brasileira de Plantas medicinais**, v. 7, n. 3, p. 86-96, 2005. Acesso em 01 fev. 2022. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/290547157>.

MAXIA, A. *et al.* Chemical Composition and Antifungal Activity of Essential Oils and Supercritical CO₂ Extracts of *Apium nodiflorum* (L.) Lag. **Mycopathologia**, v. 174, p. 61–67, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11046-011-9519-2>.

MGBEAHURUIKE, E. E. *et al.* Bioactive compounds from medicinal plants: Focus on *Piper* species. **South African Journal of Botany**, v. 112, p. 54–69, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2017.05.007>.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Biodiversidade Brasileira**. Disponível em: <https://www.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-brasileira>. Brasília, 2022. Acesso em: 07 jan. 2022.

MOGHIMI, R. *et al.* Nanoemulsification of *Salvia officinalis* essential oil; The impact on the antibacterial activity in liquid and vapour phase. **Journal of Bionanoscience**, v. 11, p. 80–86, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1166/jbns.2017.1407>.

MOHANA, D. *et al.* Antifungal activity of some plant extracts against important seed borne pathogens of *Aspergillus* sp. **Journal of Agricultural Technology**, v. 3, n. 1, 109-119, 2006. Acesso em: 02 fev. 2022. Disponível em: http://ijat-aatsea.com/pdf/JUN_V3_07/9-IJAT2007_12-R.pdf.

MOORE, B. D. *et al.* Explaining intraspecific diversity in plant secondary metabolites in ecological context. **The New Phytologist**, v. 201, n. 3, p. 733-750, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1111/nph.12526>.

MORAIS, S. M. *et al.* Chemical composition and larvicidal activity of essential oils from *Piper* species. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, n. 10, p. 670–675, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bse.2007.05.002>.

MORESCHI, J. C. **Biodegradação e Preservação da Madeira** - Volume III: Métodos de tratamento da madeira: apostila. Paraná: Departamento de Engenharia e Tecnologia Florestal da UFPR, 2011. 53 p.

MOUTAOUAFIQ, S. *et al.* Antifungal activity of *Pelargonium graveolens* essential oil and its fractions against wood decay fungi. **Journal of Essential Oil-Bearing Plants**, v. 22, n. 4, p. 1104–1114, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1080/0972060X.2019.1646164>.

NIEMENMAA, O.; GALKIN, S.; HATAKKA, A. Ergosterol contents of some wood-rotting basidiomycete fungi grown in liquid and solid culture conditions. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 62, n. 2, p. 125–134, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2007.12.009>.

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

OLIVEIRA, J. A. **Efeito do tratamento fungicida em sementes e no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativus* L.) e pimentão (*Capsicum anuum* L.)**. 1991. 131 p. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) - Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, MG, 1991.

OLIVEIRA, J. T. S. *et al.* Influência dos extrativos na resistência ao apodrecimento de seis espécies de madeira. **Revista Árvore**, v. 29, n. 5, p. 819–826, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-67622005000500017>.

OUYANG, Q.; TAO, N.; JING, G. Transcriptional profiling analysis of *Penicillium digitatum*, the causal agent of citrus green mold, unravels an inhibited ergosterol biosynthesis pathway in response to citral. **BMC Genomics**, v. 17, p. 599, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2943-4>.

PANDEY, A. K.; TRIPATHI, S.; SINGH, P. Plant essential oils: a substitute for conventional insecticides against *Tribolium* species (Coleoptera: Tenebrionidae)-achievements and challenges. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v. 51, n. 13–14, p. 696–728, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1080/03235408.2018.1495875>.

PÁNEK, M.; REINPRECHT, L.; HULLA, M. Ten essential oils for beech wood protection - Efficacy against wood-destroying fungi and moulds, and effect on wood discoloration.

BioResources, v. 9, n. 3, p. 5588–5603, 2014. DOI: <https://doi.org/10.15376/biores.9.3.5588-5603>.

PARK, I. K. *et al.* Fumigant activity of plant essential oils and components from horseradish (*Armoracia rusticana*), anise (*Pimpinella anisum*) and garlic (*Allium sativum*) oils against *Lycoriella ingenua* (Diptera: Sciaridae). **Pest Management Science**, v. 62, n. 8, p. 723–728, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1002/ps.1228>.

PARMAR, V. S. *et al.* Phytochemistry of the genus *Piper*. **Phytochemistry**, The International Journal of Plant Biochemistry and Molecular Biology. v. 46, n. 4, p. 597–673, 1997. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(97\)00328-2](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(97)00328-2).

PARVEEN, M. *et al.* Response of *Saccharomyces cerevisiae* to a monoterpene: evaluation of antifungal potential by DNA microarray analysis. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 54, n. 1, p. 46–55, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1093/jac/dkh245>.

PERCZAK, A. *et al.* The inhibitory potential of selected essential oils on *Fusarium* spp. Growth and mycotoxins biosynthesis in maize seeds. **Pathogens (Basel, Switzerland)**, v. 9, n. 1, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/pathogens9010023>.

PINHEIRO, C. G. *et al.* *Hesperozygis ringens* (Benth.) Epling essential oil: antifungal activity and effect on ergosterol content of wood-decay fungi. **Journal of Essential Oil Research**, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1080/10412905.2020.1840450>.

PINHEIRO, C. G. *et al.* A method for evaluating ergosterol content in wood-decay fungi. **Revista Árvore**, v. 44, p. e4410, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1590/1806-908820200000010>.

PINTO, E. *et al.* Antifungal activity of the clove essential oil from *Syzygium aromaticum* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, n. 11, p. 1454–1462, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1099/jmm.0.010538-0>.

PIRES, V. G. A.; MOURA, M. R. Preparação de novos filmes poliméricos contendo nanoemulsões do óleo de melaleuca, copaíba e limão para aplicação como biomaterial. **Química Nova**, v. 40, n. 1, p. 1-5, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20160130>.

POHLIT, A. M.; PINTO, A. C. S.; MAUSE, R. Piper aduncum L.: Planta Pluripotente e Fonte de Substâncias Fitoquímicas Importantes. **Revista Fitos**, v. 2, n. 1, p. 7-18, 2006. Acesso: 22 mar 2022. Disponível em: <https://revistafitos.far.fiocruz.br/index.php/revista-fitos/article/view/37>.

POREP, J. U. *et al.* Ergosterol as an objective indicator for grape rot and fungal biomass in grapes. **Food Control**, v. 37, p. 77–84, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.09.012>.

PRAKASH, B. *et al.* Plant essential oils as food preservatives to control moulds, mycotoxin contamination and oxidative deterioration of agri-food commodities – Potentials and

challenges. **Food Control**, v. 47, p. 381–391, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.07.023>.

PUHL, M. C. M. N. *et al.* Antimicrobial activity of *Piper gaudichaudianum* Kuntze and its synergism with different antibiotics. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 16, n. 12, p. 9925–9938, 2011. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules16129925>.

RAPADO, L. N. *et al.* A benzoic acid derivative and flavokawains from *Piper* species as schistosomiasis vector controls. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 19, n. 4, p. 5205–5218, 2014. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules19045205>.

RAZZAGUI-ABYANEH, M. *et al.* Dillapiol and Apiol as Specific Inhibitors of the Biosynthesis of Aflatoxin G1 in *Aspergillus parasiticus*. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v. 71, n. 9, p. 2329–2332, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1271/bbb.70264>.

REINPRECHT, L. Fungicides for wood protection – World viewpoint and evaluation/testing in Slovakia. *In*: CARISSE, O. **Fungicides**. Rijeka: InTech, 2010. p. 95–122.

REINPRECHT, L. *et al.* Anti-decay potential of five essential oils against the wood-decaying fungi *Serpula lacrymans* and *Trametes versicolor*. **Acta Facultatis Xylogiae Zvolen**, v. 61, n. 2, p. 63–72, 2019. DOI: <https://doi.org/10.17423/afx.2019.61.2.06>.

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

RUSCHEL, D. **O gênero *Piper* (Piperaceae) no Rio Grande do Sul**. 2004. 84 p. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2004.

SADURNÍ, N. *et al.* Studies on the formation of O/W nano-emulsions, by low-energy emulsification methods, suitable for pharmaceutical applications. **European Journal of Pharmaceutical Sciences: Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences**, v. 26, n. 5, p. 438–445, 2005. DOI: <https://doi.org/doi:10.1016/j.ejps.2005.08.001>.

SAHA, S.; VERMA, R. J. *In vitro* and *in silico* study of *Piper nigrum* on cyclooxygenase-2, inducible nitric oxide synthase and antioxidant enzymes. **Journal of Herbal Medicine**, v. 5, n. 2, p. 86–98, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2015.01.005>.

SAKAI, A.; YOSHIMURA, H. Monoterpenes of *Salvia leucophylla*. **Current Bioactive Compounds**, v. 8, p. 90–100, 2012. DOI: <https://doi.org/10.2174/157340712799828205>.

SALEHI, B. *et al.* *Piper* Species: A comprehensive review on their phytochemistry, biological activities and applications. **Molecules**, v. 24, n. 7, p. 1364, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules24071364>.

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

SANTOS, A. P. C. *et al.* Durabilidade natural da madeira de espécies florestais exóticas e nativas. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 18, n. 1, p. 28-32, 2019. Disponível em: <https://e-revista.unioeste.br/index.php/scientiaagraria/article/view/21011>. Acesso em: 2 fev. 2022.

SARAF, A. S. Applications of novel drug delivery system for herbal formulations. **Fitoterapia**, v. 81, n. 7, p. 680–689, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2010.05.001>.

SCALERANDI, E. *et al.* Understanding synergistic toxicity of terpenes as insecticides: Contribution of metabolic detoxification in *Musca domestica*. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 1579, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01579>.

SCHAFFAZICK, S. R. *et al.* Caracterização e Estabilidade Físico-Química de Sistemas Poliméricos Nanoparticulados para Administração de Fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422003000500017>.

SCHINDLER, B. **Óleo essencial de *Piper gaudichaudianum* Kunth: rendimento, composição química e atividade fungitóxica *in vitro***. 2015. 100 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2015.

SCHINDLER, B.; HEINZMANN, B. M. *Piper gaudichaudianum* Kunth: Seasonal characterization of the essential oil chemical composition of leaves and reproductive organs. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 60, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2017160441>.

SEIBERT, J. B. *et al.* Seasonality study of essential oil from leaves of *Cymbopogon densiflorus* and nanoemulsion development with antioxidant activity. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 34, n. 1, p. 5–14, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1002/ffj.3472>.

SHARIFI-RAD, J. *et al.* Biological activities of essential oils: From plant chemoeology to traditional healing systems. **Molecules**, v. 22, n. 1, p. 1–55, 2017. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules22010070>.

SHIGO, A. L. Compartmentalization: a conceptual framework for understanding how trees grow and defend themselves. **Annual Review of Phytopathology**, v. 22, p. 189–214, 1984. Disponível em: <https://www.fs.usda.gov/treearch/pubs/53382>. Acesso em: 02 fev. 2022.

SILVA, A. C. A. *et al.* Effect of the essential oils from *Piper* sp. and blue led lights in the enhancement of the antibiotic activity of drugs against mdr bacterial strains. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 199, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2019.111604>.

SILVA, D. T. *et al.* Chemical composition and inhibitory effects of *Nectandra grandiflora* leaves essential oil against wood decay fungi. **Drewno : prace naukowe, doniesienia, komunikaty**, v. 59, n.197, 2016. DOI: <https://doi.org/10.12841/wood.1644-3985.C29.10>.

SILVA, E. *et al.* Unraveling Asian Soybean Rust metabolomics using mass spectrometry and Molecular Networking approach. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56782-4>.

SILVA, J. K. *et al.* Essential oils from neotropical *Piper* species and their biological activities. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 12, p. 2571, 2017. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms18122571>.

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

SOBRAL, M. *et al.* **Flora Arbórea e Arborecente do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: RiMa Novo Ambiente. Ed. 2, 2013. 357 p.

SOLANS, C. *et al.* Nano-emulsions. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 10, n. 3, p. 102–110, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2005.06.004>.

SOLIMAN, G. M. Nanoparticles as safe and effective delivery systems of antifungal agents: Achievements and challenges. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 523, n. 1, p. 15–32, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.03.019>.

SOUZA, M. T. *et al.* Chemical composition of essential oils of selected species of *Piper* and their insecticidal activity against *Drosophila suzukii* and *Trichopria anastrephaei*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 12, p. 3056–13065, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-020-07871-9>.

SPEROTTO, A. R. M. *et al.* Cytotoxic mechanism of *Piper gaudichaudianum* Kunth essential oil and its major compound nerolidol. **Food and Chemical Toxicology**, v. 57, p. 57–68, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.03.013>.

SPRINGOB, K.; KUTCHAN, T. M. Introduction to the different classes of natural products. *In*: OSBOURN, A. E.; LANZOTTI, V. **Plant-derived natural products: synthesis, functions and application**. New York: Springer, 2009. p. 3.

STANGERLIN, D. M. *et al.* Resistência natural da madeira de três espécies amazônicas submetidas ao ataque de fungos apodrecedores. **Revista Ciência da Madeira (Brazilian Journal of Wood Science)**, v. 4, n. 1, p. 15–32, 2013. DOI: <https://doi.org/10.15210/cmadv4i1.4056>.

STEHMANN, J. R.; SOBRAL, M. Biodiversidade no Brasil. *In*: SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia: do produto natural ao Medicamento**. Porto Alegre: Artmed, 2017. 233p.

TAK, J. H.; JOVEL, E.; ISMAN, M. B. Comparative and synergistic activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil constituents against the larvae and an ovarian cell line of the cabbage looper, *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae). **Pest Management Science**, v. 72, n. 3, p. 474–480, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1002/ps.4010>.

TASCIOGLU, C. *et al.* Antifungal properties of some plant extracts used as wood preservatives. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 85, p. 23–28, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.06.004>.

TASLEEM, F. *et al.* Analgesic and anti-inflammatory activities of *Piper nigrum* L. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 7S1, p. S461-468, 2014. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(14\)60275-3](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(14)60275-3).

TAYLOR; A. M.; GARTNER, B. L.; MORRELL, J. J. Heartwood formation and natural durability - a review. **Wood and Fiber Science**, v.34, n. 4, p. 587-611, 2002.

TEOH, Y. P.; DON, M. M.; UJANG, S. Assessment of the properties, utilization, and preservation of rubberwood (*Hevea brasiliensis*): a case study in Malaysia. **Journal of Wood Science**, v. 57, n. 4, p. 255-266, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10086-011-1173-2>.

THIN, D. B. *et al.* Chemical analysis of essential oils of *Piper laosanum* and *Piper acre* (Piperaceae) from Vietnam. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 21, n. 1, p. 181–188, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1080/0972060X.2018.1424040>.

TIAN, J. *et al.* The mechanism of antifungal action of essential oil from dill (*Anethum graveolens* L.) on *Aspergillus flavus*. **Plos One**, v. 7, n. 1, p. e30147, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.05.018>.

TOHIDI, B.; RAHIMMALEK, M.; TRINDADE, H. Review on essential oil, extracts composition, molecular and phytochemical properties of *Thymus* species in Iran. **Industrial Crops and Products**, v. 134, p. 89–99, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.02.038>.

TOMAR, S. S.; MAHESHWARI, M. L.; MUKERJEE, S. K. Synthesis and synergistic activity of dillapiole based pyrethrum synergists. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 27, n. 3, p. 547-550, 1979. Acesso em: 18 mar. 2022. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf60223a012>.

TRÉS, J. **Rendimento e composição química do óleo essencial de raízes de *Piper gaudichaudianum* Kunth e atividade fungitóxica *in vitro***. 2017. 83 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2013.

VICIOLE, E.; CASTILHO, P.; ROSADO, C. *In vitro* and *in vivo* assessment of the effect of *Laurus novocanariensis* oil and essential oil in human skin. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 34, n. 6, p. 546–550, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1468-2494.2012.00745.x>.

VIVIAN, M. *et al.* Resistência biológica da madeira tratada de duas espécies de *Eucalyptus* em ensaio de campo. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 34, 2014. DOI: <https://doi.org/10.4336/2014.pfb.34.80.545>.

WANG, L. *et al.* Recycling contaminated wood into eco-friendly particleboard using green cement and carbon dioxide curing. **Journal of Cleaner Production**, v. 137, p. 861–870, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.07.180>.

WANG, L. *et al.* Effects of essential oil citral on the growth, mycotoxin biosynthesis and transcriptomic profile of *Alternaria alternata*. **Toxins**, v. 11, p. 553, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/toxins11100553>.

WEETE, J. D.; ABRIL, M.; BLACKWELL, M. Phylogenetic distribution of fungal sterols. **Plos One**, v. 5, n. 5, p. e10899, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010899>.

WEI, A.; SHIBAMOTO, T. Antioxidant activities and volatile constituents of various essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 5, p. 1737–1742, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf062959x>.

WERNER, F.; RICHTER, K. Wooden building products in comparative LCA. **The International Journal of Life Cycle Assessment**, v. 12, p. 470–479, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1065/lca2007.04.317>.

WILLIAMS, D.; LEWIS, M. Pathogenesis and treatment of oral candidosis. **Journal of Oral Microbiology**, v. 3, n. 1, p. 5771, 2011. DOI: <https://doi.org/10.3402/jom.v3i0.5771>.

WONGKITTIPONG, R. *et al.* Solid–liquid extraction of andrographolide from plants—experimental study, kinetic reaction and model. **Separation and Purification Technology**, v. 40, n. 2, p. 147–154, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2004.02.002>.

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. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.06.041>.

YANG, H. *et al.* Structural mechanism of ergosterol regulation by fungal sterol transcription factor Upc2. **Nature Communications**, v. 6, n. 1, p. 1–13, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1038/ncomms7129>.

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

ZAKARIA, Z. A. *et al.* *In vivo* anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of the aqueous extract of the leaves of *Piper sarmentosum*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 128, n. 1, p. 42–48, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.12.021>.